

LIÊN HIỆP CÁC HỘI KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT VIỆT NAM

Hội thảo quốc tế

SINH HỌC

Biology - Biologie

International workshop on biology 2001

Hanoi-Vietnam
2-5 tháng 7-2001
2-5 july 2001

TẬP

2

Handwritten notes:
Số 62
H. 313

62
2001
0

Handwritten note: Bài XL STD 2001

LỜI GIỚI THIỆU

Sinh học là khoa học của sự sống mà Con người đại diện cao nhất, với khả năng lao động sáng tạo của mình để làm ra của cải, chế ngự môi trường và chinh phục thiên nhiên.

Trước khi thiên niên kỷ thứ hai khép lại, Con người đã kịp đặt chân lên mặt trăng, nghiên cứu và triển khai công nghệ trên nhiều lĩnh vực Sinh học ở cấp mô, tế bào, nhiễm sắc thể, gen,... của các cơ thể sống, hướng tới mục đích tự hoàn chỉnh bản thân Con người trong mối quan hệ với môi trường.

Các vấn đề Sinh học và liên quan Sinh học giờ đây trở nên rộng lớn, phong phú và thiết thực hơn bao giờ hết. Hội thảo Sinh học Quốc tế -2001, Hà- Nội 2-5 tháng 7 giới thiệu báo cáo, trình bày và thảo luận các vấn đề Sinh học theo ba chủ đề (*), với mục đích **tăng cường hoạt động hợp tác Quốc tế trên lĩnh vực Sinh học**. Kỷ yếu Hội thảo đã thực sự ghi nhận: 58 báo cáo trên lĩnh vực * Con người và môi trường, 26 báo cáo trên lĩnh vực về * các vấn đề cải tiến giảng dạy Sinh học và 91 báo cáo điểm lại * các thành tựu Sinh học tiên tiến trong nước và Quốc tế.

Thành tựu sinh học áp dụng trong Nông nghiệp, Lâm nghiệp, Thủy sản, Y, Dược và Chế biến thực phẩm ... đã trực tiếp mang lại lợi ích vật chất cho xã hội, xoá đói giảm nghèo và nâng cao sức khoẻ cộng đồng. Biên tập Kỷ yếu Hội thảo trong thời hạn ngắn, tập sách sẽ không tránh khỏi thiếu sót với tác giả và có lỗi với bạn đọc. Ban biên tập xin được thể tất và biết ơn sự góp ý phê bình, hợp tác giúp đỡ nhằm phát huy kết quả chung của Hội thảo Sinh học Quốc tế - 2001, Hà nội 2-5 tháng 7.

Trân trọng

BAN BIÊN TẬP

FOREWORD

Biology is the science of life, of which humans are the highest representatives, with their creative ability to make products, master the Environment and conquer Nature.

Before the closing of the second millenium, humans have succeeded to put their feet on the Moon, investigate and develop Technology, in many biological fields on tissues, cells, chromosomes and genes scales in living organisms. All these activities are oriented toward humans themselves, in their relationship with the environment.

Biology and biological relationships are becoming with days more extended, richer and realistic. The International Workshop in Biology in Hanoi, on July 2-5,2001 present reports and debates on Biology in 3 main topics.

Aiming at Strengthening International Relationships in Biology.

The Workshop Proceedings include 58 reports on Man and Environment, 26 reports on Biology Education and 91 reports on prominent achievements in Biology in Vietnam and foreign countries. These achievements applied in Agriculture,Forestry, Aquaculture, Medicine, Pharmacology and Food Processing,... have brought direct material profits to the Society, eradication of Hunger and Reduction of Poverty. The Proceedings are done in a short time and cannot avoid shortcomings with regard to authors and readers. The Redaction Board asks colleagues and readers to pardon us, give observations and advices, and contribute in this way to help improve the results of the International Workshop in Biology in Hanoi on July,2-5,2001.

With our sincere consideration

The Redaction Board

AVANT - PROPOS

La biologie est la science de la vie, dont le plus haut représentant est l'homme, avec sa capacité créatrice pour produire les biens matériels, maitriser l'Environnement et conquérir la Nature.

Avant la clôture du deuxième millénaire, l'homme a réussi à poser ses pieds sur la Lune, étudier et développer la Technologie dans divers domaines de la biologie, à l'échelle tissulaire, cellulaire, chromosomique et des gènes des organismes vivants. Toutes ces activités sont orientées vers le perfectionnement de son Soi, Dans ses relations avec l'Environnement.

Les problèmes de la Biologie ou en rapport avec la biologie sont devenus maintenant plus vastes, plus riches et plus réalistes que jamais.

Le symposium International de Biologie à Hanoi, du 2 au 5 juillet, 2001 presente des rapports scientifiques et conduit des débats sur 3 domaines de la biologie, visant à renforcer les activités pour la coopération internationale en biologie.

Le Recueil des Rapports Scientifiques est composé de 58 rapports dans le domaine de l'homme et de l'environnement, 25 rapports dans le domaine de l'Education de la Biologie et 91 rapports sur les meilleurs resultat de recherches en Biologie au Vietnam et à l'étranger. Les application de la biologie dans l'agriculture, la sylviculture, les produits aquatiques, la médecine, la pharmacie et le traitement des produits alimentaires ont apporté la société humaine beaucoup de profits matériels aident à l'éadication de la famine et à la réduction de la Panvreté, comme à l'amélioration de la santé de la Communauté.

