

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC MỞ HÀ NỘI



ĐỒ ÁN THẠC SĨ
CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

ĐỀ TÀI
**PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ HOẠT
TÍNH SINH HỌC TỐT TỪ ĐẤT RỪNG CAO BẰNG, VIỆT
NAM VÀ ỨNG DỤNG ĐỂ TẠO CHẾ PHẨM PHÂN VI SINH**

TỔNG ĐỨC MINH

HÀ NỘI, 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC MỞ HÀ NỘI



ĐỒ ÁN THẠC SĨ

ĐỀ TÀI

**PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ
HOẠT TÍNH SINH HỌC TỐT TỪ ĐẤT RỪNG CAO BẰNG,
VIỆT NAM VÀ ỨNG DỤNG ĐỂ TẠO CHẾ PHẨM PHÂN VI
SINH**

TỔNG ĐỨC MINH

CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

MÃ NGÀNH: 8420201

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. NGUYỄN THÀNH CHUNG

HÀ NỘI, 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các cộng sự khác.

Các số liệu kết quả nêu trong luận văn là trung thực, một phần đã được công bố trên các hội nghị, phần còn lại chưa được ai công bố trong bất cứ công trình nào khác

Nếu có gì sai sót, tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm.

LỜI CẢM ƠN

Em xin chân thành cảm ơn thầy TS Nguyễn Thành Chung, Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Mở Hà Nội đã tận tình hướng dẫn, định hướng cách tư duy và cách làm việc khoa học tạo điều kiện tốt nhất để em hoàn thành khoá luận tốt nghiệp.

Em xin chân thành cảm ơn các thầy, cô tại trường Đại học Mở Hà Nội. Đặc biệt là các thầy cô khoa Công nghệ sinh học đã truyền đạt những kiến thức bổ ích, tạo mọi điều kiện trong quá trình học tập, nghiên cứu giúp chúng em có hành trang vững chắc trước khi tốt nghiệp.

Cuối cùng, em xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới gia đình, bạn bè và Quỳnh đã luôn động viên, chia sẻ cũng như đồng hành cùng em trong suốt chặng đường vừa qua.

Em xin chân thành cảm ơn.

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	9
Tính cấp thiết của đề tài.....	9
Mục tiêu đề tài	10
Tính sáng tạo, tư duy hệ thống và tư duy thiết kế.....	10
Các yếu tố phục vụ cộng đồng.....	11
Nội dung nghiên cứu	12
PHẦN I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	13
1.1. Tổng quan về xạ khuẩn.....	13
1.1.1. Đặc điểm sinh học của xạ khuẩn.....	13
1.1.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của xạ khuẩn.....	14
1.1.3. Khả năng sinh sản của xạ khuẩn	15
1.2. Đất rừng Phia Oắc – Phia Đén, Cao Bằng	16
1.3. Phân bón vi sinh	17
1.4. Ứng dụng của xạ khuẩn trong phân bón vi sinh	20
1.4.1. Khả năng kháng nấm	20
1.4.2. Khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng	21
1.4.3. Khả năng phân giải cellulose	22
1.5. Các nghiên cứu gần đây	23
1.5.1. Các nghiên cứu trong nước	23
1.5.2. Các nghiên cứu nước ngoài.....	24
PHẦN II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26

2.1. Vật liệu nghiên cứu.....	26
2.1.1. Mẫu đất	26
2.1.2. Các chủng nấm.....	26
2.1.3. Môi trường nuôi cấy.....	26
2.1.4. Dụng cụ và thiết bị.....	30
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	30
2.2.1. Phương pháp phân lập xạ khuẩn	30
2.2.2. Phương pháp chiết hoạt tính kháng nấm từ xạ khuẩn.....	31
2.2.3. Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng nấm của xạ khuẩn	31
2.2.4. Phương pháp định lượng IAA.....	33
2.2.5. Phương pháp xác định siderophore bằng môi trường CAS	33
2.2.6. Phương pháp xác định khả năng hòa tan phosphate	34
2.2.7. Phương pháp xác định khả năng phân giải cellulose.	34
2.2.8. Phương pháp tách DNA tổng số	34
2.2.9. Phương pháp khuếch đại gen PCR	36
2.2.10. Phương pháp định danh chủng xạ khuẩn bằng đoạn gen 16S rDNA	37
2.2.11. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học	38
2.2.12. Phương pháp tạo chế phẩm phân bón vi sinh	39
PHẦN III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	40
3.1. Phân lập chủng xạ khuẩn từ mẫu đất Cao Bằng.....	40
3.2. Sàng lọc chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm, có hoạt tính sinh học tốt	44
3.2.1. Hoạt tính kháng nấm của các chủng	44

3.2.2. Khả năng sinh tổng hợp phytohormone Indole-3-Acetic Acid (IAA).....	47
3.2.3. Khả năng sinh siderphore của các chủng.....	48
3.2.4. Khả năng phân giải cellulose của các chủng	49
3.2.5. Khả năng hòa tan phosphate của các chủng	50
3.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn TN4	52
3.3.1. Đặc điểm hình thái của chủng TN4	52
3.3.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn TN4.....	54
3.4. Định danh chủng xạ khuẩn TN4.....	55
3.4.1. Tách DNA tổng số và khuếch đại gen 16S rDNA của chủng xạ khuẩn TN4.....	55
3.4.2. Định danh chủng TN4.....	56
3.5. Nghiên cứu tạo chế phẩm phân bón vi sinh kháng nấm từ chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces albidoflavus</i> TN4	57
PHẦN IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	60
4.1. Kết luận	60
4.2. Kiến nghị	61
Tài liệu tham khảo	62

Danh mục bảng

Bảng 2. 1 Các chủng nấm	26
Bảng 2. 2 Môi trường phân lập xạ khuẩn.....	26
Bảng 2. 3 Môi trường nuôi cấy xạ khuẩn.....	27
Bảng 2. 4 Dung dịch muối A và Dung dịch muối vi lượng	28
Bảng 2. 5 Thành phần môi trường ISP9 và các nguồn carbon, nitrogen.....	29
Bảng 2. 6 Môi trường nuôi cấy nấm	30
Bảng 3. 1 Đặc điểm hình thái của 48 chủng xạ khuẩn trên môi trường ISP2	42
Bảng 3. 2 Hoạt tính kháng nấm của 48 chủng xạ khuẩn phân lập được	44
Bảng 3. 3 Khả năng sinh tổng hợp IAA của 15 chủng xạ khuẩn.....	47
Bảng 3. 4 Đường kính vòng đổi màu tạo phức hệ Siderophore trên môi trường thạch CAS	48
Bảng 3. 5 Đường kính vòng phân giải cellulose của các chủng xạ khuẩn.....	49
Bảng 3. 6 Khả năng hòa tan tricalcium phosphate của các chủng xạ khuẩn trên môi trường Pikovskaya.....	51
Bảng 3. 7 Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và khả năng sinh sắc tố của chủng xạ khuẩn TN4 trên các môi trường ISP tiêu chuẩn.....	53
Bảng 3. 8 Khả năng đồng hóa và sử dụng các nguồn Carbon và Nitrogen hữu cơ/vô cơ của chủng xạ khuẩn đích TN4.....	54

Danh mục hình ảnh

Hình 3. 1 Các mẫu đất từ rừng Phia Oắc – Phia Đén.....	40
Hình 3. 2 Đĩa phân lập một số mẫu đất từ rừng Phia Oắc-Phia Đén	41
Hình 3. 3 Hình ảnh khuẩn lạc của một số chủng xạ khuẩn phân lập được	41
Hình 3. 4. Hoạt tính kháng nấm của một số chủng.....	46
Hình 3. 5 Hình ảnh vòng phân giải cellulose của một số chủng xạ khuẩn	50
Hình 3. 6 Hình ảnh đĩa thạch Pikovskaya thể hiện vòng halo phân giải lân của các chủng xạ khuẩn	51
Hình 3. 7 Hình ảnh hình thái sự phát triển khuẩn lạc chủng xạ khuẩn TN4 trên hệ thống các đĩa môi trường ISP tiêu chuẩn	53
Hình 3. 8 DNA tổng số của chủng TN4.....	55
Hình 3. 9 Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn 16S rDNA của chủng TN4.....	56
Hình 3. 10 Cây phân loại phát sinh loài của chủng TN4	57
Hình 3. 11 Hình ảnh chế phẩm phân bón vi sinh từ chủng <i>Streptomyces albidoflavus</i> TN4.....	58

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của đề tài

Trong những thập kỷ qua, sự gia tăng dân số toàn cầu đã tạo ra áp lực lớn lên ngành nông nghiệp nhằm đảm bảo an ninh lương thực. Để đáp ứng nhu cầu này, việc thâm canh và lạm dụng phân bón hóa học, thuốc bảo vệ thực vật trở nên phổ biến. Tuy nhiên, các nghiên cứu quốc tế từ FAO và các tổ chức môi trường đã chỉ ra rằng việc sử dụng phân bón vô cơ kéo dài không chỉ làm mất cân bằng dinh dưỡng đất, gây hiện tượng chai cứng, chua hóa đất mà còn tiêu diệt hệ vi sinh vật có lợi, dẫn đến suy giảm đa dạng sinh học trong hệ sinh thái đất [1,2].

Trước bối cảnh biến đổi khí hậu và yêu cầu khắt khe về nông sản sạch, xu hướng chuyển dịch sang nền nông nghiệp hữu cơ bền vững là một yêu cầu tất yếu. Việc thay thế phân bón hóa học bằng các chế phẩm sinh học, đặc biệt là phân bón vi sinh được coi là giải pháp then chốt. Tại Việt Nam, một quốc gia có nền kinh tế dựa vào nông nghiệp, vấn đề cải tạo đất và nâng cao năng suất cây trồng theo hướng sinh học đang là ưu tiên hàng đầu trong chiến lược phát triển nông nghiệp công nghệ cao của chính phủ [3]. Do đó, việc tìm kiếm các nguồn vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao để sản xuất các chế phẩm sinh học, đặc biệt là phân bón vi sinh là yêu cầu cấp thiết.

Nhiều loại vi sinh vật và sự kết hợp của chúng với các loại cây trồng cụ thể đang được khai thác trong sản xuất phân bón sinh học. Hầu hết các thành phần của phân bón sinh học là chất cố định đạm (N-fixers), chất hòa tan lân (P-solubilisers), chất huy động lân (P-mobiliser), chất huy động kali (K-mobiliser) hoặc chất kích thích sinh trưởng thực vật. Hầu hết các vi khuẩn được sử dụng trong phân bón sinh học đều có mối quan hệ chặt chẽ với rễ cây hoặc đất vùng rễ. Các loại phân bón sinh học này hỗ trợ quá trình hấp thụ dinh dưỡng hiệu quả từ môi trường sinh trưởng.

Việt Nam là một quốc gia có sự đa dạng về khí hậu và địa hình. Sở hữu khí hậu nhiệt đới gió mùa, có nhiệt độ và độ ẩm cao cùng với lượng mưa lớn. Cùng với đó là địa hình phần lớn là đồi núi và đồng bằng. Những điều đó đã tạo nên sự đa dạng về vi sinh vật, đặc biệt là xạ khuẩn. Các khu rừng nguyên sinh trên các vùng núi vừa

và cao ở phía bắc Việt Nam được coi là điều kiện thuận lợi cho sự phát triển xạ khuẩn đất với nhiều chất hữu cơ trong đất và độ ẩm cao. Đất tại rừng Phia Oắc- Phia Đén, Cao Bằng là đất mùn, với thành phần hữu cơ trong đất cao, tạo điều kiện cho sự phát triển của xạ khuẩn. Xạ khuẩn là nhóm vi khuẩn Gram dương với nhiều hoạt tính sinh học tốt bao gồm khả năng sinh enzyme cellulase, sinh hoạt chất kích thích sinh trưởng, kháng nấm cao. Đây là những chất có tác dụng rất tốt cho việc cải thiện chất lượng đất, kích thích sinh trưởng cho cây và nâng cao khả năng kháng bệnh cho cây trồng. Vì vậy tôi quyết định chọn đề tài: **“Phân lập, tuyển chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học tốt từ đất rừng Cao Bằng, Việt Nam và ứng dụng để tạo chế phẩm phân bón vi sinh”**

Mục tiêu đề tài

Phân lập, tuyển chọn và định danh chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme cellulase có hoạt tính cao, sinh hoạt chất kích thích sinh trưởng và hoạt tính kháng nấm bệnh cho cây trồng từ đó ứng dụng để tạo chế phẩm phân bón vi sinh.

Tính sáng tạo, tư duy hệ thống và tư duy thiết kế

Tính sáng tạo (Innovation)

Khai thác tài nguyên bản địa đặc thù: Thay vì tìm kiếm ở các vùng đất nông nghiệp phổ biến, đề tài tập trung vào đất rừng nguyên sinh Phia Oắc - Phia Đén (Cao Bằng). Đây là môi trường có thảm mục hữu cơ dày, điều kiện khí hậu lạnh và độ ẩm cao, hứa hẹn tìm ra các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải hữu cơ và kháng bệnh mạnh mẽ mà các vùng khác không có.

Tích hợp đa tính năng trong một chủng vi sinh: Đề tài không chỉ dừng lại ở việc tìm chủng có khả năng kháng nấm, mà còn chú trọng vào hoạt tính kích thích sinh trưởng (IAA), và cải tạo đất (hòa tan lân, phân giải cellulose). Đây là cách tiếp cận hiện đại nhằm tạo ra sản phẩm phân bón đa năng.

Tư duy hệ thống (Systems Thinking)

Tiếp cận đa chiều: Đề tài nhìn nhận mối quan hệ hữu cơ giữa: Đất (vùng lấy mẫu) – Vi sinh vật (đối tượng nghiên cứu) – Cây trồng (đối tượng ứng dụng). Nghiên cứu không tách rời các đặc tính sinh học khỏi khả năng ứng dụng thực tế.

Tính toàn diện của nội dung: Mục tiêu nghiên cứu được thiết kế theo một chuỗi giá trị hoàn chỉnh: từ phân lập cơ bản, đánh giá hoạt tính sinh hóa chuyên sâu cho đến nghiên cứu kỹ thuật tạo chế phẩm (chất mang, mật độ vi sinh). Điều này đảm bảo kết quả nghiên cứu có thể chuyển giao trực tiếp cho sản xuất.

Tư duy thiết kế (Design Thinking) Quy trình thực hiện được lý giải qua các bước chặt chẽ:

- Phân tích nhu cầu: Xác định vấn đề đất canh tác đang bị nghèo kiệt và nhu cầu của nông dân về một loại chế phẩm sinh học có thể thay thế một phần phân bón hóa học.

- Lựa chọn ý tưởng: Chọn xạ khuẩn làm phân bón vi sinh vì chúng vừa có khả năng sinh bào tử (giúp chế phẩm bảo quản được lâu), vừa có hoạt tính kháng nấm, kích thích sinh trưởng, vừa có hệ enzyme ngoại bào cực mạnh.

- Thiết kế thí nghiệm: Xây dựng hệ thống sàng lọc kép: Sàng lọc hoạt tính đối kháng và Sàng lọc khả năng thúc đẩy tăng trưởng (IAA) và cải tạo đất.

- Thử nghiệm và hoàn thiện: Nghiên cứu phương pháp tạo chế phẩm để đưa vi khuẩn từ môi trường ống nghiệm ra dạng vật chất có thể sử dụng rộng rãi, đánh giá độ ổn định của sản phẩm để đảm bảo hiệu quả khi tới tay người dùng.

Các yếu tố phục vụ cộng đồng

Yếu tố đạo đức và trách nhiệm nghề nghiệp

Trách nhiệm môi trường: Việc nghiên cứu và ứng dụng xạ khuẩn bản địa thể hiện trách nhiệm bảo tồn và khai thác bền vững nguồn tài nguyên di truyền quốc gia.

Tính trung thực khoa học: Các dữ liệu về hoạt tính kháng nấm, khả năng hòa tan lân và định danh 16S rDNA được thực hiện và đối chiếu khách quan, đảm bảo chất lượng chế phẩm là thực chất.

Mục tiêu bảo vệ và an toàn cho sức khỏe cộng đồng

Nông sản sạch: Sản phẩm chế phẩm vi sinh giúp giảm dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và phân bón hóa học trong nông sản, bảo vệ trực tiếp sức khỏe người tiêu dùng.

Môi trường sống an toàn: Giảm thiểu sự ô nhiễm hóa chất vào nguồn nước và đất tại các vùng canh tác, góp phần xây dựng môi trường sống trong lành hơn cho cộng đồng dân cư nông thôn.

Đóng góp kinh tế, văn hóa - xã hội và phát triển bền vững

Hiệu quả kinh tế: Chế phẩm phân bón vi sinh giúp người nông dân giảm chi phí đầu vào, tăng năng suất cây trồng thông qua việc cải thiện độ phì nhiêu của đất và hạn chế nấm bệnh.

Phát triển bền vững: Đề tài phù hợp với định hướng "Nông nghiệp xanh" của Việt Nam và các mục tiêu phát triển bền vững của quốc tế. Việc khai thác tiềm năng từ đất rừng Cao Bằng còn góp phần phát triển kinh tế vùng sâu vùng xa, nâng cao giá trị tài nguyên địa phương.

Bối cảnh toàn cầu: Trong bối cảnh biến đổi khí hậu diễn biến phức tạp, việc sử dụng các chủng vi sinh chịu được điều kiện khắc nghiệt từ vùng núi cao là một giải pháp thích ứng thông minh, hướng tới nền nông nghiệp bền vững toàn cầu.

Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Phân lập chủng xạ khuẩn từ mẫu đất rừng Cao Bằng

Nội dung 2: Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm, sinh hoạt chất kích thích sinh trưởng và sinh enzyme cellulase có hoạt tính cao

Nội dung 3: Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

Nội dung 4: Định danh chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

Nội dung 5: Ứng dụng chủng xạ khuẩn trong phân bón vi sinh

PHẦN I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về xạ khuẩn

Xạ khuẩn, danh pháp khoa học là Actinobacteria, là một nhóm vi khuẩn nhân thật phân bố rộng rãi trong tự nhiên, với ít nhất 350 chi được biết đến cho đến nay. Hầu hết xạ khuẩn là sinh vật hoại sinh, sống trong đất, dành phần lớn vòng đời dưới dạng bào tử, đặc biệt là trong điều kiện hạn chế chất dinh dưỡng. Tuy nhiên, xạ khuẩn đã thích nghi được với nhiều môi trường sinh thái khác nhau: đất, nước ngọt, nước mặn và không khí. Chúng có nhiều trong đất hơn các môi trường khác, đặc biệt là đất kiềm và đất giàu chất hữu cơ, nơi chúng tạo nên một phần quan trọng của quần thể vi sinh vật [4].

Xạ khuẩn phát triển mạnh mẽ trong các tầng đất giàu chất hữu cơ, đặc biệt là lớp mùn ở vùng khí hậu nhiệt đới. Nhiều nghiên cứu cho thấy mật độ vi khuẩn trong đất có thể đạt tới khoảng 10^9 CFU/g, trong đó xạ khuẩn chiếm khoảng 10^7 CFU/g, phản ánh vai trò đáng kể của chúng trong hệ vi sinh vật đất [7]

1.1.1. Đặc điểm sinh học của xạ khuẩn

Xạ khuẩn là vi khuẩn gram dương có hàm lượng Guanine và Cytosine cao trong cấu tạo di truyền của chúng, có hình thái dạng sợi đặc trưng. Xạ khuẩn thường không có thành tế bào riêng biệt nhưng tạo ra một loại sợi nấm không tách biệt và mảnh. Hình thái điển hình của xạ khuẩn bao gồm hai vùng được đặt tên chính xác là sợi nấm trên không và sợi nấm nền. Loại trước nhô ra hoặc phát triển ra bên ngoài và thường tham gia vào khía cạnh sinh sản của sinh vật trong khi loại sau hoạt động như rễ phát triển trong môi trường thạch/chất nền cần thiết cho khía cạnh dinh dưỡng của sinh vật. Xạ khuẩn đóng vai trò chính trong hệ sinh thái vì chúng tham gia vào quá trình phân hủy chất hữu cơ, phục hồi sinh học và phong hóa sinh học và quan trọng hơn là tạo ra một số lượng lớn các chất chuyển hóa thứ cấp có ứng dụng điều trị rộng rãi [5].

Đa số xạ khuẩn có dạng sợi có thể phân nhánh, hiếu khí, hoại sinh. Hệ sợi xạ khuẩn giống như hệ sợi của nấm sợi phân nhánh và không có vách ngăn, sợi của xạ khuẩn mảnh hơn sợi của nấm mốc (Hệ sợi cơ chất: 0,3-0,8 μm , hệ sợi khí sinh: 1,4

μm) xạ khuẩn phát triển theo phương pháp mọc chồi phân nhánh (khoảng 30 μm phân 1 nhánh) độ dài sợi xạ khuẩn trong giai đoạn phát triển khoảng 11 $\mu\text{m}/\text{h}$ và chất nhân của tế bào, xạ khuẩn phát triển thành khuẩn lạc, kích thước khuẩn lạc có thể thay đổi tùy thuộc từng loài và điều kiện ngoại cảnh. Khuẩn lạc xạ khuẩn có 3 lớp: lớp ngoài có các sợi bền chặt, lớp trong tương đối xốp, lớp giữa có cấu trúc tổ ong. Khuẩn ty trong mỗi lớp có hoạt tính sinh học khác nhau: đỏ, cam, vàng, nâu, tím, xanh,... tùy thuộc vào loài và điều kiện môi trường. Cấu trúc khuẩn lạc xạ khuẩn phân biệt ở hướng sinh trưởng trong và ngoài mặt môi trường thạch tạo hệ sợi khí sinh và hệ sợi cơ chất. [6]

Cấu tạo màng tế bào xạ khuẩn khá phức tạp: gồm thành tế bào và màng nguyên sinh chất. Thành tế bào xạ khuẩn có tác dụng duy trì hình dạng tế bào và bảo vệ tế bào, thường có dạng kết cấu lưới, cấu tạo gồm 3 lớp, lớp ngoài dày khoảng $60\text{\AA} \div 120\text{\AA}$. Khi già có thể dày $150\text{\AA}$, lớp giữa rắn chắc dày $50\text{\AA}$, lớp trong dày khoảng $50\text{\AA}$ các lớp này chủ yếu cấu tạo từ các lớp glycopeptide, gồm các gốc N.acetyl glucosit. Khi xử lý bằng enzyme lysozyme các liên kết này bị phá vỡ, thành tế bào bị phá hủy.

1.1.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của xạ khuẩn

Xạ khuẩn chủ yếu là vi sinh vật hiếu khí bắt buộc, phát triển tốt trong điều kiện có oxy và nhiệt độ trung bình ($25\text{--}30^\circ\text{C}$). Chúng có khả năng sinh trưởng trên nhiều loại môi trường khác nhau, đặc biệt là các môi trường giàu chất hữu cơ như tinh bột, cellulose và protein. Nhiều loài xạ khuẩn có khả năng thích nghi với điều kiện môi trường khắc nghiệt như pH thấp hoặc cao, độ ẩm thấp và điều kiện dinh dưỡng hạn chế, nhờ vào hệ enzyme và cơ chế điều hòa trao đổi chất linh hoạt [20].

Về đặc điểm sinh hóa, xạ khuẩn có hệ enzyme ngoại bào rất phát triển, cho phép phân giải nhiều hợp chất hữu cơ phức tạp như cellulose, chitin, lignin, protein và tinh bột. Nhờ đó, chúng đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy chất hữu cơ và chu trình dinh dưỡng trong tự nhiên [21]. Ngoài ra, xạ khuẩn còn nổi bật với khả năng sinh tổng hợp nhiều chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học cao như kháng sinh, enzyme, chất chống oxy hóa và các hợp chất kháng ung thư. Ước tính hơn 70% kháng

sinh tự nhiên có nguồn gốc từ xạ khuẩn, đặc biệt là từ chi *Streptomyces* [20].

Xạ khuẩn cũng thể hiện các đặc điểm sinh hóa đặc trưng như khả năng sử dụng đa dạng nguồn carbon (glucose, xylose, arabinose...) và nguồn nitrogen (ammonium, nitrate, amino acid). Một số loài có khả năng cố định nitơ hoặc tham gia vào các quá trình chuyển hóa nitơ trong đất. Bên cạnh đó, nhiều xạ khuẩn có khả năng sinh sắc tố và các hợp chất bay hơi, góp phần tạo mùi đặc trưng của đất (geosmin) [21].

1.1.3. Khả năng sinh sản của xạ khuẩn

Xạ khuẩn sinh sản bằng bào tử. Bào tử xạ khuẩn được hình thành trên các nhánh phân hóa của khuẩn ty khí sinh gọi là cuống sinh bào tử. Đó là cơ quan sinh sản đặc trưng cho xạ khuẩn. Cuống sinh bào tử của xạ khuẩn có dạng thanh hoặc lượn sóng (RF-retus-flexibilis), dạng xoắn lò xo (S-spira), chuỗi bào tử không phát triển hoặc xoắn đơn giản có hình móc câu (RA- retinaculiaperti) [17].

Bào tử của xạ khuẩn có hình dạng đa dạng như hình cầu, hình bầu dục (oval), hình trụ hoặc hình que, tùy thuộc vào loài và kiểu sinh bào tử. Các bào tử có thể được hình thành riêng lẻ hoặc sắp xếp thành chuỗi trên sợi khí sinh; chiều dài chuỗi bào tử biến thiên lớn, từ dạng đơn bào tử, hai bào tử đến các chuỗi dài có thể chứa tới hàng chục hoặc hàng trăm bào tử [18]. Bề mặt bào tử xạ khuẩn cũng rất đa dạng, bao gồm các dạng trơn nhẵn, xù xì (rugose), có gai (spiny), có lông (hairy) hoặc dạng sần (warty) [19].

Về cấu trúc siêu hiển vi, bào tử thường được bao bọc bởi lớp vỏ (spore sheath) có cấu trúc phức tạp gồm nhiều thành phần như vật chất vô định hình, sợi fibrin và các cấu trúc dạng gai hoặc lông: lớp này có vai trò bảo vệ bào tử trước các điều kiện bất lợi của môi trường [16]. Ngoài hình thức sinh sản bằng bào tử, xạ khuẩn còn có thể sinh sản bằng khuẩn ty. Các đoạn khuẩn ty gây ra môi trường phát triển thành hệ khuẩn ty.

Xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được chứng minh là nguồn hoạt chất có giá trị cao. Chúng đã tạo ra nhiều hoạt chất chống vi trùng cần thiết về mặt lâm sàng, bao gồm streptomycin, actinomycin và streptothricin. Khoảng hai phần ba của tất cả các loại kháng sinh đã được sản xuất bởi xạ khuẩn, chủ yếu là bởi *Streptomyces*. Người

ta tin rằng xạ khuẩn là nguồn gốc của khoảng 61% tất cả các hoạt chất sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật được phát hiện cho đến nay.

1.2. Đất rừng Phia Oắc – Phia Đén, Cao Bằng

Vườn quốc gia Phia Oắc – Phia Đén là vườn quốc gia, rừng đặc dụng nằm trên địa bàn của 4 xã của tỉnh Cao Bằng gồm Thành Công, Phan Thanh, Tam Kim và Tĩnh Túc. Rừng có tổng diện tích tự nhiên là 10.593,5 ha, trong đó hệ sinh thái rừng tự nhiên chiếm ưu thế với 8.146,6 ha. Toàn bộ khu vực này nằm trong vùng lõi của Công viên địa chất toàn cầu UNESCO Non Nước Cao Bằng (được công nhận vào ngày 12/4/2018), sở hữu vị trí địa lý chiến lược khi kết nối trực tiếp với các trục giao thông huyết mạch như Tỉnh lộ 212, Quốc lộ 3 và Quốc lộ 34. Về cấu trúc quản lý, vườn quốc gia được phân định thành ba phân khu chức năng: bảo vệ nghiêm ngặt, phục hồi sinh thái và dịch vụ hành chính; đồng thời được bao quanh bởi vùng đệm rộng 8.276,1 ha. Trong đó, phân khu bảo vệ nghiêm ngặt (4.035,5 ha) tập trung tại các tiểu khu trọng điểm thuộc xã Thành Công, Phan Thanh và Tĩnh Túc, là nơi lưu giữ hệ sinh thái rừng kín thường xanh mưa ẩm nhiệt đới và á nhiệt đới núi trung bình. Đặc biệt, khu vực này còn sở hữu quần hợp "rừng rêu" (rừng lùn) – một kiểu rừng ôn đới đặc trưng của miền Bắc Việt Nam, đóng vai trò là sinh cảnh quan trọng của nhiều loài động thực vật đặc hữu và nguy cấp. Với đỉnh Phia Oắc cao 1.931 m — điểm cao nhất của cánh cung Ngân Sơn – Yên Lạc, vườn quốc gia không chỉ có giá trị cao về đa dạng sinh học mà còn là đối tượng trọng điểm trong nghiên cứu địa chất và khí hậu khu vực Đông Bắc.

Hệ sinh thái Vườn quốc gia Phia Oắc – Phia Đén là một chỉnh thể tự nhiên đặc hữu, được kiến tạo bởi sự tương tác phức tạp giữa các yếu tố địa chất, địa mạo và khí hậu vùng núi cao Đông Bắc. Đặc điểm nổi bật nhất của khu vực này chính là cấu trúc địa chất đa dạng với sự đan xen giữa các loại đá lục nguyên, đá vôi và đặc biệt là đá xâm nhập granit, tạo nên một cảnh quan độc đáo với các dãy núi đất xen kẽ núi đá dốc đứng. Với địa hình phân hóa mạnh mẽ, từ các thung lũng nhỏ hẹp đến hệ thống các đỉnh núi cao đồ sộ như Phia Oắc (1.935m), Niot Ti (1.574m), Tam Loang (1.446m) và Phia Đén (1.391m), nơi đây đã hình thành nên những vành đai sinh thái

khác biệt theo cao độ. Sự kết hợp giữa nền tảng địa chất cổ xưa và điều kiện khí hậu đặc trưng không chỉ tạo nên những hệ sinh thái đặc thù mà còn là cơ sở nền tảng cấu thành tính đa dạng sinh học phong phú bậc nhất khu vực.

Về thực vật, vườn quốc gia sở hữu thảm phủ xanh mượt trải dài qua nhiều vùng sinh thái. Các khu rừng tại đây không chỉ đóng vai trò là lá phổi xanh mà còn là nơi quần cư của nhiều loài gỗ quý và thực vật có hoa đặc hữu. Trong tổng số hàng ngàn loài thực vật, có tới 90 loài đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng cao, đòi hỏi các biện pháp bảo tồn nghiêm ngặt. Những đại diện tiêu biểu có thể kể đến như Thiết sam giả, Thiết sam núi đá, Thông Pà Cò, Dẻ tưng và đặc biệt là loài đặc hữu Vù hương cùng các loại gỗ có giá trị kinh tế và khoa học cao như Lát hoa, Sến mật, Nghiến.

Nhiệm vụ chiến lược của Vườn quốc gia Phia Oắc – Phia Đén không chỉ dừng lại ở việc bảo vệ nghiêm ngặt diện tích rừng hiện có và hệ động thực vật tự nhiên, mà còn tập trung vào việc phục hồi, làm giàu rừng thông qua việc gây ươm các giống cây bản địa quý hiếm nhằm nâng cao tỷ lệ phủ xanh và giá trị sinh thái. Việc bảo tồn tính đa dạng sinh học tại đây không tách rời mục tiêu phát triển kinh tế - xã hội địa phương; thay vào đó, công tác quản lý hướng tới việc khai thác bền vững các tiềm năng cảnh quan và dịch vụ môi trường rừng. Điều này không chỉ giúp tạo ra nguồn thu ổn định để tái đầu tư cho công tác bảo tồn mà còn góp phần nâng cao đời sống cộng đồng vùng đệm, khẳng định vị thế của một trung tâm bảo tồn đa dạng sinh học trọng điểm trong hệ thống các khu bảo tồn thiên nhiên quốc gia và quốc tế.

1.3. Phân bón vi sinh

Phân bón sinh học là một sản phẩm chứa các vi sinh vật đặc hiệu (sống hoặc tiềm ẩn), mang lại những tác động có lợi trực tiếp hoặc gián tiếp lên sự sinh trưởng và năng suất cây trồng thông qua nhiều cơ chế khác nhau. Phân bón sinh học là những sản phẩm chứa các tế bào sống của các vi sinh vật đặc hiệu khác nhau, có khả năng chuyển đổi các yếu tố dinh dưỡng thiết yếu từ dạng không khả dụng sang dạng khả dụng thông qua các quá trình sinh học khác nhau. Phân bón sinh học thường là các chế phẩm vi sinh vật dạng chất mang, sử dụng các vi sinh vật có lợi ở trạng thái sống,

dùng để bón cho hạt giống hoặc đất, nhằm tăng cường sinh trưởng của cây trồng bằng cách hấp thụ dinh dưỡng và/hoặc sản xuất hormone tăng trưởng. Phân bón sinh học đóng vai trò quan trọng trong việc cải thiện độ phì nhiêu của đất. Việc sử dụng chúng giúp cải thiện cấu trúc đất và giảm thiểu việc sử dụng quá mức phân bón hóa học độc hại.[7]

Dựa trên chức năng chủ yếu của vi sinh vật có trong chế phẩm, phân bón vi sinh thường được chia thành các nhóm:

- Phân vi sinh cố định đạm: chứa các vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrogen phân tử trong không khí thành amoni mà cây trồng hấp thụ được. Enzyme nitrogenase xúc tác phản ứng khử N_2 thành NH_3 . Ở vi khuẩn cộng sinh, quá trình diễn ra trong nốt sần – nơi được bảo vệ khỏi oxy; ở vi khuẩn tự do, tế bào phải duy trì vi môi trường yếm khí để enzyme hoạt động. Các giống tiêu biểu gồm *Rhizobium* cộng sinh với cây họ Đậu, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter* sống tự do, *Azospirillum* hội sinh trong vùng rễ [4]. Sử dụng phân vi sinh cố định đạm có thể đáp ứng 30–60% nhu cầu đạm của cây họ Đậu, giảm rõ rệt lượng phân urê cần bón.

- Phân vi sinh hòa tan lân: tập hợp các chủng vi sinh vật có khả năng tiết axit hữu cơ (gluconic, citric,...) làm giảm pH đất cục bộ, enzyme phosphatase hoặc các chất chelat hóa để chuyển lân khó tan (phosphat canxi, phosphat sắt, nhôm) thành dạng dễ tiêu cho cây. Các chi thường gặp gồm *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*), *Pseudomonas*, *Aspergillus* [5]. Phân vi sinh hòa tan lân giúp khai thác hiệu quả lượng lân tồn dư trong đất và giảm thất thoát do cố định hóa học.

- Phân vi sinh kích thích sinh trưởng thực vật: không trực tiếp cung cấp dinh dưỡng, nhưng sản sinh các phytohormone (auxin, gibberellin, cytokinin), enzyme ACC deaminase giảm ethylene stress, hoặc các hợp chất dễ bay hơi thúc đẩy kéo dài rễ, tăng hấp thu nước và khoáng. Vi khuẩn vùng rễ có lợi tổng hợp auxin (IAA) từ tryptophan có trong dịch rễ, gibberellin, cytokinin với lượng nhỏ, kích thích phân chia tế bào, kéo dài rễ và tăng diện tích hấp thụ. Một số chủng sinh siderophore (chất vận chuyển sắt) giúp cây thu nhận sắt trong đất nghèo; tiết enzyme ACC deaminase giảm ethylene stress, duy trì sự phát triển rễ trong điều kiện bất lợi (hạn, mặn) [6].