Le Recueil a été fait en un temps assez court et ne peut éviter des erreurs et des fautes vis à vis des auteurs et des lecteurs. Le Comité de Rédaction leur demande de nous excuser et de nous donner des observations et des conseils, et de cette façon, contribuer au succès du Symposium.

Avec notre considération
Le Comité de Rédaction

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM NHIỄM ĐỘC CÁC HÓA CHẤT TRỪ SÂU LÊN MỘT SỐ CHỈ TIÊU SINH LÝ SINH HÓA CỦA CƯ DÂN CÁC TỈNH DUYÊN HẢI MIỀN TRUNG VIỆT NAM

TRAN THI NGOC AN

Viện Pasteur - Nha Trang

I. ĐẶT VẤN ĐỀ:

Các hóa chất trừ sâu đang được sử dụng rộng rãi trong nông, lâm nghiệp để diệt trừ sâu bệnh, bảo vệ mùa màng và làm tăng năng suất cây trồng. Tuy nhiên bên cạnh mặt có lợi của các thuốc trừ sâu, mặt có hại của các hóa chất trừ sâu đối với con người rất lớn. Nguyên nhân gây hại của các hóa chất trừ sâu đối với con người có thể là do việc bảo quản không đúng quy cách, không bảo đảm an toàn vệ sinh, do nhà kho bố trí gần khu dân cư, do quá trình phun thuốc trừ sâu. Ví dụ, phun ngược chiều gió, bình phun bị rò rỉ, người phun thuốc không có hoặc không đủ phương tiện phòng hộ, do rửa dụng cụ đựng thuốc và phun thuốc không đúng nơi quy định. Lượng tồn dư của thuốc trừ sâu trong các loại hoa quả, cây cối, tồn dư trong đất, nước, v. v cũng là nguyên nhân gây nhiễm độc cho người, động vật và môi trường sống nói chung.

Tài liệu nghiên cứu của nhiều tác giả nước ta được Bộ Y Tế thống kê cho biết hàng năm ở nước ta có đến hàng ngàn người bị nhiễm độc các thuốc trừ sâu và số người chết là con số hàng trăm (Phạm Công Hội, 1991; Võ Văn Định, 1990; Phạm Bình Quyền, 1995; Nguyễn Thị Nhu, 1993; v. v...)

Tình hình sử dụng và nhiễm độc thuốc trừ sâu trên cả nước là như vậy, song tình hình này ở miền trung nước ta còn nguy hiểm hơn nhiều. Những công trình nghiên cứu của viện Pasteur Nha Trang trong nhiều năm nay cho thấy tình hình nhiễm độc thuốc trừ sâu ở các tỉnh duyên hải miền trung trầm trọng hơn so với miền Nam và miền Bắc nước ta. Thêm vào đó, nhiều loại thuốc trừ sâu đã nằm trong danh sách bị cấm nhập như: Wofatox, Métaphos, v. v... vẫn đang được tiếp tục sử dụng ở các tỉnh miền Trung.

Xuất phát từ tình hình sử dụng và nhiễm độc nặng ở các tỉnh miền Trung, chúng tôi thấy cần có một công trình nghiên cứu toàn diện về tình hình sử dụng thuốc trừ sâu và nhiễm độc các chất này ở cư dân miền Trung nước ta, nhằm mục đích tìm các biện pháp hữu hiệu hạn chế sự thâm nhiễm các thuốc trừ sâu vào cơ thể con người, biện pháp phòng chống khi bị nhiễm độc và ngăn chặn sự ô nhiễm môi trường do sử dụng thuốc trừ sâu.

Nhiệm vụ của công trình này gồm:

1. Nghiên cứu chế độ bảo quản, sử dụng các hóa chất trừ sâu tại các công ty buôn bán thuốc trừ sâu và ở các hợp tác xã nông nghiệp sử dụng các hóa chất này
2. Nghiên cứu một số chỉ tiêu sinh lý-sinh hóa máu và một số biến động chức năng ở cơ thể những người tiếp xúc với các hóa chất trừ sâu, cũng như những người bị nhiễm độc các chất này.
3. Đề xuất các biện pháp bảo quản, sử dụng và phòng chống nhiễm độc trong các hóa chất trừ sâu.

II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Tình hình nhiễm độc các thuốc trừ sâu trên thế giới và trong nước:

Năm 1977 Tổ Chức Y tế Thế Giới cho biết số người bị nhiễm độc hóa chất trừ sâu trên thế giới hàng năm là 20. 640 người (Medova A. 1977). Theo Kustov V. V (1998), thì số người bị

ngộ độc hóa chất trừ sâu hàng năm trên thế giới lên đến 750.000 người. Theo Trần Quang Hùng (1992) số người bị nhiễm độc thuốc trừ sâu khoảng 2 triệu trong năm và số người chết khoảng 40.000 người.

Ở Việt Nam, theo Lê Đình Công (1979), từ năm 1973 đến 1975 có trên 500 trường hợp bị nhiễm hóa chất trừ sâu. Năm 1991 Phạm Công Hội (1991) thông báo rằng ở 6 tỉnh miền Bắc VN có 661 người bị nhiễm hóa chất trừ sâu và 32 người bị chết trong năm này. Riêng ở 5 huyện ngoại thành Hà Nội từ năm 1980 đến 1984 có 214 người bị nhiễm hóa chất trừ sâu (Bộ môn Dịch Tễ Học trường ĐHY Khoa Hà Nội, 1984). Từ 1979 đến 1982 các bệnh viện ở Hà Nội phải cấp cứu cho 371 người bị nhiễm độc thuốc trừ sâu, trong đó 50 người bị tử vong (Vũ Văn Định, 1994). Từ 1985 đến 1990 bệnh viện đa khoa Bắc Thái cấp cứu cho 253 người bị nhiễm độc thuốc trừ sâu (Vũ Văn Định, 1990). Từ 1986 đến 1990 bệnh viện Huế đã cấp cứu cho 318 người bị nhiễm độc thuốc trừ sâu, trong đó có 37 người chết (Nguyễn Thị Nhu, 1993). Theo Phạm Bình Quyền (1995) trong năm 1992 số người bị nhiễm độc thuốc trừ sâu ở nước ta lên đến 4572 người.

Như vậy tình hình nhiễm độc thuốc trừ sâu ở nước ta, chỉ ở một số tỉnh miền Bắc và miền Trung, chưa nói đến miền Nam, đã là hiện tượng báo động, cần phải giải quyết.

2. 2 Biểu hiện nhiễm độc của thuốc trừ sâu:

Thuốc trừ sâu có nhiều loại, biểu hiện nhiễm độc của từng loại rất khác nhau. Liên hệ với việc ở miền trung nước ta đang sử dụng phổ biến các thuốc trừ sâu lân hữu cơ, do đó trong phần này chúng tôi chỉ nói đến biểu hiện nhiễm độc do thuốc trừ sâu lân hữu cơ.

Các chất trừ sâu lân hữu cơ là một trong các nhóm chất trừ sâu được sản xuất và sử dụng sớm nhất. Trong cơ thể động vật các chất lân hữu cơ ít tích lũy trong lipid, lipoprotein và trong mô mỡ. Sự phân giải các hoá chất trừ sâu lân hữu cơ trong cơ thể diễn ra nhanh và làm xuất hiện nhiều hợp chất trung gian độc hại đối với các loại côn trùng và động vật máu nóng. Về bản chất, phần lớn các chất trung gian đều là sản phẩm của quá trình oxy hoá khử, làm tăng độc tính đối với cơ thể.

Thuyết kinh điển về quá trình gây độc của các chất trừ sâu loại lân hữu cơ cho rằng các chất này gây ức chế cholinesterase, do đó làm ứ đọng acetylcholin trong cơ thể, gây rối loạn các chức năng của hệ thần kinh, ảnh hưởng xấu đến trung khu hô hấp, trung khu điều tiết tuần hoàn và gây tử vong. Đối với chức năng điều tiết vận động của hệ thần kinh, các chất lân hữu cơ gây rung cơ và liệt cơ, trong đó có cơ hô hấp, nên dễ dẫn đến tử vong.

Nói chung, các chất trừ sâu lân hữu cơ gây suy hô hấp, suy tuần hoàn, gây rối loạn các quá trình chuyển hoá trên cơ sở thiếu ô xy trầm trọng trong các tổ chức (Ngô Tiến Dũng, 1988; Vũ Văn Định, 1990, 1994; Phạm Công Hội, 1991; Trần Quang Hùng, 1992...).

Đã có nhiều công trình nghiên cứu các chất chống lại tác dụng của các chất lân hữu cơ khi chúng thâm nhiễm vào cơ thể. người ta cho rằng có thể chống độc tính của các thuốc trừ sâu lân hữu cơ theo hai cách: dùng thuốc điều trị đặc hiệu và thuốc điều trị triệu chứng. Thuốc điều trị đặc hiệu là thuốc có tác dụng phục hồi cholinesteraza, còn thuốc điều trị triệu chứng là những thuốc có tác dụng trợ tim, thuốc bổ trợ hô hấp, chống sốc....

Dù có thuốc đặc hiệu và không đặc hiệu để điều trị ngộ độc do các thuốc trừ sâu lân hữu cơ, nhưng theo chúng tôi, cần nghiên cứu những biện pháp hữu hiệu nhằm hạn chế sự phát tán các chất lân hữu cơ và sự thâm nhiễm các chất này vào cơ thể là biện pháp tốt nhất.

III. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

3. 1 Địa điểm nghiên cứu:

Nghiên cứu được tiến hành ở 23 hợp tác xã nông nghiệp và 15 công ty, nhà máy buôn bán, sản xuất thuốc trừ sâu ở các tỉnh: Khánh Hòa, Phú Yên, Bình Định, Quảng Ngãi, Quảng

Nam Đà Nẵng, Huế, Ninh Thuận, Bình Thuận). TDD cũng được tiến hành ở các địa phương khác.

3. 2 Đối tượng nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu gồm các xã viên phun thuốc trừ sâu ở các hợp tác xã nông nghiệp, công nhân phun thuốc trừ sâu bằng máy ở các nông trường, công nhân sản xuất thuốc trừ sâu ở các nhà máy sản xuất hoá chất trừ sâu Hòa Khánh và Sông Vệ, nhân dân xung quanh nhà máy sản xuất thuốc trừ sâu, nhân viên giữ kho thuốc và bán thuốc trừ sâu ở các công ty vật tư nông nghiệp, nhân viên phun thuốc Ba Diệt thuộc các trạm vệ sinh phòng dịch.