Nhiều chủng *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus amyloliquefaciens* đã được thương mại hóa.

- Phân vi sinh phân giải chất hữu cơ: chứa các vi sinh vật sinh enzyme cellulase, xylanase, pectinase, protease,... giúp đẩy nhanh quá trình ủ hoai mục tàn dư thực vật, rom rạ thành phân hữu cơ, đồng thời cải tạo kết cấu đất. Các chủng thường dùng là *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Bacillus* [7].

- Phân vi sinh đối kháng bệnh vùng rễ: chứa nấm hoặc vi khuẩn có khả năng cạnh tranh chất dinh dưỡng, sinh kháng sinh (iturin, surfactin, polyketide...), sinh enzyme phân hủy thành tế bào của nấm bệnh (*Trichoderma harzianum*, *Bacillus velezensis*, xạ khuẩn *Streptomyces* spp.), kích hoạt hệ miễn dịch tự nhiên của cây (ISR – induced systemic resistance), từ đó hạn chế các bệnh héo rũ, thối gốc [8]. Nhóm này thường được sử dụng kết hợp với phân hữu cơ để vừa cải tạo đất vừa phòng bệnh.

- Phân bón vi sinh tổng hợp: kết hợp nhiều chủng vi sinh vật có các chức năng khác nhau, ví dụ vừa cố định đạm, hòa tan lân, vừa sinh chất kích thích, giúp đáp ứng đồng thời nhiều lợi ích trong một lần bón [9].

Phân bón vi sinh mang lại nhiều lợi ích thiết thực cho nền nông nghiệp bền vững, trước hết là tính thân thiện với môi trường, không để lại tồn dư độc hại trong đất và nông sản. Sử dụng phân vi sinh giúp giảm đáng kể lượng phân hóa học cần bón, nhờ khai thác được nguồn đạm khí trời, lân khó tan và các chất dinh dưỡng sẵn có trong đất, từ đó tiết kiệm chi phí sản xuất. Bên cạnh đó, các vi sinh vật có ích còn góp phần cải thiện cấu trúc đất, tăng độ tơi xốp và giữ ẩm, đồng thời kích thích bộ rễ phát triển, nâng cao sức đề kháng của cây trồng trước các điều kiện bất lợi và mầm bệnh. Những ưu điểm này khiến phân bón vi sinh đặc biệt phù hợp với các hệ thống canh tác hữu cơ, VietGAP và nông nghiệp sạch. Tuy nhiên, bên cạnh những mặt tích cực, phân bón vi sinh cũng bộc lộ một số hạn chế cần khắc phục. Hiệu quả của chế phẩm phụ thuộc nhiều vào điều kiện ngoại cảnh như nhiệt độ, ẩm độ, pH và hàm lượng chất hữu cơ trong đất, cũng như kỹ thuật bón và bảo quản. Thời gian bảo quản của phân vi sinh thường ngắn, dễ bị nhiễm tạp khuẩn hoặc suy giảm mật số nếu không được lưu trữ đúng cách. Mặt khác, không giống phân hóa học, rất khó để kiểm soát

chính xác lượng dinh dưỡng mà cây trồng nhận được từ phân vi sinh. Thêm vào đó, trên thị trường hiện nay vẫn tồn tại nhiều chế phẩm kém chất lượng, mật số vi sinh thấp hơn công bố hoặc không được kiểm định chặt chẽ, gây tâm lý e ngại cho người sử dụng [2], [11]. Ngày nay, phân bón sinh học cũng được coi là một phương pháp đầy hứa hẹn trong việc kiểm soát sinh học các loại bệnh cây trồng khác nhau chống lại nhiều mầm bệnh từ đất. Để phát huy tối đa hiệu quả, cần kết hợp phân bón vi sinh với các biện pháp canh tác hợp lý, đồng thời tăng cường công tác quản lý chất lượng và hướng dẫn kỹ thuật cho nông dân

1.4. Ứng dụng của xạ khuẩn trong phân bón vi sinh

1.4.1. Khả năng kháng nấm

Peptide kháng nấm (AFP) như các sản phẩm tự nhiên đã được chứng minh về hiệu quả chống lại nhiễm nấm, đã được đề xuất là ứng cử viên mạnh của một nhóm kháng sinh mới [8]. Phát triển các chiến lược hiệu quả để sử dụng các cơ chế kháng bệnh thực vật tự nhiên chống lại mầm bệnh thực vật là một trong những mục tiêu quan trọng nhất trong nông nghiệp hiện đại [9, 10]. Các đặc điểm cấu trúc làm cho AFP có các tính chất vật lý và hóa học đặc biệt: cation, lưỡng tính (tức là ưa nước và ưa mỡ) và kỵ nước. Các acid amin phân cực hoạt động với một số lượng lớn cation có mặt ở đầu N, có liên quan chặt chẽ đến cơ chế của AFP đối với quá trình ly giải màng tế bào. Tính lưỡng tính là cấu trúc có trong hầu hết các AFP và đóng một vai trò quan trọng trong việc hòa tan màng. Dư lượng kỵ nước được hình thành bởi quá trình acyl hóa các acid amin ở phần đầu C, đây là một trong những lý do quan trọng cho tính đặc hiệu chọn lọc tế bào của AFP. Do cấu trúc cation và lưỡng tính, AFP tiêu diệt các tế bào nấm thông qua các cơ chế khác nhau và phức tạp khi ở trong màng đích và những cơ chế đặc biệt này được coi là yếu tố quan trọng cho xu hướng phát triển kháng thuốc ít hơn. Khác với thuốc trừ sâu hóa học, cơ chế của AFP có thể hoạt động thông qua ba chế độ: ức chế sự tổng hợp thành tế bào nấm, tương tác với các thành phần trong màng và tác động lên các mục tiêu nội bào, chẳng hạn như ty thể và đại phân tử axit nucleic. Do đó, AFP có thể trở thành một thể hệ mới của các chất

kháng nấm kháng khuẩn đầy hứa hẹn trong các ứng dụng chống nhiễm trùng trong tương lai [11, 12].

Thành tế bào nấm là rào cản đầu tiên của tế bào nấm, có thể chống lại tác động của môi trường bên ngoài và điều chỉnh áp suất thẩm thấu một cách hiệu quả. AFP là chất ức chế chitin synthase (CHS) và (1–3)- β -D-glucan synthase, dẫn đến thất bại trong quá trình tổng hợp thành tế bào, làm gián đoạn hình thái tế bào bình thường và làm giảm khả năng điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào. Bên cạnh đó, hoạt động của AFP trên màng tế bào nấm cũng được quan sát thấy do cấu trúc màng tế bào khác nhau giữa nấm và tế bào thực vật, tương tác như vậy có chọn lọc đáng kể. Nhìn chung, các nhà nghiên cứu đã đề xuất nhiều giả thuyết khác nhau để nghiên cứu cơ chế hoạt động của AFP trên cơ sở màng tế bào, chẳng hạn như mô hình "thùng", "hình xuyên", "thâm", "tổng hợp", v.v. [13, 14, 15, 16]. Các chất nội bào như màng itochondrial, protein và nucleotide (DNA và RNA) cũng có thể là mục tiêu của AFP

1.4.2. Khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng

Vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng thực vật (PGPR) là vi khuẩn cư trú trong vùng rễ cây và có thể kích thích sinh trưởng thực vật thông qua nhiều cơ chế khác nhau. PGPR đóng vai trò quan trọng trong nông nghiệp bền vững bằng cách giúp tăng năng suất cây trồng đồng thời giảm thiểu việc sử dụng phân bón hóa học và thuốc trừ sâu. Chúng hoạt động thông qua một số cơ chế, bao gồm điều hòa phytohormone, tăng cường hấp thụ dinh dưỡng, cố định đạm, hòa tan phosphate và tăng cường sức đề kháng của thực vật chống lại các tác nhân gây bệnh. Trong số các cơ chế này, việc sản xuất hormone sinh trưởng thực vật, đặc biệt là auxin, là một trong những cách quan trọng nhất mà PGPR ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của cây trồng. [17]

Kích thích sinh trưởng thực vật bằng xạ khuẩn có hai loại: trực tiếp và gián tiếp. Trong phương pháp trực tiếp, các phytohormone như IAA và cytokinin được sản xuất cùng với quá trình hòa tan các khoáng chất như sắt và phot pho bằng cách sản xuất siderophore để tăng cường dinh dưỡng cho thực vật và 1-aminocyclopropane-1-

carboxylic acid (ACC) deaminase. Trong phương pháp trực tiếp, xạ khuẩn giúp thực vật như tác nhân kiểm soát sinh học. Chúng có thể tăng cường thúc đẩy sinh trưởng thực vật và tiêu diệt mầm bệnh thực vật có hại bằng cách kích thích hệ thống kháng thuốc của thực vật. Chúng có khả năng sản xuất phytohormone, cố định đạm và cũng có thể ngăn chặn sự phát triển của tác nhân gây bệnh thực vật bằng hoạt tính đối kháng, đồng thời hỗ trợ quá trình hòa tan phosphate. Nhiều loài xạ khuẩn nội sinh trên cây trồng đã được báo cáo là có nhiều đặc tính thúc đẩy sinh trưởng thực vật. Chúng cũng được phát hiện có đặc tính đối kháng với nhiều tác nhân gây bệnh ở rễ và gây bệnh thực vật. [18]

Axit indole-3-acetic (IAA) là một auxin tự nhiên đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của cây trồng. IAA được sản xuất bởi nhiều loài vi khuẩn vùng rễ, đặc biệt là các loài thuộc chi *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* và *Azospirillum*. IAA kích thích sự phát triển của rễ và tăng cường khả năng hấp thụ nước và chất dinh dưỡng của cây, do đó cải thiện khả năng chống chịu hạn hán và thiếu hụt dinh dưỡng. Ngoài ra, IAA còn tham gia vào nhiều quá trình sinh lý quan trọng khác, chẳng hạn như quang hợp, phân chia tế bào, kéo dài tế bào và điều hòa biểu hiện gen. Hơn nữa, các vi sinh vật sản xuất IAA đã chứng minh hiệu quả đặc biệt trong việc giảm thiểu căng thẳng do hạn hán. Không giống như các cơ chế như cố định đạm và hòa tan photphat, chủ yếu giải quyết các hạn chế về dinh dưỡng, IAA điều chỉnh trực tiếp cấu trúc thực vật và các quá trình sinh lý ngay cả trong điều kiện dinh dưỡng tối ưu, mang lại lợi ích trong suốt vòng đời của cây. Tương tự, siderophore và khả năng hòa tan phosphate hỗ trợ cho IAA bằng cách giải quyết thiếu hụt vi lượng và dưỡng chất, thúc đẩy sinh trưởng [17].

1.4.3. Khả năng phân giải cellulose

Cellulose là nguồn cacbon tái tạo dồi dào nhất trên trái đất để sản xuất các hóa chất nguyên liệu có giá trị thương mại gia tăng, khi được chuyển đổi hiệu quả thành các đơn vị D-glucose đơn phân [19]. Sự sẵn có của cellulose khiến nó trở thành nguyên liệu thô hữu ích để sản xuất nhiều sản phẩm hàng hóa quan trọng trong công

nghiệp [20]. Ngay từ đầu, cả thủy phân hóa học và thủy phân enzym đã được sử dụng để chuyển đổi hiệu quả sinh khối cellulose thô thành đường lên men; làm cho nó trở nên đơn giản để sử dụng trong các mục đích công nghiệp khác nhau. Phương pháp cũ hiện đang được sử dụng như phương pháp phổ biến nhất để sản xuất monosaccharides từ cellulose. Ngoài ra, thủy phân hóa học thường dẫn đến sự tích tụ các sản phẩm phụ không mong muốn không phải đường, gây ra các vấn đề lớn trong việc thu hồi các sản phẩm thu được và sử dụng như một sản phẩm tiết kiệm chi phí [21]. Mặt khác, thủy phân enzym khắc phục tất cả các vấn đề đó và có thể được sử dụng hiệu quả hơn thủy phân hóa học. Nó có tiềm năng lớn về độ hòa tan thấp hơn trong môi trường nước [22]. Hệ thống enzyme cellulase kiểm soát hoàn toàn quá trình thủy phân bằng enzyme bao gồm ba loại enzyme ngoại bào hòa tan: (1) 1, 4- β -endoglucanase, (2) 1, 4- β -exoglucanase và (3) β -glucosidase (β -D-glucoside glucohydrolase hoặc cellobiase). Nhìn chung, endoglucanase chịu trách nhiệm cắt ngẫu nhiên các liên kết β -1, 4-glycosidic bên trong dọc theo chuỗi cellulose. Exoglucanase chủ yếu cần thiết cho việc cắt đầu không khử của chuỗi cellulose và tách các sợi cơ bản từ cellulose tinh thể và β -1, 4-glucosidase thủy phân cellobiose và cello-dextrin hòa tan trong nước thành glucose [23, 24]. Hoạt động hiệp đồng của cả ba enzyme này mang lại kết quả tốt nhất để thủy phân hoàn toàn cellulose thô thành glucose [25,26,27].

1.5. Các nghiên cứu gần đây

1.5.1. Các nghiên cứu trong nước

Năm 2024, Đinh Quốc Long cùng nhóm nghiên cứu đã phân lập các chủng xạ khuẩn từ mẫu bùn thô ở hồ Khuê Trung, Đà Nẵng. Kết quả nhóm nghiên cứu thu được 5 chủng xạ khuẩn từ mẫu bùn, hầu hết đều có khả năng kháng khuẩn tốt với các vi sinh vật kiểm định như *Pseudomonas aeruginosa* kháng tetracycline, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium*.

Năm 2023, Đặng Thị Thanh Tâm cùng nhóm nghiên cứu đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm bệnh *Fusarium solani* từ 36 chủng phân lập được. Chủng xạ khuẩn SR32 có tỷ lệ đối kháng cao nhất đạt $51,67 \pm 0,96$ %. Chủng SR32 mang gen PKS II, kích thước xấp xỉ 480bp, đồng thời tổng hợp enzyme chitinase, siderophore. Chủng được xác định là *Streptomyces rameus* SR32, có tiềm năng sử dụng làm tác nhân sinh học kiểm soát nấm *F. solani* gây bệnh thối quả sầu riêng.

Nguyễn Thị Diệu Hạnh cùng nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân lập xạ khuẩn từ 20 mẫu đất ở 2 tỉnh Bến Tre và Long An vào năm 2021. Kết quả thu được 40 chủng xạ khuẩn, trong đó hơn 50% các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp ít nhất 1 trong 4 loại enzyme ngoại bào như amylase, cellulase, protease và chitinase. Và 17 chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng ít nhất 1 trong 4 chủng vi khuẩn kiểm định như *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* và 24 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng ít nhất 1 trong 7 chủng nấm mốc kiểm định *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Aspergillus sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Colletotrichum siamense* và *Penicillium chermesinum*.

1.5.2. Các nghiên cứu nước ngoài

Năm 2025, Palla Madhu Babu cùng nhóm nghiên cứu đã phân lập được 54 chủng xạ khuẩn từ các mẫu đất được thu thập từ 25 vị trí khác nhau tại Ấn Độ. Nhóm nghiên cứu đã tuyển chọn được 6 chủng cho khả năng hòa tan Phosphate,. Trong đó có 3 chủng cho hoạt động tốt nhất, để sản xuất IAA và được sử dụng để đánh giá trên cây *Eleusine coracana* L.

Elmutasum O Ibnouf cùng vào đồng nghiệp vào năm 2022 đã phân lập và tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn có khả năng kháng khuẩn từ các mẫu đất. Các mẫu đất sau khi xử lý và tiến hành phân lập đã tuyển chọn được chủng D-3 có tiềm năng nhất. Sau đó nhóm nghiên cứu đã tiến hành chiết xuất chủng xạ khuẩn này và kết quả thu được nhiều chất có tầm quan trọng trong y tế như: Hexadecane, 2,6,11,15-Tetramethyl – Octacosane - Dodecanoic Acid, 1,2,3- Propane-triyl ester – Hexatriacontane – Heptacosane - Eicosyl Acetate – Tritetracontane - Tetracosane,

2,6,10,15,19,23-Hexamethyl - Myristic Acid vinyl ester – Tetratetracontane. Một số chất có tác dụng kháng khuẩn, một số có tác dụng chống dị ứng, chống viêm, chống ung thư, chống nấm, chống oxy hóa và một số là thành phần thiết yếu trong mỹ phẩm.

Năm 2020, Anupama Sapkota cùng với các công sự của mình đã phân lập được 41 chủng xạ khuẩn từ 11 mẫu đất tại Nepal. Sau khi nghiên cứu đặc điểm sinh thái, sinh lý và sinh hóa cũng như khảo sát khả năng kháng khuẩn với một số chủng vi sinh vật kiểm định. Nhóm nghiên cứu đã xác định được trong số chủng đã phân lập có 70,7% là *Streptomyces* spp., 19,5% chủng là *Nocardia* spp. và 9,5% là *Micromonospora* spp. Trong số có chủng xạ khuẩn có 43,34% chủng có khả năng kháng khuẩn mạnh từ quá trình sàng lọc. Nhóm nghiên cứu đã tuyển chọn được chủng C7 (*Micromonospora* spp.) cho hoạt động kháng khuẩn phổ rộng tốt nhất.

PHẦN II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Mẫu đất

Mẫu đất được lấy ở độ sâu 10-15cm dưới bề mặt từ nhiều khu vực rừng khác nhau tại vườn quốc gia Phia Oắc – Phia Đén, Cao Bằng, Việt Nam. Các mẫu được đựng trong túi polyethylene vô trùng và bảo quản ở 4°C.