3. 3. Các chỉ tiêu nghiên cứu:

3. 3. 1 Lượng thuốc trừ sâu trong không khí, các kho chứa thuốc trừ sâu và trên da người tiếp xúc với thuốc trừ sâu.

3. 3. 2 Tình hình bảo hộ lao động cho những người làm việc với thuốc trừ sâu và các yếu tố tạo điều kiện thâm nhiễm thuốc trừ sâu.

3. 3. 3 Hàm lượng thuốc trừ sâu xung quanh các nhà máy sản xuất thuốc trừ sâu (trong không khí và đất).

3. 3. 4 Xác định hoạt tính cholinesterase và số chỉ tiêu hoá sinh máu như GOT, GPT, MACLAGAN.

3. 3. 5 Xác định số lượng hồng cầu, bạch cầu, huyết sắc tố trong máu ngoại vi ở những người tiếp xúc với thuốc trừ sâu.

3. 3. 6 Xác định mức thanh thải (hệ số thanh thải) của thận.

3. 3. 7 Đo mạch, huyết áp nhiều lần mỗi ngày ở những người tiếp xúc với thuốc trừ sâu.

3. 3. 8 Khám bệnh (thần kinh, tiêu hoá, tim mạch, tai mũi họng) cho những người tiếp xúc với thuốc trừ sâu.

3. 4 Các phương tiện nghiên cứu:

Trong nghiên cứu các chỉ tiêu nói trên đã và sẽ sử dụng các máy sau:

- Máy sinh hoá tự động Alcyon của Mỹ

Máu huyết học tự động cell dyn 3200 của Abbott Mỹ

Máy miễn dịch huỳnh quang tự động Asym của Mỹ

- Máy điện di Sebice của Pháp.

- Máy Hewlett Packard (Mỹ) để tiến hành làm sắc ký khối phổ xác định tương thuốc trừ sâu trong không khí và trên cơ thể người.

- Các phương tiện dụng cụ thông thường xác định huyết áp, nhiệt độ...

Công việc nghiên cứu định tiến hành trên một ngàn người có tiếp xúc với thuốc trừ sâu.

Các thuốc trừ sâu đang được sử dụng phổ biến ở các tỉnh duyên hải miền trung nước ta gồm: Wofatox, Basudin, Metaphos, Parathion, Aldrin.

IV. CÁC CÔNG VIỆC ĐÃ LÀM ĐƯỢC:

4. 1 Xác định hoạt tính cholinesterase trên 734 xã viên ở các đội phun thuốc trừ sâu ở 23 hợp tác xã nông nghiệp, công nhân phun thuốc trừ sâu ở nông trường và công nhân sản xuất thuốc trừ sâu.

4. 2 Xét nghiệm hồng cầu, bạch cầu, GOT, GPT, MACLAGAN.

4. 3 Khám bệnh cho những người tiếp xúc với thuốc trừ sâu gồm: nông dân, công nhân, các cơ sở sử dụng thuốc trừ sâu.

4. 4 Điều tra tình hình sử dụng thuốc trừ sâu, tình hình bảo quản thuốc trừ sâu ở các cơ sở sản xuất và phun thuốc trừ sâu, +tình trạng trang bị các phương tiện bảo hộ cho người lao động.

4. 5 Tình trạng ngộ độc thuốc trừ sâu phải đưa đi cấp cứu ở các bệnh viện.

Từ các kết quả nghiên cứu đã rút ra một số kết luận sau:

1/ Tỷ lệ nhiễm độc thuốc trừ sâu của các xã viên hợp tác xã nông nghiệp, công nhân ở các công ty sản xuất thuốc trừ sâu ở các tỉnh duyên hải miền trung rất cao, đạt 63. 8% số người tiếp xúc với thuốc trừ sâu. Trong khi đó tỷ lệ này ở miền Bắc là 10%, miền nam là 23. 3%.

2/ Số người bị nhiễm độc nặng ở miền trung lên đến 8, 1% tổng số người được nghiên cứu (ở miền nam là 3. 3%, ở miền Bắc còn thấp hơn)