2.1.2. Các chủng nấm

Các chủng nấm được sử dụng để thử hoạt tính sinh học gồm 2 chủng, được trình bày dưới bảng sau:

Bảng 2. 1 Các chủng nấm

STT	Tên chủng
1	<i>Fusarium oxysporum</i>
2	<i>Rhizoctonia solani</i>

Các chủng nấm được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ cao, Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Mở Hà Nội

2.1.3. Môi trường nuôi cấy

Các môi trường được sử dụng để phân lập xạ khuẩn

Bảng 2. 2 Môi trường phân lập xạ khuẩn

Tên môi trường	Thành phần	Khối lượng (g/l)
CSA	Tinh bột tan	10g
	K ₂ SO ₄	2g
	KNO ₃	2g
	Casein	0,3g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
	NaCl	35g
	Agar	20g
SC-CW	Tinh bột tan	10g
	Casein	0,3g
	KNO ₃	2g
	NaCl	2g
	MgSO ₄	0,05g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
	CaCO ₃	0,02g
	Agar	20g

Starch casein	Tinh bột tan	10g
	Casein	0,3g
	KNO ₃	2g
	Agar	20g

Các môi trường được sử dụng để nuôi cấy xạ khuẩn

Bảng 2. 3 Môi trường nuôi cấy xạ khuẩn

Tên môi trường	Thành phần	Khối lượng (g/l)
ISP 1	Tryptone	5,0
	Cao nấm men	3,0
	Agar	20,0
ISP 2	Cao nấm men	4,0
	Dịch chiết malt	10,0
	Glucose	4,0
	Agar	20,0
ISP 3	Bột yến mạch	20,0
	Dung dịch muối vi lượng 1	1,0 ml
	Agar	20,0
ISP 4	Tinh bột	10,0
	K ₂ HPO ₄	1,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
	NaCl	1,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
	CaCO ₃	2,0
	Dung dịch muối vi lượng 1	1,0 ml
	Agar	20,0
ISP 5	L-asparagine	1,0
	Glycerin	10,0
	K ₂ HPO ₄	1,0
	Dung dịch muối vi lượng 1	1,0 ml
	Agar	15,0
ISP 6	Peptone	10,0
	Cao nấm men	1,0
	Citrate sắt	0,5
	Agar	20,0

ISP 7	Glycerine	15,0
	L-tyrosine	0,5
	L-asparagine	1
	K ₂ HPO ₄	0,5
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
	NaCl	0,5
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
	Dung dịch muối vi lượng 1	1,0 ml
R2YE	Agar	20
	Sucrose	10,3
	K ₂ SO ₄	0,025
	MgCl ₂ .6H ₂ O	1,012
	Glucose	1,0
	Cao nấm men	0,5
	Dung dịch khoáng:	Trong 100ml nước
	K ₂ HPO ₄	cắt
	TES	1,0 ml
	CaCl ₂ .2H ₂ O	10,0 ml
	Trace	8,0 ml
	L- proline	0,2 ml
	NaOH	1,5 ml
BFM1		0,5 ml
	Dextrin	20,0
	Tinh bột tan	20,0
	Cao thịt	10,0
	Tryptone	5,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
	CaCO ₃	2,0
NDYE	Cao nấm men	5,6
	Maltose	112,5
	NaNO ₃	11,5
	K ₂ HPO ₄	11,5
	Hepes buffer	238,5
	MgSO ₄ .7H ₂ O	6
	NaOH(1M)	10ml
	Dung dịch muối vi lượng 2	2ml
	Agar	20

Thành phần dung dịch muối được sử dụng trong các môi trường ISP

Bảng 2. 4 Dung dịch muối A và Dung dịch muối vi lượng

Dung dịch muối A (%)

Pepton	20,0 g
Acid Citric	0,384 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g
NH ₄ OH (25%)	0,264g
Na ₂ S ₂ O ₃	10,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
H ₂ O	1 l

Dung dịch muối vi lượng 1		Dung dịch muối vi lượng 2	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g	ZnCl ₂	40 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	FeCl ₃ .6H ₂ O	200 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	CuCl ₂ .2H ₂ O	10 mg
H ₂ O	1 l	MnCl ₂ .4H ₂ O	10 mg
		Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	10 mg
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	10 mg
		H ₂ O	1 l

Ngoài ra, nghiên cứu còn sử dụng môi trường ISP9 có thay đổi, bổ sung nguồn carbon, nitrogen để nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn.

Bảng 2. 5 Thành phần môi trường ISP9 và các nguồn carbon, nitrogen

Thành phần		Khối lượng (g/l)
ISP9	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64
	KH ₂ PO ₄	2,38
	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	5,65
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,0
	Dung dịch muối vi lượng	1,0 ml
	Agar	20
	Nguồn carbon	1,0%
	Nguồn nitrogen	1,0%

Nguồn carbon	Nguồn nitrogen
Glucose	L- Asparagine
Sucrose	L- Tyrosine

Maltose	Glycerin
Dextrin	Tryptone
Glycerol	Peptone
Fructose	(NH ₄) ₂ SO ₄

Môi trường nuôi cấy nấm mốc, nấm men:

Bảng 2. 6 Môi trường nuôi cấy nấm

Thành phần	Bột khoai tây	Dextrose	Nước
Môi trường PD lỏng	0,4g	2g	Vừa đủ 100ml

2.1.4. Dụng cụ và thiết bị

Bảng 2. 7 Dụng cụ và thiết bị

Thiết bị	Hãng
Tủ cấy	Vision scientific co.,ltd - Hàn Quốc
Cân phân tích	Ohaus - Trung Quốc
Tủ nuôi	Memmert - Đức
Tủ lắc	Labtech - Trung Quốc
Kính hiển vi quang học	KRUSS - Đức
Máy HPLC	Agilent - Mỹ
Máy chạy gel	Bio-rad - Mỹ
Máy PCA	Takara - Nhật Bản
Lò vi sóng	Sanyo - Nhật Bản
Nồi hấp	Alp - Nhật Bản
Máy siêu âm	MRC - Israel

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập xạ khuẩn

Cân 10g đất mỗi mẫu và nghiền nhỏ trong cối chày sứ (đã khử trùng). Sau đó hòa tan trong 90 ml nước muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl), lắc trên máy lắc 150 vòng/phút trong 10 - 20 phút, để lắng 15 phút rồi dùng pipet hút 1 ml dung dịch sang ống nghiệm có 9 ml nước muối sinh lý mới. Tiếp tục pha loãng tới 10⁻⁴ và 10⁻⁵. Từ mỗi nồng độ pha loãng cấy 1 ml vào đĩa petri đường kính 220 mm chứa các môi

trường phân lập. Nuôi ở 28°C, trong thời gian 14 ngày. Quan sát sự phát triển của khuẩn lạc sau các khoảng thời gian nuôi cấy thích hợp, làm thuần và giữ giống [30].

Màu sắc khuẩn ty khí sinh của các chủng xạ khuẩn được chia thành 8 nhóm màu: White (W) nhóm trắng, Gray (Gy) nhóm xám, Red (R) nhóm đỏ, Yellow (Y) nhóm vàng, Green(Gn) nhóm xanh, Blue (B) nhóm xanh da trời, Violet (V) nhóm tím và nhóm màu không xác định (X).

2.2.2. Phương pháp chiết hoạt tính kháng nấm từ xạ khuẩn

Nguyên lý phương pháp tách chiết bằng dung môi hữu cơ:

Dựa vào khả năng hòa tan của chất kháng sinh trong dung môi hữu cơ như: ethyl acetate, methanol, chloroform, acetone mà tiến hành tách chiết hoạt chất kháng nấm thô từ dịch nuôi cấy của xạ khuẩn.

Cách tiến hành:

Chủng xạ khuẩn được nuôi lắc trong môi trường lỏng ở 28°C, 120 rpm trong 7 ngày sau đó lấy canh trường đem ly tâm 10.000 v/p trong 10 phút, thu dịch nổi.

Phần dịch sau ly tâm sẽ được bổ sung ethyl acetate, butanol,... với tỉ lệ 1:1 về thể tích.

Hỗn hợp dịch nuôi và dung môi được lắc với tốc độ 200 rpm ở nhiệt độ phòng từ 1 ÷ 2 giờ.

Hoạt chất kháng nấm tan trong dung môi hữu cơ phân thành 2 pha rõ rệt, dùng phễu chiết thu phần dịch trong ethyl acetate phía trên. Sau đó, dịch này được loại bỏ dung môi bằng máy quay cô chân không. Hoạt chất kháng nấm thô sau khi quay cô sẽ được hòa tan trong methanol và bảo quản ở nhiệt độ -20°C. [29]

2.2.3. Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng nấm của xạ khuẩn

2.2.3.1. Thử hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp đục lỗ thạch

Nguyên lý:

Hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn được thử bằng phương pháp đục lỗ thạch. Mẫu thử được nhỏ vào giếng được đục trên đĩa thạch đã được cấy nấm, mẫu

thử từ giếng thạch sẽ khuếch tán vào môi trường thạch gây ức chế sự phát triển của nấm và tạo vòng kháng nấm hoặc vòng ức chế.

Cách tiến hành:

Các chủng nấm được tăng sinh ở môi trường PD lỏng ở 28°C trong 4-5 ngày. Sau đó lấy 1 lượng nấm định bổ sung vào môi trường PD 1% agar ẩm (khoảng 35-40°C), lắc đều để nấm phân tán đều vào môi trường, sau đó đổ ra đĩa đọi khô và tiến hành đục giếng. Sau đó bổ sung khoảng 100-120µl mẫu thử vào giếng thạch, ủ đĩa ở 27°C và xem kết quả sau 2-3 ngày.

Mẫu thử là chủng xạ khuẩn được nuôi lắc trong môi trường lỏng ở 28°C, 125 rpm trong 4-5 ngày. Sau đó lấy khoảng 100-120 µl dịch nuôi cho vào các giếng đã đục sẵn, ủ các đĩa ở 27°C và đọc kết quả sau 3-5 ngày.

Tiến hành ghi nhận kết quả kháng nấm thông qua việc đo kích thước vòng kháng nấm xuất hiện trên các mặt đĩa thạch chứa nấm thử nghiệm.

Hoạt tính kháng nấm được xác định dựa vào kích thước vòng kháng nấm. Đo đường kính vòng kháng nấm bằng thước kẹp Panmer. Kết quả được đọc theo công thức:

$$HTKS = D - d \text{ (mm)}$$

Trong đó:

D: Đường kính vòng kháng khuẩn/ kháng nấm

d: Đường kính lỗ thạch

2.2.3.2. Thử hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp cấy chấm điểm

Nguyên lý:

Chủng xạ khuẩn được cấy chấm điểm trên môi trường có nấm mốc. Xác định khả năng ức chế của xạ khuẩn đối với sự sinh trưởng của nấm mốc lựa chọn chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế nấm mốc tốt

Cách tiến hành:

Bước 1: Cấy chấm điểm tạo khuẩn lạc trước

- Dùng que cấy chấm từ 3 đến 4 điểm cách đều nhau trên đĩa thạch PDA (hoặc ISP2). Mỗi điểm cấy tạo thành một vòng tròn nhỏ đường kính khoảng 2 – 3 mm.
- Đem ủ đĩa ở 28°C trong vòng 3 – 5 ngày để chủng vi sinh vật phát triển ổn định thành các khuẩn lạc già và tiết hoạt chất kháng nấm ra vùng thạch xung quanh.

Bước 2: Đổ lớp thạch chứa bào tử nấm mốc

- Chuẩn bị dịch huyền phù bào tử nấm mốc kiểm định trong nước cất vô trùng hoặc nước muối sinh lý, điều chỉnh mật độ đạt khoảng 10^6 bào tử/ml.
- Hút 1 ml dịch huyền phù bào tử trộn đều vào ống nghiệm chứa 9 ml môi trường thạch mềm (PDA chỉ chứa 0,7% – 0,8% agar) đã giữ ấm sẵn ở nhiệt độ khoảng 40°C – 45°C.
- Lắc nhẹ rồi đổ đều lớp thạch mềm chứa bào tử này lên bề mặt đĩa thạch đã có các chấm khuẩn lạc vi sinh vật mọc sẵn từ trước.

2.2.4. Phương pháp định lượng IAA

Chủng xạ khuẩn được nuôi lắc trong môi trường lỏng ở 28°C, 125rpm trong 7 ngày sau đó lấy canh trường đem li tâm 10.000 rpm trong 5 phút, thu nhận dịch nổi. Thêm 1-2 ml thuốc thử Salkowski (0,5 mL FeCl_3 0,5 M trong 98 mL H_2SO_4 97%) vào 1 ml dịch nổi, lắc đều và ủ tối ở nhiệt độ phòng 25-30°C trong 30 phút. Đo độ hấp thụ quang phổ tại $\lambda = 530$ nm bằng máy quang phổ kế UV-Vis. Xây dựng đường chuẩn IAA (0-100 $\mu\text{g/mL}$) với phương trình hồi quy tuyến tính để tính nồng độ IAA ($\mu\text{g/mL}$) trong CFS

2.2.5. Phương pháp xác định siderophore bằng môi trường CAS

Cấy chấm điểm chủng xạ khuẩn lên đĩa thạch Chrome Azurol S (CAS: blue agar chứa CAS, hexadecyltrimethyl ammonium bromide, piperazine). Nuôi ở 28°C trong 7-14 ngày, quan sát vòng đổi màu từ xanh dương sang cam/vàng quanh vùng

thấm CFS, đo đường kính vòng sáng (>5 mm xác nhận dương tính). Tỷ lệ đổi màu tỷ lệ thuận với nồng độ siderophore.

2.2.6. Phương pháp xác định khả năng hòa tan phosphate

Cấy chấm điểm trên môi trường thạch Pikovskaya (Glucose 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L, NaCl 0,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/L, KCl 0,2 g/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g/L (hoặc $\text{AlPO}_4/\text{FePO}_4$), yeast extract 0,5 g/L, agar 15-20 g/L, pH 7,0). Nuôi ở 28°C trong 7-14 ngày, quan sát và đo vòng sáng trong suốt quanh khuẩn lạc (halo zone) do acid hữu cơ hòa tan phosphate khó tan. Đo đường kính halo (mm).

2.2.7. Phương pháp xác định khả năng phân giải cellulose.

Định tính cellulase: Cấy điểm xạ khuẩn lên đĩa thạch CMC (NaNO_3 2 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L, CMC-Na 10-20 g/L, agar 15-20 g/L, pH 7,0), nuôi ở 28°C , 5-7 ngày. Nhuộm Lugol 5% (10 phút), rửa NaCl 1M. Đo đường kính vòng phân giải >20 mm xác nhận chủng sinh cellulase có hoạt tính mạnh.

Định lượng hoạt tính cellulase (Miller 1959):

Nuôi cấy xạ khuẩn môi trường lỏng CMC 28°C , 200 rpm, 5-7 ngày. Ly tâm thu dịch enzyme. Phản ứng: 0,5 mL CFS + 0,5 mL CMC 1% 50°C 30 phút, thêm DNS, đun sôi 5 phút, đo OD 540 nm. Tính hoạt tính (U/mL): 1 U = 1 μmol glucose/phút từ đường chuẩn glucose.

2.2.8. Phương pháp tách DNA tổng số

Nguyên tắc:

Tách chiết DNA là kỹ thuật cơ bản trong các phòng thí nghiệm phân tử, di truyền và sinh vật học nói chung. Phân tử ADN sau khi tách chiết cần đảm bảo được số lượng và chất lượng để đáp ứng được các phân tích sau. Đối với mỗi loại mô, tế bào quy trình tách chiết sẽ khác nhau. Tuy nhiên nguyên lý tách chiết ADN từ tế bào vẫn gồm các bước cơ bản sau: Phá màng – rửa tế bào bằng lysis buffer, phá vỡ thành tế bào của xạ khuẩn nhờ lysozyme; loại bỏ protein khỏi DNA nhờ các enzyme

proteinase K; rửa nucleic acid – phân tách các thành phần của tế bào sau khi phá vỡ thành ba pha nhờ dung dịch đệm phenol : chloroform (1:1), pha trên cùng chứa nucleic acid, pha giữa là protein kết tủa, pha dưới cùng chứa cặn tế bào. Tiếp đó, loại bỏ RNA bằng Rnase. Sau cùng, ADN được rửa bằng Ethanol, được làm khô và hòa tan trong TE buffer.

Các bước thực hiện: theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001)

Dịch nuôi cấy xạ khuẩn sau 2 ngày (50ml), lắc đều, hút 3ml canh trường sang ống falcon mới, đem ly tâm 4000 rpm, trong 10 phút để thu TB

Hòa tan sinh khối TB trong 1000µl lysis buffer (TE25S), vortex đều và ly tâm ở 10000rpm trong 10 phút để loại dịch và thu tế bào. Rửa tế bào bằng lysis buffer 2 lần nữa.

Hòa tan tế bào trong 500µl lysis buffer. Bổ sung 28µl lysozyme (100mg/ml) để nồng độ cuối cùng là 5mg/ml, ủ ở 37°C trong 2 giờ.

Với mỗi mẫu xạ khuẩn thêm 40µl EDTA 0,5M và 5µl proteinase K, lắc đều nhẹ nhàng và ủ ở 37°C trong 10 phút.

Thêm 35µl SDS 10%, lắc nhẹ và để ở 37°C trong 10 phút, sau đó ủ ở 4°C 10 phút.

Thêm 70µl CH₃COOK 5M, để 15p ở 4°C, bổ sung phenol-chloroform (1:1) = V dung dịch trong ống, đảo đều, ly tâm 10000 rpm trong 10 phút. Sau khi ly tâm thấy xuất hiện 3 pha. Dùng pipet hút dịch nổi phía trên sang ống eppendorf mới.