3/ Số lượng hồng cầu, bạch cầu, hàm lượng GOT, GPT, trong máu ở những người bị nhiễm thuốc trừ sâu giảm mạnh. Hàm lượng (hoạt tính) cholinesterase trong máu ở 23. 6% xã viên bị nhiễm độc nhẹ và vừa sau 7 ngày vẫn chưa hồi phục, sau nghỉ tiếp xúc với thuốc trừ sâu 1 tháng vẫn còn 5. 26% số người bị giảm cholinesterase.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Văn Định. Ngộ độc các thuốc chống cholinesterase và ngộ độc lân hữu cơ. Hội sức cấp cứu. Hà nội, 1990.
2. Phạm Công Hội. Thuốc bảo vệ thực vật với môi trường và con người. Hà nội, 1991 (Tài liệu tập huấn phòng chống nhiễm độc).
3. Phạm Công Hội. Sử dụng hoá chất bảo vệ thực vật ở Việt Nam. Tập san y học lao động và vệ sinh môi trường, NO 5, 1993.
4. Phạm Bình Quyền. Hiện trạng ô nhiễm môi trường do sử dụng hoá chất trong nông nghiệp. Thông tin môi trường tháng 3/1995. Bộ KHCN và MT, trung tâm TTTLKH và CN, 1995.
5. Wayland J Hayes, Jr and Edward R. Laws, Jr. Handbook of pesticide Toxicology vol 2 p. 917-972. Ecademic press. inc 1992.
6. Francois Testud, Pathologie toxique en milieu de travail p. 304-309 Ellipses 1995.
7. Pesticides: chimie et normes serie de rapports techniques 798 O. M. S Geneve 1990.
8. P. Savinc les intoxications aiguës organophosphores et carbamales p. 261-269 Arnette Paris 1993.
9. Elizabeth and all. Toxicology and applied pharmacology p. 146, 227-236 university of Maryland 3-1997.
10. Jan M. Lundberg: pharmacological reviews vol 48 number 1 p. 116-120 printed in USA 3-1996.

ABSTRACT
**THE RESEARCH SPECIFIC INTOXICATION OF THE PESTICIDES ON THE
BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE COASTAL
AREA RESIDENTS IN MIDDLE OF VIETNAM**

TRAN THI NGOC AN
Pasteur Institution
Nha Trang City

Pesticide is an important substance in agriculture and silviculture for it is broadly used to kill insects, thereby protecting crops and trees from its destruction and increasing the production. However this chemical is very harmful to human beings. The reasons may be the poor store of the chemical leading to pollution of the surrounding areas; the incorrect process of spraying it for example spraying pesticide to windward; using leaky pesticide spray; the sprayers working without protection or in the condition in which there are not enough quality protectors; and the pesticide containers and sprays are not cleaned in the indicated areas. Once this chemical remains in fruits, vegetable, water and land, it also harms people's health, the living organisms and the environment in the Middle of Vietnam coastal areas.

From the pesticide using method and the pesticide-affected problem in these areas, we think it is vital to conduct a careful and comprehensive research about the pesticide usage and the pesticide affected situations in these places.

After many years of research, we are able to draw the following conclusions:

The percentage of cases affected by pesticide among the people who have to work directly with it in these areas is approximately 63.8%. This is quite a high figure compare with those of the South and North of Vietnam (about 23.3% and 10%, respectively).

The proportion of heavily affected people to those who are chosen for the research is 8.1% while in the South and North, this percentage is comparatively low (3.3% in the South and lower in the North).

The number of erythrocytes and leukocytes, and the quantity of glutamin pyretic transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) in the blood of the people who are affected by pesticide rapidly decrease. The activity of cholinesterase in the blood of 23.6% of those who are affected at a light and medium level could not recover after seven days since the time that they had not work with it. This inactive situation still exists in 5.26% of pesticide affected people after a month since then.

CẢI TIẾN PHƯƠNG PHÁP Bùn HOẠT TÍNH NHẪM XỬ LÝ CÁC HỢP CHẤT NITƠ CÓ TRONG NƯỚC THẢI

X

TÔ KIM ANH, YAMAGISHI TAKAO¹

Viện Công nghệ sinh học-Thực phẩm, ĐHBK Hà Nội

I. MỞ ĐẦU

Nước thải chứa nitơ-phenol được xử lý thử nghiệm bằng phương pháp bùn hoạt tính trong một thiết bị duy nhất, thông khí gián đoạn, có gắn kết hệ thống phân tách hai pha lỏng-rắn. Trong thời gian thí nghiệm, tốc độ nitrat hoá và phản nitrat hoá tương ứng đạt tới 169,91mg N.g⁻¹ VSS.ngày⁻¹ và 64,49 - 4,55 mg NO₃-N.g⁻¹ VSS.ngày⁻¹ trong chu kỳ thông khí gián đoạn 4h. Hiệu quả xử lý nitơ tổng cộng là 50,2% do bị giới hạn bởi thiếu nguồn cacbon hữu cơ cho quá trình phản nitrat hoá hoàn toàn (1 mg phenol/NO₃). Hiệu quả xử lý phenol (TÔC) đạt được 98,5% ngay trong giờ đầu tiên của chu trình yếm khí (phản nitrat hoá) ở nồng độ MLVSS 2,400 mg/l.