Bổ sung tiếp Chloroform với thể tích bằng dịch trong ống, ủ 10 phút ở 4 độ C, đảo đều và ly tâm ở 10000 rpm trong 10p. Sau ly tâm xuất hiện 2 pha, dùng pipet thu phần dịch nổi phía trên. Tiếp tục tiến hành bổ sung với Chloroform tỉ lệ 1:1, ủ 10 phút ở 4 độ C và ly tâm thêm 1 lần nữa và thu phần dịch phía trên.

Bổ sung 5µl RNase, ủ 37 độ trong 1 giờ.

Bổ sung 1ml dung dịch resin vào ống eppendorf với tỷ lệ 1:1, đảo đều, chạy cột.

Bổ sung 50µl nước deion để hòa tan DNA trong ống eppendorf mới.

DNA sau khi tách được chạy điện di kiểm tra trên bản gel agarose.

2.2.9. Phương pháp khuếch đại gen PCR

Nguyên lý:

Kỹ thuật PCR sử dụng enzyme ADN polimeraza tổng hợp nên các phân tử ADN mới trong môi trường có 4 loại deoxyribonucleotides (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) và hai môi trên cơ sở khuôn mẫu ADN nhất định đã biết hoặc chưa biết trình tự. Các đoạn ADN mới hình thành lại được sử dụng làm khuôn mẫu. Sau nhiều chu kỳ, số lượng đoạn ADN nói trên được nhân lên gấp nhiều lần, nhờ vậy có thể đủ số lượng để tách ra, phân tích hoặc tạo dòng...

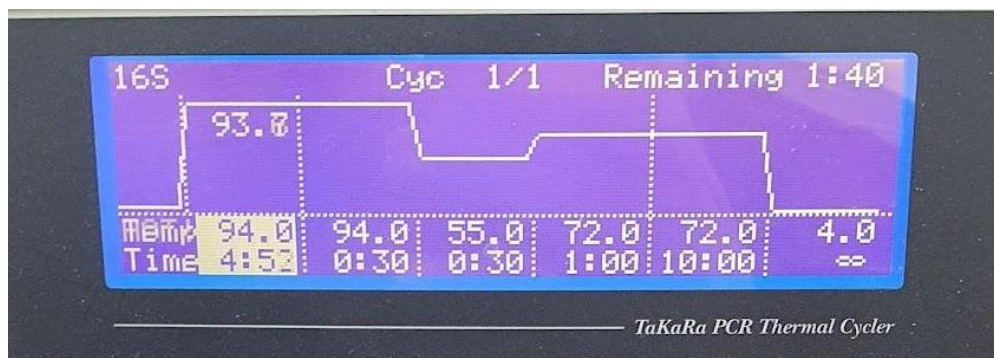
Các bước thực hiện:

Thành phần phản ứng gồm:

ADN khuôn	: 1 µl
Môi xuôi (10 µM)	: 1,0 µl
Môi ngược (10 µM)	: 1,0 µl
DMSO	: 1,0 µl
2X Master Mix (PROMEGA)	: 10,0 µl
H ₂ O deion	: 6 µl
Tổng phản ứng	: 20,0 µl

Xạ khuẩn sau khi nuôi cấy được ly tâm ở 4000rpm ở 4°C trong 10 phút để thu tế bào. DNA tổng số của xạ khuẩn được tách theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001). Phản ứng được thực hiện với chu trình nhiệt là: 94°C: 5 phút, 25 chu

kỳ (94°C: 30s, 55°C: 30s, 72°C: 60s), 72°C: 10 phút và mẫu được giữ ở 4°C. Mỗi chu kỳ gồm ba giai đoạn khác nhau:



Hình 2.1 Chu trình PCR

- Giai đoạn biến tính ở 90 ÷ 95°C: Bước đầu tiên trong hệ thống nhân bội PCR là làm biến tính mẫu ADN bằng cách tăng nhiệt độ trong phản ứng lên 95°C. Ngoài ADN nguồn ra, trong ống nghiệm còn chứa một lượng dư thừa hai môi oligonucleotide, một ADN polimeraza bền nhiệt (ví dụ, Taq ADN polymerase tách chiết từ vi khuẩn *Thermus aquaticus*), và bốn deoxyribonucleotide. Nhiệt độ được giữ khoảng 1 phút.

- Giai đoạn gắn môi ở 45 ÷ 65°C: Ở giai đoạn này, nhiệt độ của hỗn hợp được làm nguội dần xuống ~55°C. Trong giai đoạn này, các môi bắt cặp với các trình tự bổ sung trong ADN nguồn.

- Giai đoạn kéo dài ở nhiệt độ 70 ÷ 75°C: Giai đoạn này, nhiệt độ được tăng lên ~75°C, đây là nhiệt độ tối ưu cho chức năng xúc tác của Taq ADN polimeraza, tiến hành tổng hợp theo chiều 5' – 3' bổ sung các dNTPs tạo mạch ADN mới.

Sản phẩm của phản ứng sẽ được kiểm tra bằng chạy điện di trên gel agarose 1%. Kích thước đoạn DNA thu được sau khi khuếch đại được so sánh trên thang DNA chuẩn.

2.2.10. Phương pháp định danh chủng xạ khuẩn bằng đoạn gen 16S rDNA

Sau khi tách DNA tổng số của chủng xạ khuẩn, tiến hành khuếch đại gen 16S rDNA bằng phương pháp PCR với cặp môi đặc trưng 27F - (5'-

AGAGTTTGATCMTGCCTCAG-3') và 1492R - (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Sản phẩm PCR sau đó được giải trình tự bằng phương pháp Sanger.

Đoạn trình tự gen sau đó được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank bằng công cụ BLAST SEARCH trên trang web của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Từ bảng mô tả mối quan hệ giữa các loài trên BLAST, copy khoảng 20 trình tự FASTA của 20 loài có quan hệ gần nhất và lưu dưới định dạng file .text. Sau đó sắp xếp trình tự nucleotide trên phần mềm Bioedit và kết quả được lưu dưới dạng file .fsa.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng file .fsa trên phần mềm Mega-X.

2.2.11. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học

Đặc điểm hình thái:

Màu sắc khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn khi nuôi trên các môi trường từ ISP 1 đến ISP 7 thường khác nhau, đây là yếu tố đầu tiên để phân loại xạ khuẩn theo Chương trình xạ khuẩn quốc tế (ISP, 1974). Khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất của chủng xạ khuẩn so với bảng màu Trerner và Buckus (Tresner, 1963): màu sắc khuẩn ty khí sinh của chủng xạ khuẩn được chia thành 8 nhóm màu: nhóm màu trắng (White), nhóm màu xám (Grey), nhóm màu đỏ (Red), nhóm màu vàng (Yellow), nhóm màu xanh lục (Green), nhóm màu xanh da trời (Blue), nhóm màu tím (Violet) và nhóm màu không xác định (X). Cùng với màu sắc của khuẩn lạc thì khả năng sinh tắc tổ tan và sự hình thành sắc tố melanin cũng là một trong những tiêu chuẩn cơ bản để phân biệt các chủng xạ khuẩn [31, 32, 33]

Ngoài ra, các mẫu còn được nhuộm Gram bằng phương pháp Hucker cải tiến và soi dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 1000X

Đặc điểm sinh lý:

Quan sát khả năng đồng hóa nguồn carbon và nitrogen của xạ khuẩn lần lượt trên môi trường ISP9 có bổ sung 1% các nguồn carbon và 1% nguồn nitrogen tương ứng (Shirling and Gottlieb, 1966; Stanley and Holt, 1989). Nuôi ở 28°C sau 5-7 ngày tiến hành đánh giá khả năng đồng hóa các nguồn carbon và nitrogen [32, 33].

2.2.12. Phương pháp tạo chế phẩm phân bón vi sinh

Phương pháp tạo chế phẩm phân bón vi sinh từ xạ khuẩn bao gồm nuôi cấy lỏng quy mô lớn, trộn chất nền và sấy khô để đạt mật độ 10^8 - 10^9 CFU/g, phù hợp ứng dụng cho cây trồng.

Nuôi cấy nhân giống và lên men

Nhân giống: Cấy xạ khuẩn tuyển chọn vào môi trường lỏng ISP2 hoặc R2YE, 28°C, 200 rpm, 48-72.

Lên men chính: Chuyển 5-10% giống vào thiết bị lên men 10 L (môi trường R2YE), 28°C, 96-120 giờ, đạt 10^9 - 10^{10} CFU/mL. Kiểm soát pH 6,8-7,2.

Trộn chất nền và tạo hạt

Ly tâm dịch lên men (8.000 rpm, 15 phút), cô đặc sinh khối ướt.

Trộn tỷ lệ 1:1-1:2 với chất nền: bột talc + gum arabic 10%, CaCO_3 5-10% (điều chỉnh pH), mật đường 2% (nguồn C), đất sét bentonite 20-30% (chất kết dính). Khuấy trộn tạo hạt ẩm đường kính 2-4 mm.

Sấy khô và kiểm tra chất lượng

Sấy khô tầng sôi 40-45°C, 2-4 giờ hoặc **sấy phun 60-80°C** đạt độ ẩm <10%. Mật độ vi khuẩn $\geq 10^8$ CFU/g, sống sót >80% sau 6 tháng 28°C.

Kiểm nghiệm: Đếm CFU trên thạch R2YE/ISP2, hoạt tính IAA/ siderophore/ phosphate/ kháng nấm/ cellulase, tạp nhiễm < 10^5 CFU/g

PHẦN III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập chủng xạ khuẩn từ mẫu đất Cao Bằng

Từ các mẫu đất được thu thập ở vườn quốc gia Phia Oắc – Phia Đén, Cao Bằng, Việt Nam ở độ sâu 10-15 cm dưới bề mặt từ nhiều khu vực khác nhau trong rừng. Các mẫu được đặt trong túi polyethylene vô trùng, đóng chặt và bảo quản ở 4°C cho đến khi cần dùng.



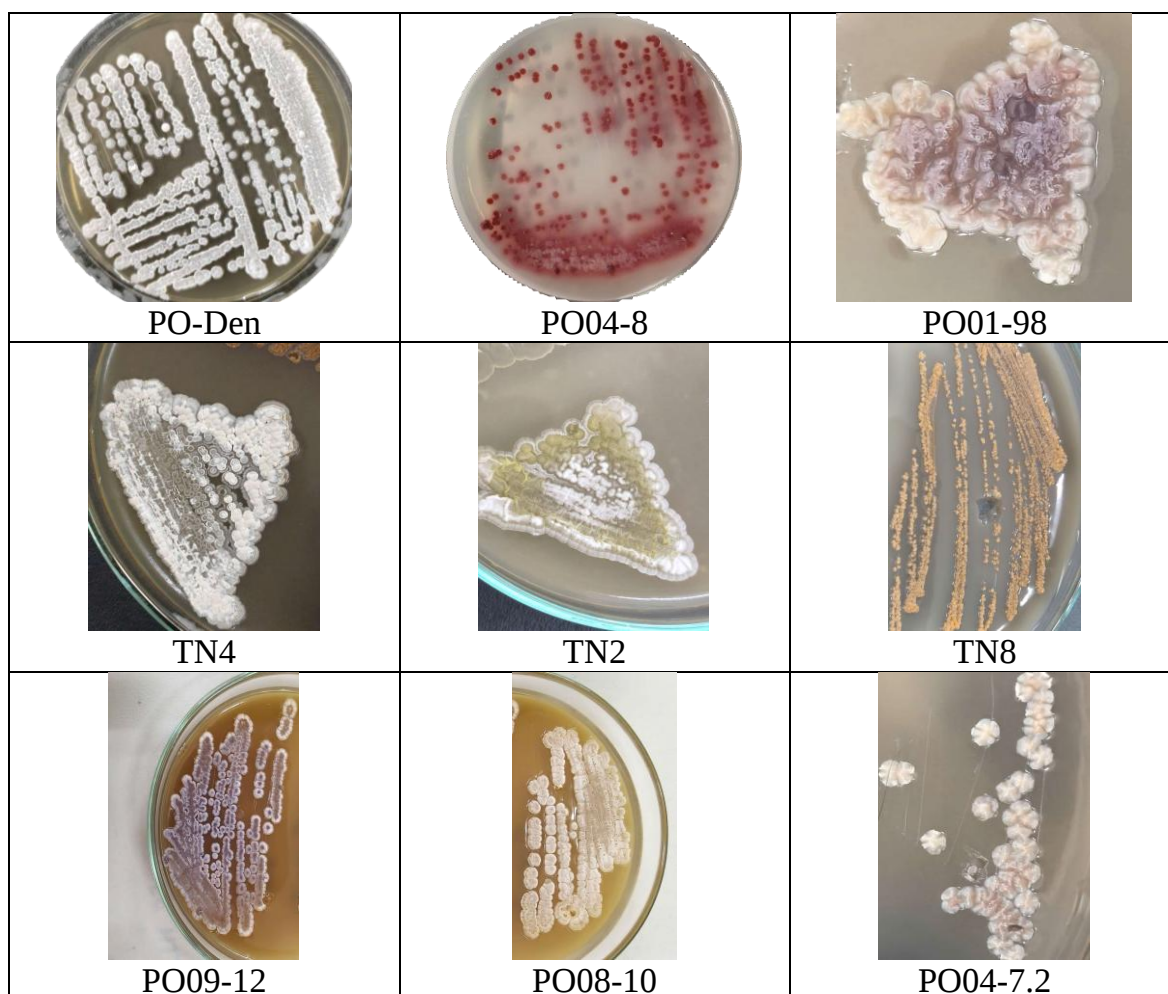
Hình 3. 1 Các mẫu đất từ rừng Phia Oắc – Phia Đén

Cân 10g đất mỗi mẫu và nghiền nhỏ trong cối chày sứ (đã khử trùng). Sau đó hòa tan trong 90 ml nước muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl), lắc trên máy lắc 150 vòng/phút trong 10 - 20 phút, để lắng 15 phút rồi dùng pipet hút 1 ml dung dịch sang ống nghiệm có 9 ml nước muối sinh lý mới. Mẫu pha loãng được cấy trang trên môi trường BFM1, ISP2, SC-CW, Starch casein. Nuôi ở 28°C, trong thời gian 14 ngày. Quan sát sự phát triển của khuẩn lạc từng ngày để chọn lọc.



Hình 3. 2 Đĩa phân lập một số mẫu đất từ rừng Phia Oắc-Phia Đén

Các chủng phân lập được đem đi quan sát hình thái khuẩn lạc, màu sắc khuẩn ty. Kết quả phân lập được 48 chủng xạ khuẩn từ các mẫu đất tại rừng Phia Oắc – Phia Đén.



Hình 3. 3 Hình ảnh khuẩn lạc của một số chủng xạ khuẩn phân lập được

Bảng 3. 1 Đặc điểm hình thái của 48 chủng xạ khuẩn trên môi trường ISP2

STT	Chủng	Đặc điểm hình thái
1	TN1	Khuẩn lạc tròn màu xám đen, bề mặt phẳng, kích thước từ 1- 2mm
2	TN2	Khuẩn lạc tròn màu vàng xám , bề mặt phẳng, kích thước từ 2-3mm
3	TN3.1	Khuẩn lạc nhẵn màu xám , bề mặt nhẵn, có bào tử màu xanh xám, kích thước từ 1-2mm
4	TN3.2	Khuẩn lạc nhẵn màu cam, bề mặt nhẵn, kích thước từ 1-2mm
5	TN3.3	Khuẩn lạc dẹt màu trắng đục, bề mặt có nhân giữa, kích thước từ 1-2mm
6	TN4	Khuẩn lạc lan mỏng, bề mặt mịn, , màu trắng trong, kích thước 3-4mm.
7	TN5	Khuẩn lạc dạng cụm tròn, hơi lõm xuống ở giữa, bề mặt nhẵn nhẹ, màu vàng nâu, kích thước 2–4 mm.
8	TN6	Khuẩn lạc tròn , bề mặt phẳng, màu trắng, kích thước lớn (3- 5 mm).
9	TN7.1	Khuẩn lạc nhẵn, màu trắng xám, kích thước 4–6 mm.
10	TN7.2	Khuẩn lạc dạng tròn, không lõm, phẳng, bề mặt trơn, màu trắng vàng, kích thước 2–4 mm.
11	TN8	Khuẩn lạc màu cam, bề mặt nhẵn, có bào tử màu đen, kích thước từ 2-3mm
12	TN9.1	Khuẩn lạc lõm, bề mặt gồ ghề, màu tím nhạt đặc trưng, kích thước 3–5 mm.
13	TN9.2	Khuẩn lạc lan mỏng, bề mặt mịn, màu xanh lá, kích thước 4- 6mm nhưng mỏng.
14	TN10	Khuẩn lạc tròn , mỏng, bề mặt mịn, màu xanh lá, khó kích thước từ 1-3mm.
15	TN11	Khuẩn lạc tròn nhẵn, màu tím hồng, kích thước từ 4-6mm
16	TN12	Khuẩn lạc nhẵn màu trắng trong, bề mặt nhẵn, kích thước từ 2-3mm
17	TN13	Khuẩn lạc nhẵn màu xám trong, rìa màu trắng, bề mặt nhẵn, kích thước từ 2-3mm
18	TN14	Khuẩn lạc tròn màu nâu rìa màu trong, bề mặt nhẵn, kích thước từ 1-2mm
19	TN15	Khuẩn lạc hình tròn màu trắng, bề mặt lõm ở giữa, rìa tròn đều, có bào tử màu xám, kích thước 3–5 mm
20	TN16	Khuẩn lạc hình tròn màu nâu đen, bề mặt có bào tử lõm, rìa nhẵn không đều, kích thước 2–3 mm
21	TN17	Khuẩn lạc hình tròn, màu trắng ngà, bề mặt nhẵn, rìa gợn sóng, kích thước 3–5 mm
22	TN18	Khuẩn lạc nhẵn màu nâu trắng, bề mặt nhẵn, kích thước từ 1-3mm
23	TN19	Khuẩn lạc hình tròn, màu trắng ngà, bề mặt nhẵn, rìa gợn sóng, kích thước 3–5 mm
24	TN20	Khuẩn lạc tròn, màu vàng, bề mặt lõm, rìa đều, trơn, kích thước 2–3 mm
25	TN21	Khuẩn lạc hình tròn, màu xanh lam nhạt, bề mặt lõm cao, rìa trơn, kích thước 1–2 mm
26	TN22	Khuẩn lạc hình tròn, màu nâu nhạt, bề mặt khô, rìa nhẵn, kích thước 3–4 mm

27	TN23	Khuẩn lạc hình tròn, màu xanh lục nhạt, bề mặt nhẵn bóng, rìa đều, kích thước 1–2 mm
28	TN24	Khuẩn lạc hình tròn, màu tím nhạt, bề mặt lồi, rìa gọn sóng, kích thước 2–4 mm
29	TN25	Khuẩn lạc hình tròn, màu vàng cam, bề mặt lồi bóng, rìa trơn, kích thước 1–2 mm
30	TN26	Khuẩn lạc hình ovan, màu nâu đậm, bề mặt nhẵn, rìa gấp khúc, kích thước 2–3 mm
31	PO11-3	Khuẩn lạc hình tròn nhẵn, màu xám đậm, bề mặt nhẵn, rìa gấp khúc, kích thước 2–3 mm
32	PO04-8	Khuẩn lạc tròn màu hồng đậm, rìa ngoài màu trắng, bào tử màu trắng nhô lên trên bề mặt thạch, kích thước từ 3-4mm
33	PO04-9	Khuẩn lạc hình bông hoa màu đỏ, rìa ngoài màu trắng, bào tử màu trắng nhô lên bề mặt thạch, kích thước 3-4mm
34	PO04-72	Khuẩn lạc màu hồng trắng, hình bông hoa, bề mặt lồi, kích thước từ 3-5mm
35	PO08-10	Khuẩn lạc tròn lõm ở giữa màu vàng, bào tử màu trắng nổi hẳn lên trên bề mặt thạch, kích thước từ 4-6mm
36	PO-Nau	Khuẩn lạc tròn ở giữa màu nâu đục, bào tử màu đen nổi hẳn lên trên bề mặt thạch, kích thước từ 4-6mm
37	PO-Den	Khuẩn lạc tròn nhẵn, màu nâu đen, hình tròn, bề mặt nhẵn, bào tử màu trắng, kích thước từ 5-7mm
38	PO02-1	Khuẩn lạc màu xanh trắng hình tròn, có rìa gọn sóng, kích thước từ 5-7mm
39	PO05- 121	Khuẩn lạc màu tím trắng hình tròn, có rìa gọn sóng, kích thước từ 2-4mm
40	PO09-12	Khuẩn lạc tròn nhẵn, màu tím, bề mặt nhẵn, kích thước 4- 6mm
41	PO03-126	Khuẩn lạc màu vàng trắng hình bông hoa, có rìa gọn sóng, kích thước từ 3-5mm
42	PO04- 59	Khuẩn lạc màu trắng sáng hình tròn, bề mặt lồi, bào tử trắng, kích thước từ 3-5mm
43	PO06-32	Khuẩn lạc tròn màu nâu đen, bào tử màu trắng nổi lên trên bề mặt thạch, kích thước từ 3-5mm
44	PO01- 96	Khuẩn lạc màu đỏ hồng ở giữa nhô lên, bề mặt nhẵn, bào tử màu trắng, kích thước từ 5-7mm
45	PO02- 83	Khuẩn lạc màu hồng nhạt ở giữa nhô lên, bề mặt nhẵn, bào tử màu hồng, kích thước từ 6-7mm
46	PO05-62	Khuẩn lạc màu vàng ở giữa nhô lên, bề mặt nhẵn, bào tử màu trắng, kích thước từ 4-6mm
47	PO04 - 55	Khuẩn lạc màu trắng nhạt ở giữa lõm, bề mặt lồi, bào tử màu xám, kích thước từ 6-7mm
48	PO04 - 58	Khuẩn lạc tròn màu be đục ở giữa lõm, bề mặt nhẵn, bào tử màu vàng, kích thước từ 3-5mm

3.2. Sàng lọc chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm, có hoạt tính sinh học tốt

3.2.1. Hoạt tính kháng nấm của các chủng

Trong nghiên cứu này, hai chủng nấm *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani* được lựa chọn làm đối tượng kiểm định hoạt tính đối kháng vì đây là hai trong số các tác nhân gây bệnh có nguồn gốc từ đất (soil-borne pathogens) nguy hiểm và phổ biến nhất đối với cây trồng nông nghiệp.

- ***Fusarium oxysporum***: Là tác nhân chính gây ra bệnh héo rũ (*Fusarium wilt*) và thối rễ trên nhiều loại cây trồng có giá trị kinh tế cao (như cà chua, chuối, dưa lưới). Loài nấm này có khả năng xâm nhập vào hệ thống mạch dẫn của cây, làm tắc nghẽn quá trình vận chuyển nước và dinh dưỡng, dẫn đến cây héo và chết nhanh chóng.
- ***Rhizoctonia solani***: Gây ra bệnh lở cổ rễ, thối gốc ở giai đoạn cây con. Chúng tấn công trực tiếp vào phần rễ và cổ rễ giáp mặt đất, làm hoại tử mô cây.

Việc định hướng phát triển chế phẩm phân bón vi sinh không chỉ nhằm cung cấp dinh dưỡng mà còn hướng tới mục tiêu kiểm soát sinh học (Biocontrol). Một chế phẩm phân bón vi sinh lý tưởng cần được bón trực tiếp vào vùng rễ. Do đó, nếu chủng xạ khuẩn tuyển chọn có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của *F. oxysporum* và *R. solani*, chúng sẽ tạo ra một "hàng rào sinh học" bảo vệ bộ rễ non yếu của cây trồng khỏi các mầm bệnh trong đất, từ đó giúp cây phát triển khỏe mạnh và tăng năng suất. Do đó tôi lựa chọn hoạt tính kháng nấm là điều kiện đầu tiên để sàng lọc chủng xạ khuẩn mong muốn.

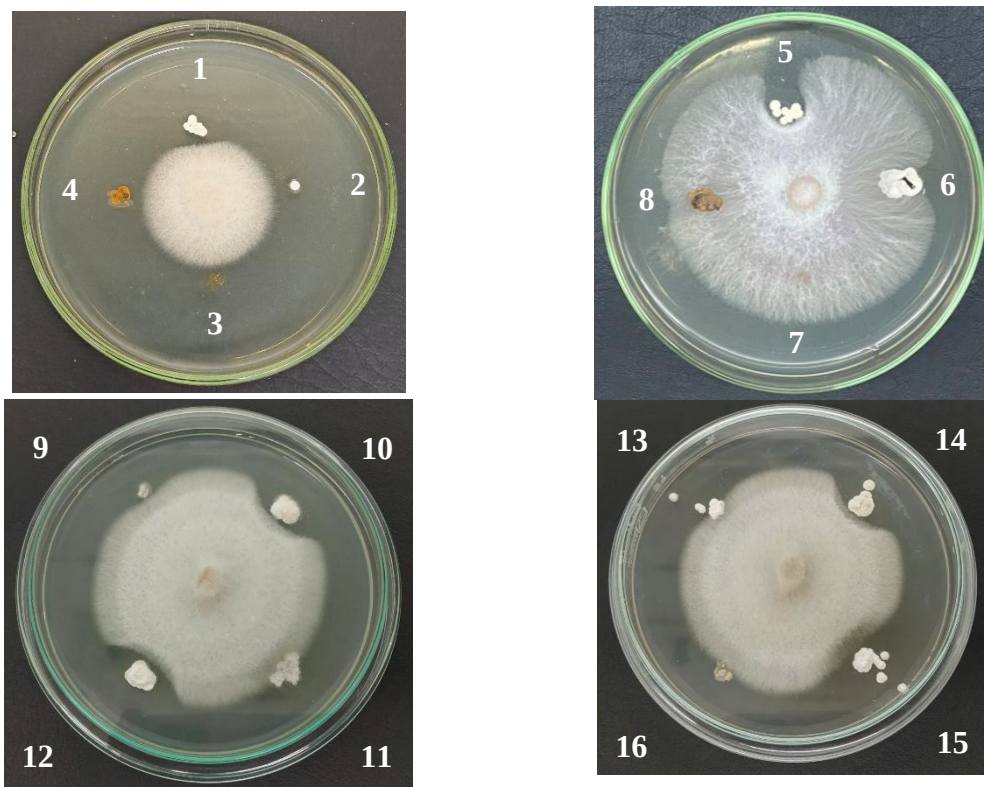
48 chủng đã phân lập được nuôi trong môi trường ISP2 lỏng ở 28°C, 150 rpm trong 7 ngày. Dịch nuôi cấy được dùng để thử hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp đục lỗ thạch, kết quả thể hiện ở Bảng 3.2 và phương pháp cấy chấm điểm (Hình 3.4)

Bảng 3. 2 Hoạt tính kháng nấm của 48 chủng xạ khuẩn phân lập được

STT	Chủng	Chủng nấm	
		<i>Fusarium oxysporum</i> (D-mm)	<i>Rhizoctonia solani</i> (D-mm)
1	TN1	-	-
2	TN2	12,5 ± 0,4	10,2 ± 0,3

3	TN3.1	-	-
4	TN3.2	-	-
5	TN3.3	-	-
6	TN4	$19,2 \pm 0,6$	$16,5 \pm 0,5$
7	TN5	$8,5 \pm 0,2$	-
8	TN6	-	-
9	TN7.1	-	-
10	TN7.2	$10,0 \pm 0,3$	$8,0 \pm 0,2$
11	TN8	-	-
12	TN9.1	-	-
13	TN9.2	-	-
14	TN10	$16,5 \pm 0,5$	$14,1 \pm 0,4$
15	TN11	-	-
16	TN12	$9,5 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,2$
17	TN13	-	-
18	TN14	-	-
19	TN15	$11,2 \pm 0,4$	$9,5 \pm 0,3$
20	TN16	-	-
21	TN17	-	-
22	TN18	-	-
23	TN19	-	-
24	TN20	$13,0 \pm 0,5$	$11,5 \pm 0,4$
25	TN21	-	-
26	TN22	-	-
27	TN23	-	-
28	TN24	-	-
29	TN25	$9,0 \pm 0,3$	$8,5 \pm 0,2$
30	TN26	-	-
31	PO11-3	-	-
32	PO04-8	$17,8 \pm 0,7$	$15,2 \pm 0,5$
33	PO04-9	$12,0 \pm 0,4$	$10,5 \pm 0,3$
34	PO04-72	-	-
35	PO08-10	$9,5 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$
36	PO-Nau	-	-
37	PO-Den	$11,5 \pm 0,4$	$9,0 \pm 0,3$
38	PO02-1	-	-
39	PO05- 121	$14,5 \pm 0,5$	$12,0 \pm 0,4$
40	PO09-12	-	-
41	PO03-126	-	-
42	PO04- 59	-	-
43	PO06-32	-	-
44	PO01- 96	-	-
45	PO02- 83	-	-
46	PO05-62	$17,0 \pm 0,6$	$13,5 \pm 0,4$
47	PO04 - 55	-	-

48	PO04 - 58	-	-
----	-----------	---	---



Hình 3. 4. Hoạt tính kháng nấm của một số chủng

Kết quả xác định khả năng kháng nấm của các chủng xạ khuẩn phân lập được thể hiện ở Bảng 3.2 cho thấy sự phân hóa rõ rệt về hoạt tính sinh học. Trong tổng số 48 chủng khảo sát, chỉ có 15 chủng (chiếm tỷ lệ 31,25%) thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Fusarium oxysporum* hoặc *Rhizoctonia solani*. Điều này phản ánh đúng đặc tính phân bố ngẫu nhiên của các chủng vi sinh vật có lợi trong môi trường đất tự nhiên.

Đáng chú ý, kết quả ghi nhận một số chủng có hoạt tính đối kháng kháng nấm vượt trội và ổn định, bao gồm các chủng: TN4, PO04-8, PO05-62 và TN10.

- Trong đó, chủng TN4 cho hoạt tính cao nhất với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,2 mm đối với *F. oxysporum* và 16,5 mm đối với *R. solani*.
- Tiếp đó là chủng PO04-8 với đường kính vòng ức chế lần lượt đạt 17,8 mm và 15,2 mm.

- Các chủng còn lại đa phần cho vòng kháng nấm ở mức độ trung bình hoặc yếu (dao động từ 7,5 mm đến 14,5 mm). Đặc biệt, hầu hết các chủng có khả năng kháng *R. solani* đều thể hiện khả năng kháng *F. oxysporum*, chứng tỏ tính phổ rộng trong cơ chế đối kháng của các chủng này.

Sự xuất hiện của các vòng kháng nấm rõ nét cho thấy các chủng xạ khuẩn tuyển chọn có khả năng tiết ra các hợp chất ức chế ngoại bào mạnh mẽ. Theo các nghiên cứu trước đây (Elmutasim et al., 2022), khả năng đối kháng nấm của nhóm xạ khuẩn thường xuất phát từ việc chúng sản sinh ra các enzyme thủy phân vách tế bào nấm như chitinase, glucanase, hoặc sinh tổng hợp các chất kháng sinh thứ cấp có trọng lượng phân tử thấp, dễ dàng khuếch tán vào môi trường thạch.

Hoạt tính đối kháng mạnh mẽ của các chủng như TN4 và PO04-8 đối với cả hai loại nấm bệnh gốc rễ nguy hiểm chứng minh tiềm năng ứng dụng rất lớn của chúng trong việc kiểm soát sinh học (Biocontrol). Từ kết quả này, 15 chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm sẽ tiếp tục được lựa chọn làm nguồn vật liệu đầu vào để đánh giá khả năng sinh tổng hợp phytohormone Indole-3-Acetic Acid (IAA) ở bước nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Khả năng sinh tổng hợp phytohormone Indole-3-Acetic Acid (IAA)

Khả năng sinh tổng hợp hormon kích thích sinh trưởng thực vật IAA là một trong những đặc tính quan trọng khi tuyển chọn các chủng vi sinh vật để ứng dụng trong tạo chế phẩm phân vi sinh..

Thí nghiệm được tiến hành trên 15 chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng nấm. Hàm lượng IAA sinh ra trong môi trường lỏng bổ sung L-tryptophan được định lượng bằng thuốc thử Salkowski ở bước sóng 530 nm (Bảng 3.3).

Bảng 3. 3 Khả năng sinh tổng hợp IAA của 15 chủng xạ khuẩn

STT	Chủng	Nồng độ IAA ($\mu\text{g/mL}$)
1	TN2	$15,5 \pm 0,7$
2	TN4	$45,2 \pm 1,5$
3	TN5	$7,5 \pm 0,2$
4	TN7.2	$18,1 \pm 0,8$
5	TN10	$32,8 \pm 1,2$

6	TN12	10,6 ± 0,4
7	TN15	25,4 ± 1,1
8	TN20	20,5 ± 1,0
9	PO04-8	38,6 ± 1,8
10	PO04-9	22,0 ± 0,9
11	PO08-10	12,2 ± 0,5
12	PO-Den	14,8 ± 0,6
13	PO05-121	28,5 ± 1,5
14	PO05-62	35,2 ± 1,4
15	TN25	9,8 ± 0,3

Kết quả cho thấy 100% các chủng đều có khả năng chuyển hóa L-tryptophan thành IAA, dao động từ 7,5 đến 45,2 µg/mL. Các chủng TN4 (45,2 µg/mL) sinh tổng hợp IAA với hàm lượng cao nhất, tiếp theo là các chủng PO04-8 (38,6 µg/mL) và PO05-62 (35,2 µg/mL). Việc tiết ra lượng lớn phytohormone IAA giúp kích thích sự phân chia tế bào, thúc đẩy hệ rễ cây trồng vươn dài và phân nhánh, tạo tiền đề để cây hấp thụ dinh dưỡng tốt hơn.

3.2.3. Khả năng sinh siderophore của các chủng

Sắt là một nguyên tố vi lượng thiết yếu cho sự phát triển của vi sinh vật và thực vật, nhưng thường tồn tại trong đất dưới dạng các hợp chất không hòa tan mà sinh vật khó hấp thu. Việc tiết ra siderophore - các phân tử hữu cơ khối lượng phân tử thấp có ái lực rất cao với ion sắt (Fe^{3+}) - là một cơ chế quan trọng giúp xạ khuẩn cạnh tranh dinh dưỡng và đối kháng với nấm bệnh thực vật.

Thí nghiệm được thực hiện bằng cách cấy chấm điểm 15 chủng xạ khuẩn lên môi trường đồ thạch CAS (Chrome Azurol S) chỉ thị màu xanh lam đặc trưng, nuôi ẩm ở 28°C trong 4 ngày. Khi Siderophore được tiết ra, chúng sẽ giành lấy ion sắt từ phức hệ CAS, làm đổi màu thạch xung quanh khuẩn lạc từ xanh lam sang vàng cam. Đường kính vòng halo đổi màu (mm) được đo đạc chính xác và thể hiện ở Bảng 3.4.