Trong phương pháp bùn hoạt tính truyền thống dùng tách đồng thời nitơ và các hợp chất cacbon và photpho, do đặc điểm hoàn toàn khác nhau của các phản ứng sinh hoá xảy ra trong quá trình xử lý, quá trình được tiến hành trong ba bể phản ứng khác nhau khá công kênh: bể yếm khí, hiếu khí và bể oxy hoá⁽¹⁾. Việc kết hợp hai quá trình nitrat hoá và phản nitrat hoá trong cùng bình phản ứng ở phương pháp bùn hoạt tính sẽ mang lại nhiều ưu điểm: giảm số bình phản ứng và diện tích cho xử lý, có thể tận dụng các hợp chất cacbon có sẵn trong nước thải cho quá trình phản nitrat hoá, giảm lượng axit/kiềm cần bổ sung để duy trì pH thích hợp cho mỗi quá trình⁽⁴⁾. Tuy nhiên, do các đặc điểm khác biệt của hai quá trình nitrat hoá và phản nitrat hoá, việc kết hợp phải thoả mãn điều kiện sinh hoá cho mỗi quá trình⁽²⁾. Do sự phát triển chậm của các vi khuẩn nitrat hoá, tốc độ của quá trình nitrat hoá quyết định tốc độ của toàn hệ thống xử lý⁽³⁾. Tốc độ quá trình được cải thiện khi sinh khối được duy trì trong thiết bị phản ứng ở mật độ cao. Tuy nhiên, khi ấy khả năng lắng của bùn và lượng nước thải sau xử lý sẽ bị giảm mỗi cách đáng kể. Để giải quyết vấn đề này, chúng tôi sử dụng một hệ thống màng lọc gắn với bình phản ứng nhằm phân tách hai pha lỏng (nước thải sau xử lý) và pha rắn (bùn hoạt tính). Ngoài ra, hệ thống với hàm lượng bùn cao có thể dùng xử lý nước thải có tải lượng các hợp chất cacbon cao mà không làm tăng lượng bùn cần xử lý⁽⁴⁾, một trong các vấn đề thường gặp phải của các hệ thống xử lý sinh học thông thường. Bài báo này sẽ đề cập tới khả năng xử lý đồng thời cacbon và nitơ trong nước thải bằng phương pháp bùn hoạt tính trong một bình phản ứng với hệ thống thiết bị phản ứng màng lọc có áp dụng chế độ thông khí gián đoạn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Bùn hoạt tính: Bùn hoạt tính của nước thải sinh hoạt với mật độ sinh khối 2400 mg/l, được sử dụng cho nghiên cứu (do phòng thí nghiệm Hoá học sinh thái và Vi sinh vật, Viện tài nguyên và Môi trường, Tsukuba, Nhật Bản cung cấp).
hành phần nước thải nhân tạo (mg/l):
phenol (600); (NH₄)₂SO₄ (2829), K₂HPO₄ (56,2), NaH₂PO₄.2H₂O (50,40), CaCl₂.2H₂O (12,1),

¹. Viện Tài nguyên và môi trường, Tsukuba, Nhật bản.

Các chữ viết tắt: (ML)VSS: sinh khối tế bào, TOD: nhu cầu oxy lý thuyết, BOD: nhu cầu oxy sinh hoá, TOC:

cacbon hữu cơ tổng số, IC: cacbon vô cơ, -N_i: thành phần nước thải trước xử lý, -N_f: thành phần nước thải sau xử lý, DO: oxy hoà tan

MgSO₄.7H₂O (41,6), NaHCO₃ (1200). Các thành phần trên được hoà tan trong nước máy. *Mô hình thí nghiệm*: Hệ thống bùn hoạt tính gắn với thiết bị lọc màng được sử dụng cho nghiên cứu. Hệ thống hoạt động ở nhiệt độ (25 ± 2)^oC, có kiểm soát pH và DO. Tốc độ dòng nước thải 300 ml/ngày. Hệ thống hoạt động theo phương thức bán liên tục trừ 17 ngày đầu tiên hệ thống hoạt động liên tục. Tải lượng thiết kế của hệ thống là TOD: 0,429 g.l⁻¹.ngày⁻¹, BOD: 0,3 g.l⁻¹.ngày⁻¹, thời gian lưu của nước thải: 3,3 ngày. *Phân tích mẫu*: MLVSS được xác định với 25 ml mẫu theo phương pháp trọng lượng không đổi. NO₃-N và NO₂-N được phân tích trên thiết bị sắc ký ion YOKOGAWA - IC7000; NH₄-N được phân tích trên thiết bị sắc ký cột Shimadzu và TOC được phân tích trên thiết bị phân tích TOC Shimadzu -TOC-500. N₂O tạo thành được đánh giá khi phân tích mẫu tập hợp ở đầu ra của khí thải của hệ thống xử lý trên hệ thống sắc ký khí HP 5890A GC, Hewlett Packard Corp. USA. *Đánh giá tốc độ nitrat hoá*: Tốc độ nitrat hoá được đánh giá trong quá trình thông khí liên tục (pha nitrat hoá) trong thiết bị phản ứng có kiểm tra pH (7) và hàm lượng oxy hoà tan (DO_{max}=4 mg/l, vận tốc cấp khí 200 mg/ml). Tốc độ nitrat hoá được đánh giá bằng số mg NH₄-N bị oxy hoá. g⁻¹ VSS.ngày⁻¹. *Đánh giá tốc độ quá trình phản nitrat hoá và hiệu quả xử lý nitơ tổng thể*: Tốc độ phản nitrat hoá được đánh giá khi hệ thống chuyển sang chế độ thông khí gián đoạn có kiểm soát pH (7) và DO (DO_{max}= 3 mg/l, V_{air}=500 mg/ml). Tốc độ quá trình phản nitrat hoá được đánh giá bằng số mg NO₃⁻-N bị khử. g⁻¹ VSS.ngày⁻¹. Hiệu quả xử lý nitơ của quá trình được đánh giá thông qua hàm lượng NH₄-N bị oxy hoá khử hoàn toàn trong hệ thống so với hàm lượng NH₄-N ban đầu trong nước thải chưa xử lý (%).III. Kết quả và thảo luận