Bảng 3. 4 Đường kính vòng đổi màu tạo phức hệ Siderophore trên môi trường thạch CAS

STT	Chủng	Kích thước vòng halo (mm)
1	TN2	-
2	TN4	22,5 ± 0,6

3	TN5	10,5 ± 0,3
4	TN7.2	-
5	TN10	15,4 ± 0,5
6	TN12	-
7	TN15	11,0 ± 0,4
8	TN20	-
9	PO04-8	18,5 ± 0,5
10	PO04-9	-
11	PO08-10	-
12	PO-Den	12,0 ± 0,4
13	PO05-121	14,5 ± 0,5
14	PO05-62	20,2 ± 0,8
15	TN25	9,5 ± 0,2

(Ghi chú: "-" là không tạo vòng halo hoặc vòng halo < 5mm)

Kết quả cho thấy, có p Trong đó, TN4 và PO05-62 tạo vòng halo lớn nhất (lần lượt là 22,5 mm và 20,2 mm). Khả năng này chứng minh cơ chế đối kháng nấm của TN4 và PO05-62 không chỉ nhờ tiết kháng sinh mà còn nhờ cơ chế cạnh tranh dinh dưỡng (sắt) với tác nhân gây bệnh.

3.2.4. Khả năng phân giải cellulose của các chủng

Cellulose là thành phần chính của vách tế bào thực vật và là nguồn phế phụ phẩm hữu cơ dồi dào nhất trong tự nhiên. Khả năng phân giải cellulose thông qua việc tiết hệ enzyme cellulase ngoại bào là một đặc tính quý giá của xạ khuẩn, giúp xúc tiến quá trình mùn hóa, cải tạo độ phì nhiêu cho đất và phân hủy rác thải nông nghiệp.

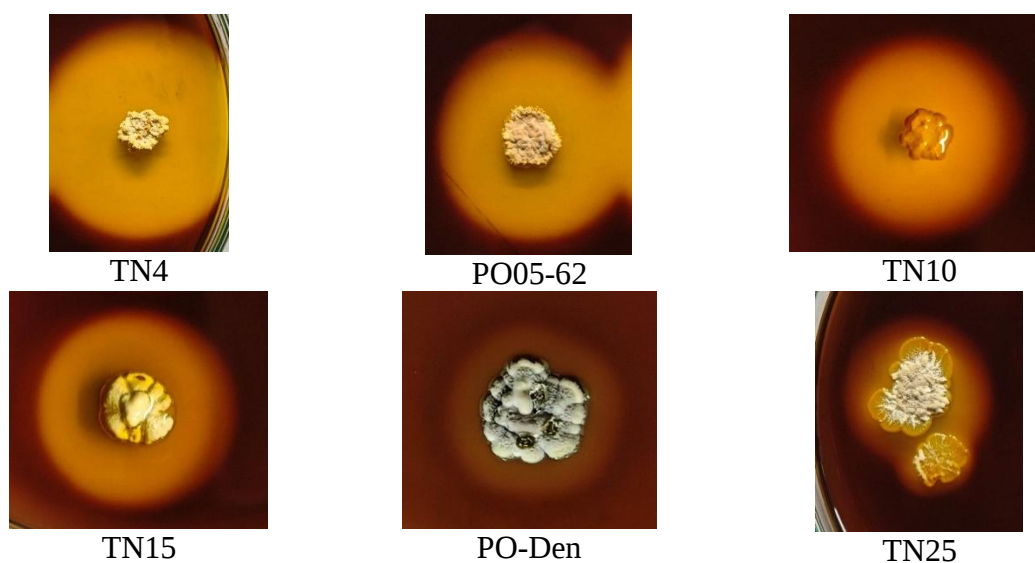
9 chủng đã tuyển chọn được xác định khả năng phân giải cellulose bằng phương pháp cấy chấm điểm trên môi trường CMC, nuôi 4 ngày ở 28°C, nhuộm bằng dung dịch lugon. Kết quả được thể hiện trên Bảng 3.5

Bảng 3. 5 Đường kính vòng phân giải cellulose của các chủng xạ khuẩn

STT	Chủng	Đường kính vòng halo (mm)
1	TN4	25,4 ± 0,8
2	TN5	12,5 ± 0,4
3	TN10	21,5 ± 0,7

4	TN15	$20,5 \pm 0,5$
5	PO04-8	$19,0 \pm 0,6$
6	PO-Den	$14,0 \pm 0,5$
7	PO05-121	$18,5 \pm 0,6$
8	PO05-62	$23,1 \pm 0,5$
9	TN25	$11,5 \pm 0,3$

Dựa trên số liệu ở Bảng 3.5 (và Hình 3.5), cả 9 chủng khảo sát đều thể hiện vòng phân giải cơ chất vô cùng rõ rệt. Chủng xạ khuẩn **TN4** tiếp tục thể hiện hoạt tính dẫn đầu vượt bậc với đường kính vòng thủy phân cơ chất cellulose đạt tới 25,4 mm, **bám đuôi sát sau** là chủng **PO05-62** với 23,1 mm và chủng **TN10** với 21,5 mm. Kết quả này khẳng định hệ enzyme cellulase nội sinh được bài tiết tốt ra bên ngoài môi trường.



Hình 3. 5 Hình ảnh vòng phân giải cellulose của một số chủng xạ khuẩn

3.2.5. Khả năng hòa tan phosphate của các chủng

Phosphorus (Lân) là một nguyên tố đại lượng thiết yếu cho sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Trong môi trường tự nhiên, mặc dù lượng lân tổng số trong đất khá dồi dào, phần lớn chúng lại bị cố định dưới dạng các hợp chất vô cơ khó tan như tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ở đất trung tính/kiềm, hoặc aluminum phosphate (AlPO_4), sắt phosphate (FePO_4) ở đất chua. Khả năng chuyển hóa các hợp chất lân khó tan này thành dạng ion hòa tan (chủ yếu là H_2PO_4^- và HPO_4^{2-}) để cây

trồng dễ dàng hấp thu là một trong những tiêu chí quan trọng nhất khi tuyển chọn vi sinh vật vùng rễ.

Do đó, khả năng sinh tổng hợp các acid hữu cơ ngoại bào (như gluconic acid, citric acid) giúp hòa tan lân vô cơ kết tủa thành dạng ion tự do (H_2PO_4^- và HPO_4^{2-}) là một đặc tính quan trọng của vi sinh vật phân giải lân. Tiến hành cấy chấm điểm 9 chủng xạ khuẩn đã qua sàng lọc lên môi trường đặc chủng Pikovskaya (chứa cơ chất khó tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ tạo độ đục sữa toàn đĩa). Khi chủng hòa tan được lân, đĩa thạch xung quanh khuẩn lạc sẽ bị phân giải và chuyển biến thành vòng halo trong suốt. Kết quả đo đạc được thu thập tại Bảng 3.6.

Bảng 3. 6 Khả năng hòa tan tricalcium phosphate của các chủng xạ khuẩn trên môi trường Pikovskaya

STT	Chủng	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Kích thước vòng halo (mm)
1	TN4	6	$26,5 \pm 0,6$
2	TN5	4	-
3	TN10	5,5	$15,2 \pm 0,4$
4	TN15	5	$24,0 \pm 0,5$
5	PO04-8	6	$14,2 \pm 0,4$
6	PO-Den	4,5	-
7	PO05-121	5	$12,5 \pm 0,3$
8	PO05-62	6,5	$20,5 \pm 0,5$
9	TN25	4	-



Hình 3. 6 Hình ảnh đĩa thạch Pikovskaya thể hiện vòng halo phân giải lân của các chủng xạ khuẩn

Số liệu ở Bảng 3.6 phản ánh rõ rệt sự phân hóa về khả năng tiết acid hữu cơ của các chủng. Mặc dù cả 9 chủng đều sinh trưởng sinh tốt trên môi trường

Pikovskaya, song chỉ có 6/9 chủng khảo sát cho thấy khả năng tạo vòng halo trong suốt. Trong đó, chủng **TN4** (đường kính vòng giải lân lên tới 26,5 mm) thể hiện khả năng phân giải lân tốt nhất, tiếp theo là chủng **TN15** (vòng halo đạt 24,0 mm) và chủng **PO05-62** (đạt 20,5 mm). Kích thước vòng halo lớn và lớp thạch trong suốt hoàn toàn minh chứng cho lượng acid hữu cơ ngoại bào do các chủng này tiết ra rất dồi dào, có khả năng cắt đứt nhanh chóng các liên kết vô cơ bền vững của phức hệ lân khó tiêu.

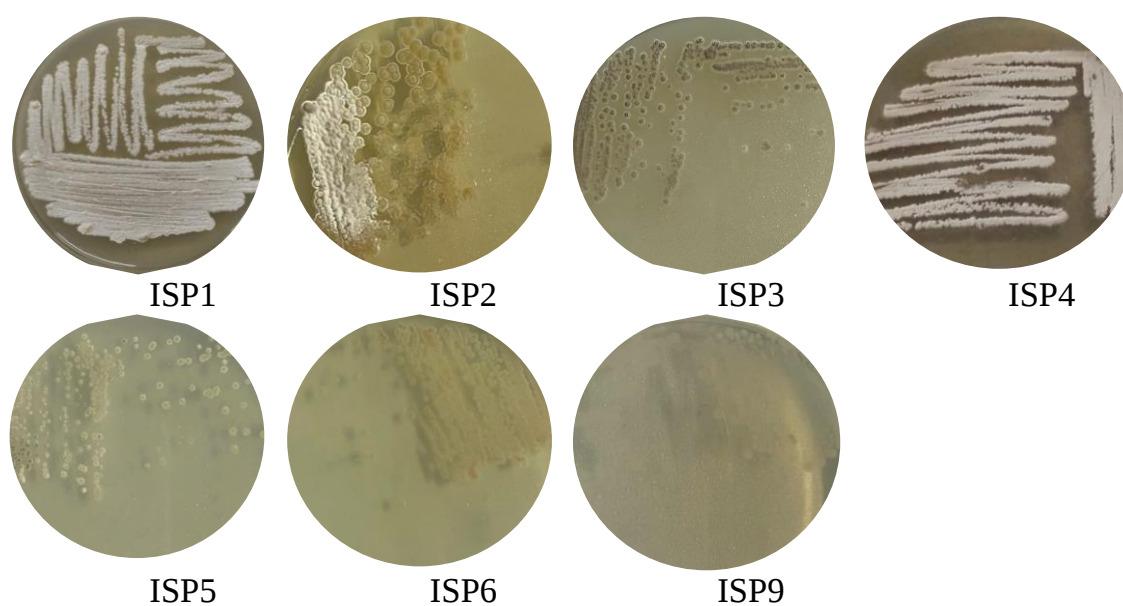
Qua các thí nghiệm sàng lọc các đặc tính sinh học quý báu, nghiên cứu nhận định chủng xạ khuẩn **TN4** là chủng thể hiện các hoạt tính sinh học tốt nhất: năng lực kháng nấm bệnh ngoại bào mạnh mẽ nhất (ức chế cả *F. oxysporum* và *R. solani*), sinh tổng hợp hàm lượng phytohormone kích thích rễ IAA cao nhất (45,2 µg/mL), đồng thời sinh tổng hợp Siderophore cao nhất (22,5 mm) và phân giải hữu cơ cellulose tốt nhất (25,4 mm). Do đó, chủng xạ khuẩn **TN4** được lựa chọn làm chủng đích để tiến hành đi sâu nghiên cứu chi tiết đặc điểm sinh lý sinh hóa và định danh phân loại phục vụ ứng dụng thực tiễn.

3.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn TN4

3.3.1. Đặc điểm hình thái của chủng TN4

Màu sắc của chủng xạ khuẩn khi nuôi cấy trên các môi trường khác nhau là một trong những đặc điểm hình thái quan trọng được sử dụng trong phân loại và định danh xạ khuẩn. Tùy thuộc vào thành phần dinh dưỡng của từng môi trường, chủng xạ khuẩn có thể biểu hiện sự khác biệt về màu sắc, hình thái khuẩn lạc cũng như sự phát triển của khuẩn ty cơ chất và khuẩn ty khí sinh. Trong nghiên cứu này, màu sắc của khuẩn ty cơ chất và khuẩn ty khí sinh của chủng xạ khuẩn **TN4** được xác định và đối chiếu theo bảng màu của Trerner và Backus nhằm hỗ trợ quá trình phân loại chủng.

Chủng **TN4** được cấy chuyển sang các môi trường ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 và ISP9 để quan sát hình thái khuẩn lạc. Đặc điểm hình thái chủng **TN4** được thể hiện trong bảng 3.6 và hình 3.7.



Hình 3. 7 Hình ảnh hình thái sự phát triển khuẩn lạc chủng xạ khuẩn TN4 trên hệ thống các đĩa môi trường ISP tiêu chuẩn

Bảng 3. 7 Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và khả năng sinh sắc tố của chủng xạ khuẩn TN4 trên các môi trường ISP tiêu chuẩn

Môi trường nuôi cấy	Màu sắc khuẩn ty		Sắc tố	
	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
ISP1	Trắng đục	Đục	-	-
ISP2	Trắng ngà	Vàng nhạt	-	-
ISP3	Trắng đục	Vàng nâu	-	-
ISP4	Trắng đục	Đục	-	-
ISP5	Trắng ngà	Vàng nhạt	-	-
ISP6	Trắng hồng	Vàng nhạt	-	-
ISP9 – Glucose	Trắng ngà	Đục	-	-

Kết quả cho thấy, khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn TN4 có kích thước từ 0.5 - 2mm. Khả năng sinh trưởng trên tất cả các môi trường ISP với sự khác biệt nhất định về màu sắc của khuẩn ty. Khuẩn ty khí sinh chủ yếu có màu trắng đục đến trắng ngà, cho thấy đặc điểm hình thái tương đối ổn định giữa các môi trường nuôi cấy. Riêng trên môi trường ISP6, khuẩn ty khí sinh có màu trắng hồng, đây có thể là đặc điểm

đặc trưng của chúng trong điều kiện môi trường này. Màu sắc khuẩn ty cơ chất biến đổi rõ rệt hơn, từ trắng đục, vàng nhạt đến vàng nâu, phản ánh ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng trong môi trường đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp sắc tố nội bào của xạ khuẩn. Trong đó, môi trường ISP3 cho thấy khuẩn ty cơ chất có màu vàng nâu đậm hơn so với các môi trường còn lại.

Không quan sát thấy sự hình thành sắc tố tan hay melanin trên tất cả các môi trường khảo sát, chứng tỏ chúng không có khả năng tiết sắc tố khuếch tán vào môi trường và không sinh melanin trong điều kiện nuôi cấy thí nghiệm.

3.3.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn TN4

Khả năng đồng hoá các nguồn cacbon và nitrogen khác nhau là một trong những đặc điểm sinh hoá quan trọng của xạ khuẩn (Nomomura trong ISP, 1974). Chính vì vậy, chủng xạ khuẩn TN4 được nuôi trên môi trường ISP9 có bổ sung nguồn cacbon và nitrogen khác nhau. Kết quả được thể hiện tại bảng 3.8.

Bảng 3. 8 Khả năng đồng hóa và sử dụng các nguồn Carbon và Nitrogen hữu cơ/vô cơ của chủng xạ khuẩn đích TN4

Nguồn dinh dưỡng Carbon (Bổ sung tỷ lệ 1,0% w/v)	Mức độ sinh trưởng sinh khối	Nguồn dinh dưỡng Nitrogen (Bổ sung tỷ lệ 0,1% w/v)	Mức độ sinh trưởng sinh khối
Glucose	+++	Tryptone	+++
Sucrose	+	Peptone	+++
Maltose	+++	L-asparagine	+++
Dextrin	+++	L-tyrosine	++
Glycerol	++	(NH ₄) ₂ SO ₄	++
Fructose	+++		

Ghi chú: (+++) Sinh trưởng rất tốt, khuẩn lạc dày và sinh nhiều bào tử khí sinh; (++) Sinh trưởng tốt ở mức trung bình; (+) Sinh trưởng yếu ớt.

Dữ liệu thu được tại Bảng 3.8 cho thấy khả năng đồng hóa nhiều loại cơ chất khác nhau của chủng xạ khuẩn TN4. Chủng TN4 biểu hiện khả năng đồng hóa tốt đối với các loại đường đơn, đường đôi thông dụng như Glucose, Maltose, Fructose và Dextrin. Tuy nhiên, đối với Sucrose (đường mía), chủng tỏ ra đồng hóa kém hơn. Về nguồn nitơ, chủng TN4 đồng hóa tốt các dòng đạm hữu cơ phức hợp giàu amino acid

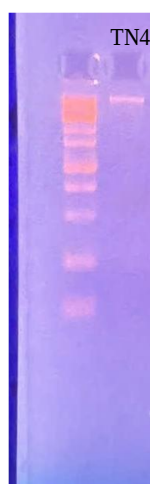
tự do như Tryptone, Peptone và L-asparagine. L-tyrosine và muối vô cơ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cũng được chúng hấp thu và đồng hóa ở mức độ vừa phải.

3.4. Định danh chủng xạ khuẩn TN4

3.4.1. Tách DNA tổng số và khuếch đại gen 16S rDNA của chủng xạ khuẩn TN4

Chủng TN4 được nuôi lỏng trong môi trường ISP2 ở điều kiện 28°C, tốc độ lắc 120 rpm trong vòng 3 ngày để thu nhận lượng sinh khối phù hợp với tách chiết DNA tổng số.

Sau khi tách chiết, mẫu DNA tổng số được hòa tan trong nước khử ion (deionized water) và tiến hành kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di trên gel agarose. Kết quả thu được tại Hình 3.8 cho thấy hình ảnh điện di xuất hiện một băng vạch duy nhất, với kích thước ước tính trên 10 kb. Kết quả này cho thấy quá trình tách chiết DNA tổng số từ chủng xạ khuẩn TN4 đã thực hiện thành công, đảm bảo chất lượng để thực hiện khuếch đại đoạn 16S rDNA.