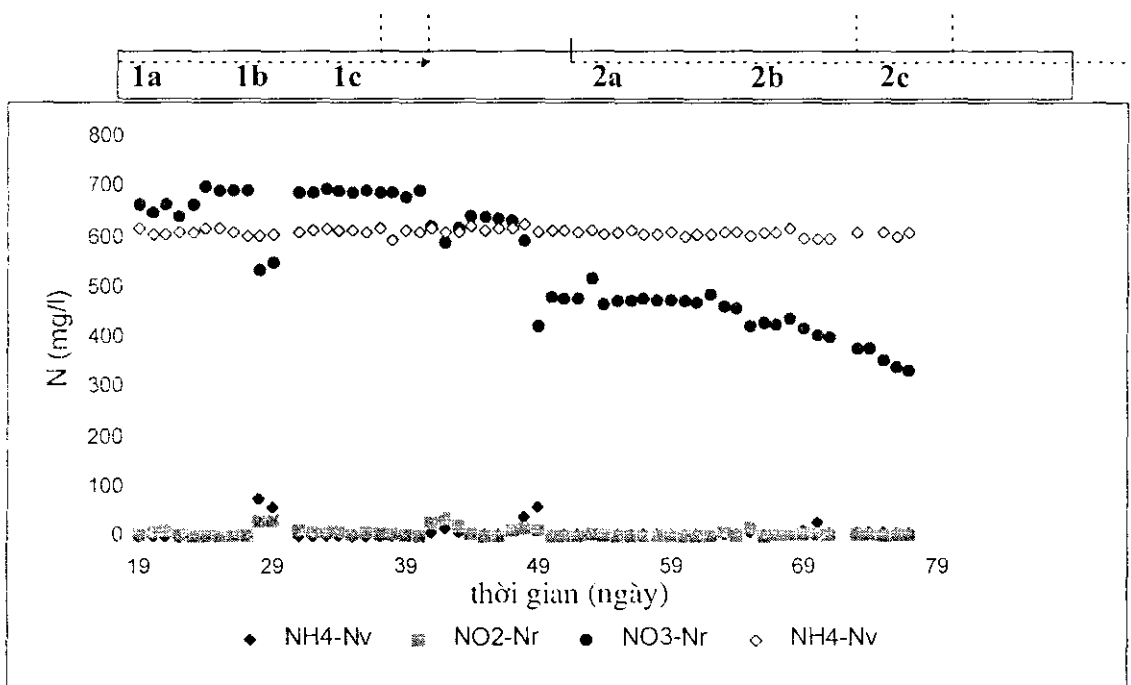
Nước thải trước khi xử lý được giữ ở 2^oC và được bơm vào thiết bị phản ứng với lưu lượng 300 ml/ngày. Kết quả kiểm tra cho thấy thành phần của nước thải ổn định suốt trong thời gian lưu giữ nước thải. Hệ thống được vận hành theo 3 giai đoạn: pha chuẩn bị, pha hiếu khí (pha 1) và pha thông khí gián đoạn (pha 2). Pha chuẩn bị Trong 5 ngày đầu tiên, amon và phenol được cấp liên tục vào thiết bị với lưu lượng nước thải 300 ml/ngày, DO_{max} 4 mg/l, tốc độ khuấy 200 v/phút, V_{air} 200 mg/ml. Kết quả phân tích cho thấy không có dấu hiệu của sự nitrat hoá, chứng tỏ rằng bùn hoạt tính chưa được làm thích ứng trước với amon. Trong 12 ngày tiếp sau, để làm thích ứng bùn hoạt tính với amon và phenol có trong nước thải, chúng tôi ngừng cấp nước thải cho hệ thống, giữ nguyên chế độ thông khí và kiểm tra các thông số hàng ngày. NO₂-N and NO₃-N được phát hiện vào ngày thứ bảy. Tuy hàm lượng MLVSS giảm mạnh trong thời gian này nhưng amon trong nước thải được oxy hoá dần thành NO₂-N và NO₃-N, chứng tỏ quần thể các vi khuẩn nitrat hoá trong bùn hoạt tính đã được hoạt hoá. Vào ngày thứ 18, chỉ duy nhất NO₃-N được tìm thấy trong mẫu mà không phát hiện thấy NO₂-N, chứng tỏ rằng amon bị oxy hoá hoàn toàn tới NO₃-N. Các kết quả quan sát được cho thấy hệ thống đã sẵn sàng làm việc, vì vậy, chúng tôi chuyển hệ thống sang pha nitrat hoá (pha 1). Pha nitrat hoá Điều kiện vận hành của hệ thống trong pha 1 và 2 được trình bày trong bảng 1. Động thái của quá trình của cả hai pha được trình bày trên hình 1 và 2.