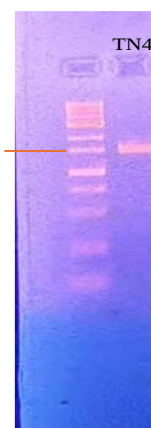


Hình 3. 8 DNA tổng số của chủng TN4

DNA tổng số sau khi tách chiết được của chủng xạ khuẩn TN4 được sử dụng làm khuôn (template) cho phản ứng chuỗi polymerase (PCR) nhằm khuếch đại đoạn gen 16S rDNA. Phản ứng được thực hiện với cặp mồi định danh chuẩn 27F và 1492R.

Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% cho thấy hình ảnh băng vạch rõ nét, đậm đặc và đồng nhất. Tại tất cả các mẫu thử nghiệm, sản phẩm khuếch đại chỉ xuất hiện một băng vạch duy nhất với kích thước ước tính khoảng 1,5 kb (tương ứng với kích thước lý thuyết của gen 16S rRNA ở vi khuẩn). Sự vắng mặt của các băng phụ hay hiện tượng nhiễu nền (primer dimer) khẳng định tính đặc hiệu cao của cặp mồi và điều kiện phản ứng PCR đã được tối ưu hóa hoàn toàn.

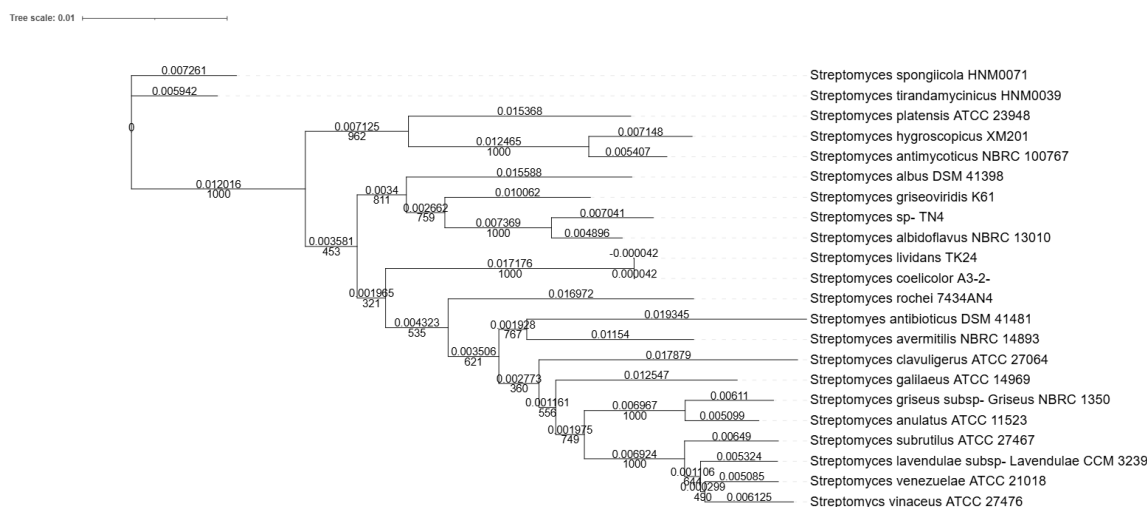
Kết quả này là tiền đề quan trọng, đảm bảo độ tin cậy để tiến hành các bước giải trình tự gen và định danh phân loại cho chủng xạ khuẩn này.



Hình 3. 9 Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn 16S rDNA của chủng TN4

3.4.2. Định danh chủng TN4

Để xác định chính xác vị trí phân loại học, DNA tổng số của TN4 được tách chiết và nhân gen 16S rRNA bằng cặp mồi 27F và 1492R. Sản phẩm PCR kích thước khoảng 1500 bp được giải trình tự và tra cứu trên hệ thống NCBI bằng công cụ BLAST.



Hình 3. 10 Cây phân loại phát sinh loài của chủng TN4

Kết quả khẳng định trình tự gen của chủng TN4 đạt độ tương đồng **99,73%** với loài ***Streptomyces albidoflavus***. Cây phát sinh chủng loại (Phylogenetic tree) xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining (bootstrap 1000) qua phần mềm MEGA 11 định vị TN4 nằm cùng nhánh tiến hóa với chủng *S. albidoflavus* NBRC 13010.

Kết hợp logic từ hình thái (không sinh melanin), sinh lý (hấp thu mạnh Glucose, yếu Sucrose) và sinh học phân tử, chủng được định danh chính thức là ***Streptomyces albidoflavus* TN4**. Loài này được quốc tế công nhận thuộc nhóm an toàn sinh học cấp 1 (GRAS - Generally Recognized As Safe), chuyên biệt cho kiểm soát sinh học, hoàn toàn không gây bệnh cho người hay thực vật.

3.5. Nghiên cứu tạo chế phẩm phân bón vi sinh kháng nấm từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces albidoflavus* TN4

Dựa trên nền tảng các hoạt tính sinh học tốt của chủng *Streptomyces albidoflavus* TN4, nghiên cứu đã tiến hành các bước thực nghiệm ứng dụng tạo sản phẩm phân bón vi sinh. Quy trình công nghệ bao gồm: Nhân nuôi sinh khối chủng TN4 trong hệ thống bình lên men 10L bằng môi trường BFM1 nhằm thu hồi mật độ tế bào và bào tử sống đạt cực đại sau 72h ở 28°C, cấp khí với lưu lượng 1,5L/phút, mật độ tế bào đạt $> 10^9$ CFU/mL.

Dịch sinh khối xạ khuẩn sau khi thu hoạch được tiến hành phối trộn đồng đều với hệ chất nền (chất mang) theo tỷ lệ dao động 1:2. Hệ chất mang, bao gồm:

- **Bột Talc:** Đóng vai trò là chất độn nền chính, tạo độ tơi và phân tán tốt.

- **Đất sét Bentonite (20 – 30%):** Hoạt động như một chất kết dính tự nhiên, tạo khung cấu trúc vững chắc cho hạt phân bón và giữ ẩm vi mô.
- **Gum arabic (10%):** Chất tạo màng sinh học polymer, giúp tăng độ bền cơ học của hạt, hạn chế nứt vỡ và bảo vệ lớp bào tử bên trong.
- **Calcium carbonate - CaCO_3 (5 – 10%):** Là chất đệm giúp điều chỉnh và duy trì độ pH của chế phẩm ở mức trung tính, môi trường lý tưởng cho *Streptomyces* nảy mầm.
- **Mật đường (2%):** Bổ sung nguồn carbon hữu cơ, giúp vi sinh vật nhanh chóng phục hồi và phát triển khi được bón vào đất.

Hỗn hợp sau khi phối trộn đồng nhất được đưa vào khuấy trộn đều tạo viên. Cuối cùng, chế phẩm được đem sấy khô ở nhiệt độ 40°C , nhằm hạ độ ẩm $< 15\%$ mà không làm suy giảm sức sống của bào tử xạ khuẩn.

Đánh giá thành phẩm:

Chế phẩm phân bón vi sinh thành phẩm có dạng hạt tròn nhỏ, màu xám đồng đều, kết cấu chắc chắn không tạo bụi vụn. Mật độ tế bào đạt $2,7 \times 10^8$ CFU/g, sau 1 tháng bảo quản.



Hình 3. 11 Hình ảnh chế phẩm phân bón vi sinh từ chủng *Streptomyces albidoflavus* TN4

PHẦN IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Qua quá trình nghiên cứu của đề tài "*Phân lập, tuyển chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học tốt từ đất rừng Cao Bằng, Việt Nam và ứng dụng để tạo chế phẩm phân vi sinh*", đã thu được những kết quả như sau:

1. **Về phân lập vi sinh vật:** Đã phân lập thành công 48 chủng xạ khuẩn từ các mẫu đất mùn thu thập tại Vườn quốc gia Phia Oắc – Phia Đén, tỉnh Cao Bằng.
2. **Về sàng lọc và tuyển chọn:** Dựa vào việc đánh giá đặc tính sinh học về khả năng kháng nấm, khả năng sinh IAA, phân giải lân và sinh enzyme cellulase, đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn **TN4** là chủng tiềm năng và xuất sắc nhất. Chủng TN4 có đặc tính tốt nhất trong các chủng đã phân lập được, cụ thể:
 - Hoạt tính đối kháng nấm bệnh mạnh với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,2 mm đối với nấm héo rũ (*Fusarium oxysporum*) và 16,5 mm đối với nấm lở cổ rễ (*Rhizoctonia solani*).
 - Khả năng sinh tổng hợp phytohormone kích thích rễ IAA đạt hàm lượng cao (45,2 µg/mL).
 - Năng lực cạnh tranh sắt thông qua khả năng sinh Siderophore (vòng halo đạt 22,5 mm).
 - Khả năng phân giải mùn hữu cơ Cellulose rất tốt (đường kính vòng phân giải đạt 25,4 mm) và hòa tan hiệu quả nguồn lân khó tiêu.
3. **Về định danh phân loại:** Dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa điển hình (không sinh hắc tố melanin) kết hợp với phân tích trình tự đoạn gen 16S rDNA (độ tương đồng 99,73%), chủng TN4 đã được định danh chính thức là ***Streptomyces albidoflavus* TN4**. Đây là loài xạ khuẩn thuộc nhóm an toàn sinh học cấp 1 (GRAS), hoàn toàn an toàn cho người và cây trồng.
4. **Về tạo chế phẩm phân bón vi sinh:** Đã nghiên cứu xây dựng thành công quy trình tạo chế phẩm phân bón vi sinh dạng hạt (đường kính 2 – 4 mm) từ sinh

khối chủng *S. albidoflavus* TN4 kết hợp với hệ chất nền (bột talc, bentonite, gum arabic, CaCO₃ và mật đường). Chế phẩm có đặc tính cơ lý tốt, mật độ vi sinh vật duy trì ổn định ở mức 2×10^8 CFU/g sau 1 tháng bảo quản.

4.2. Kiến nghị

Để kết quả của đề tài có thể sớm được ứng dụng vào thực tiễn sản xuất nông nghiệp, chúng tôi đề xuất một số hướng nghiên cứu tiếp theo:

1. **Thử nghiệm in vivo và đồng ruộng:** Cần tiến hành các thử nghiệm đánh giá hiệu lực thực tế của chế phẩm phân bón vi sinh *S. albidoflavus* TN4 dạng hạt trên các đối tượng cây trồng cụ thể (như cà chua, dưa lưới, hoa màu...) ở điều kiện nhà màng và ngoài đồng ruộng. Từ đó, có cơ sở đánh giá chính xác hiệu quả kích thích sinh trưởng và tỷ lệ phòng trừ nấm bệnh trong điều kiện tự nhiên.
2. **Nghiên cứu tối ưu hóa quy mô lớn:** Tiếp tục nghiên cứu mở rộng quy mô lên men sinh khối (scale-up) lên hệ thống Bioreactor công nghiệp (trên 100 lít) và tối ưu hóa dây chuyền về hạt sấy khô để hạ giá thành, hướng tới thương mại hóa sản phẩm.
3. **Nghiên cứu cơ chế phân tử:** Định hướng giải mã hệ gen hoặc chiết xuất, tinh sạch các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng nấm ngoại bào từ chủng *S. albidoflavus* TN4 nhằm hiểu sâu hơn về cơ chế kiểm soát sinh học của chủng ở mức độ phân tử.

Tài liệu tham khảo

- [1] FAO (2019). *The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture: Systems at breaking point*. Rome.
- [2] Savci, S. (2012). **Investigation of Effect of Chemical Fertilizers on Environment**. *APCBEE Procedia*, 1, 287-292.
- [3] Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2020). *Báo cáo về định hướng phát triển nông nghiệp hữu cơ tại Việt Nam giai đoạn 2020-2030*.
- [4] Barka, E. A., et al. (2016). **Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015;80:1–43.
- [5] Gurushankara Hunasanahally Puttaswamygowda, Shilpa Olakkaran, Anet Antony, Anupama Kizhakke Purayil (2019). **Present Status and Future Perspectives of Marine Actinobacterial Metabolites**. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 307-319.
- [6] Arifuzzaman, M., Khatun, M. and Rahman, H. (2010). **Isolation and Screening of Actinomycetes from Sundarbans Soil for Antibacterial Activity**. *African Journal of Biotechnology*, 9, 4615-4619.
- [7] JeelaniGousia, ShahIshfaq, BabaUqab, and Syeed Mudasir (2023). **Actinomycetes as Biofertilisers for Sustainable Agriculture**. *Microbiomes for the Management of Agricultural Sustainability* (pp.183-192), DOI: 10.1007/978-3-031-32967-8_10
- [8] Ling-juan Z, Richard LG. **Antimicrobial peptides**. *Curr Biol.* 2016;26:R14–R9.
- [9] Bradshaw JP. **Cationic antimicrobial peptides**. *BioDrugs*. 2003;17:233–40.
- [10] Brown KL, Hancock RE. **Cationic host defense (antimicrobial) peptides**. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:24–30.

- [11] Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A. **Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine.** *Fungic Plant Anim.* 2012;2:29–54.
- [12] Meng S, Xu H, Wang F. **Research advances of antimicrobial peptides and applications in food industry and agriculture.** *Curr Protein Pept Sci.* 2010;11:264–73.
- [13] Le C-F, Fang C-M, Sekaran SD. **Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61:e02340–16.
- [14] Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. **Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes.** *Biochemistry.* 1992;31:12416–23.
- [15] Hancock RE, Chapple DS. **Peptide antibiotics.** *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1317–23.
- [16] Ehrenstein G, Lecar H. **Electrically gated ionic channels in lipid bilayers.** *Q Rev Biophys.* 1977;10:233–40.
- [17] Nguyen Duy Phuong, Nguyen Thi Thu Ha, Nguyen Thanh Duc, Le Thanh An, Pham Thi Thuy Van, Dam Thi Thanh Ha, & Nguyen Thanh Ha (2025). **Isolation and identification of IAA-producing rhizobacteria from Robusta coffee plantations in Dak Nong province.** *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering.* DOI: 10.31276/VJSTE.2025.0027.
- [18] ARKA PRATIM CHAKRABORTY , PUSHPANJALI RAY , USHA CHAKRABORTY, BISHWANATH CHAKRABORTY (2023). **Actinomycetes as growth promoters and bioprotectors for plant health improvement.** *Plant health improvement by Actinomycetes.* doi. 10.57023/JMycR.61.2.2023.157.
- [19] D. Klemm, B. Heublein, H.P. Fink, A. Bohn. **Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material.** *Angew Chemical International Education*, Vol.44, 3358–3393, 2005.

[20] P. Gupta, K. Samant, A. Sahu. **Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential.** International Journal of Microbiology Volume 2012, Article doi:10.1155/2012/578925.

[21] M. Sasaki, B. Kabyemela, R. Malaluan, S. Hirose, N. Takeda, T. Adschiri. **Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water.** Journal of Supercritical Fluids, Vol.13, 261–268, 1998.

[22] N. Trivedi, V. Gupta, C.R.K. Reddy, B. Jha. **Detection of ionic liquid stable cellulase produced by the marine bacterium Pseudoalteromonas sp. isolated from brown alga Sargassum polycystum C. Agardh.** Bioresource Technology, Vol. 132, 313–319, 2013.

[23] J. G. Shewale. **Glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose.** International Journal of Biochemistry, Vol. 14, No. 6, 435–443, 1982.

[24] J. Woodward, A. Wiseman. **Fungal and other β -dglucosidases: their properties and applications.** Enzyme and Microbial Technology, Vol. 4, No. 2, 73–79, 1983.

[25] D. D. Y. Ryu, M. Mandels. **Cellulases: biosynthesis and applications.** Enzyme and Microbial Technology, Vol. 2, No. 2, 91–102, 1980.

[26] D. K. Samdhu, S. Bawa. **Improvement of cellulase activity in Trichoderma.** Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 34-35, No. 1, 175–192, 1992.

[27] T. M. Wood. **Synergism between enzyme components of Penicillium pinophilum cellulase in solubilizing hydrogen ordered cellulose.** Journal of Biochemistry, Vol. 260, 37–43, 1989.

[28] Anupama Sapkota, Aishwarya Thapa, Anupa Budhathoki, Muskan Sainju, Prativa Shrestha, Sagar Aryal (2020). **Isolation, Characterization, and**

Screening of Antimicrobial-Producing Actinomycetes from Soil Samples. Int J Microbiol.;2020:2716584. doi: 10.1155/2020/2716584

[29] Elmutasim O Ibnouf, Mohammed F Aldawsari, Hisham Ali Waggiallah (2022). **Isolation and extraction of some compounds that act as antimicrobials from actinomycetes.** Saudi J Biol Sci; 29(8):103352. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103352

[30] E. Shirling and G. D. Gottlieb (1966). **Methods for characterization of Streptomyces species**, Int J Syst Bacteriol, vol. 16, pp. 313-340

[31] T. Stanley, M. G. Williams, and J. G. Sharpe (1989). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Williams and Wilkins, vol. 4, pp. 2452-2492

[32] H. D. Trener and E. J. Buckus (1963). **System of color wheels for Streptomyces taxonomy**, Appl. Microbiol., vol. 11, pp. 335-338

[2] Nguyễn Thị Thu Hà, Phạm Văn Toàn (2018). *Phân bón vi sinh – Nguyên lý và ứng dụng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội

[4] Zahran H. H. (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 91(2-3),143–153

[5] Sharma S. B., Sayyed R. Z., Trivedi M. H., Gobi T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587

[6] Glick B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 963401

- [7] Gaind S., Gaur A. C. (1990). Effect of phosphate solubilizing microorganisms on yield and phosphorus uptake of crops. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 60(6), 405–407
- [8] Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959
- [9] Malusá E., Sas-Paszt L., Ciesielska J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, 491206
- [10] Rillig M. C., Mummey D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171(1), 41–53
- [11] Trần Thị Mỹ Hạnh, Lê Văn Hưng (2020). Thực trạng sản xuất và sử dụng phân bón vi sinh ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 18(5), 405–415.

Hà Nội, ngày tháng năm 2026

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

HỌC VIÊN

Nguyễn Thành Chung

Tổng Đức Minh