Bảng 1

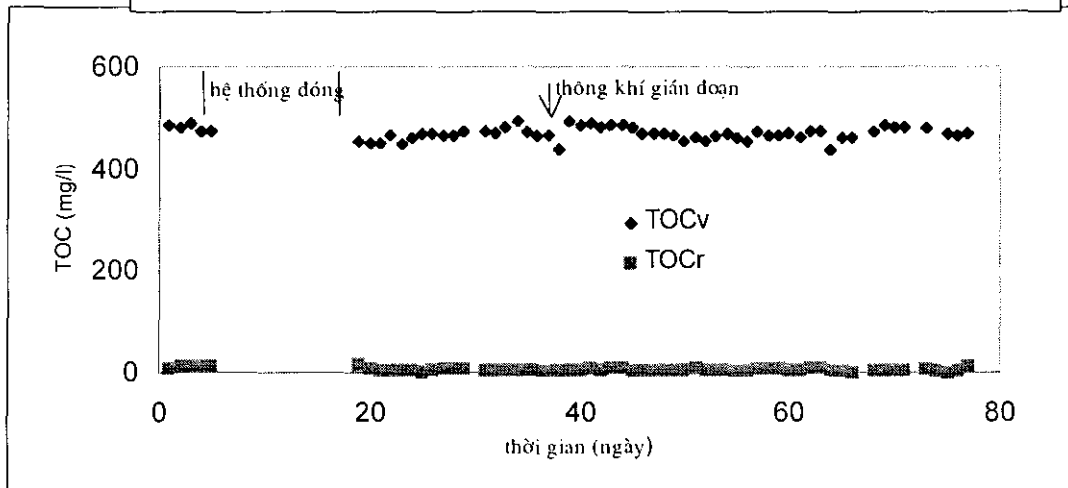
Điều kiện vận hành của hệ thống xử lý

Pha	MLVSS (mg/l)	DO _{max} (mg/l)	Điều kiện vận hành
1	1a (19-27)	2192	3.0 $V_{air}=200$ ml/min. Thông khí liên tục, cấp dịch gián đoạn (chu kỳ 3h)
	1b (28-29)	2400	3.0 $V_{air}=200$ ml/min. Cấp dịch gián đoạn, thông khí gián đoạn (chu kỳ 3h -1.5h hiệu khí & 1.5h yếm khí)
	1c (30-40)	2386	3.0 $V_{air}=200$ ml/min. Thông khí liên tục, cấp dịch gián đoạn (chu kỳ 3h)
2	2a (41-48)	2400	3.0 $V_{air}=200$ ml/min Cấp dịch gián đoạn, thông khí gián đoạn (chu kỳ 2h -40 phút hiệu khí & 80 phút yếm khí)
	(49-62)	2400	3.0 $V_{air}=500$ ml/min Cấp dịch gián đoạn, thông khí gián đoạn (chu kỳ 2h -40 phút hiệu khí & 80 phút yếm khí)
	2b (63-68)	2656	3.0 $V_{air}=500$ ml/min. Cấp dịch gián đoạn, thông khí gián đoạn (chu kỳ 2h -1h hiệu khí & 1h yếm khí)
	2c (69-80)	2800	3.0 $V_{air}=500$ ml/min. Cấp dịch gián đoạn, thông khí gián đoạn (chu kỳ 4h -2h hiệu khí & 2h yếm khí)

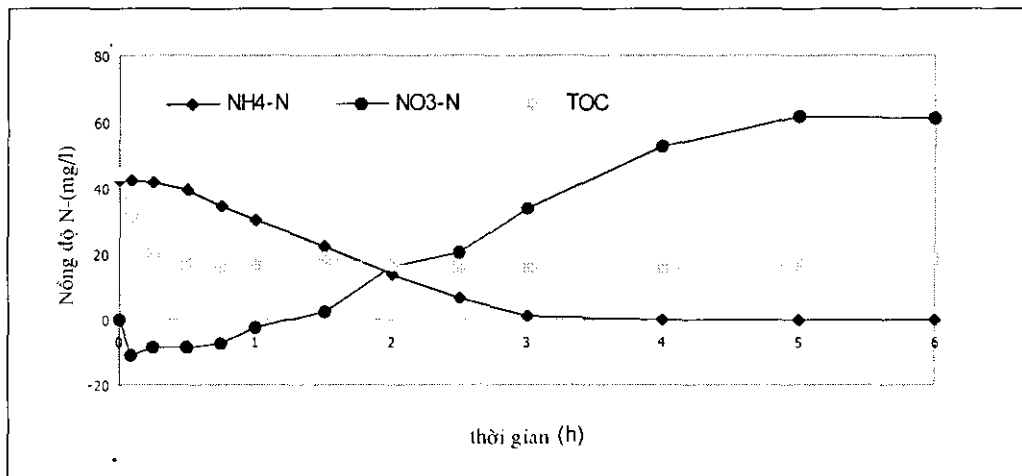
Quá trình đạt ổn định trong pha 1c của quá trình nitrat hoá. Tại đây, NH_4-N có trong nước thải được oxy hoá hoàn toàn tới $N-NO_3$. Tốc độ nitrat hoá đạt tới $120.8 \text{ mg N.g}^{-1} \text{ VSS.ngày}^{-1}$ (hình 4). Hiệu quả xử lý TOC đạt tới 96.7 % ngay trong 30 phút đầu tiên của mỗi chu trình. Hình 2 cũng chỉ rõ khả năng tiến hành đồng thời tách hoàn toàn các hợp chất cacbon và quá trình nitrat hoá trong một thiết bị ở phương pháp bùn hoạt tính (quá trình một giai đoạn).



Hình 1. Diễn biến quá trình xử lý nước thải trong hệ thống lọc màng



Hình 2. Hiệu quả xử lý TOC



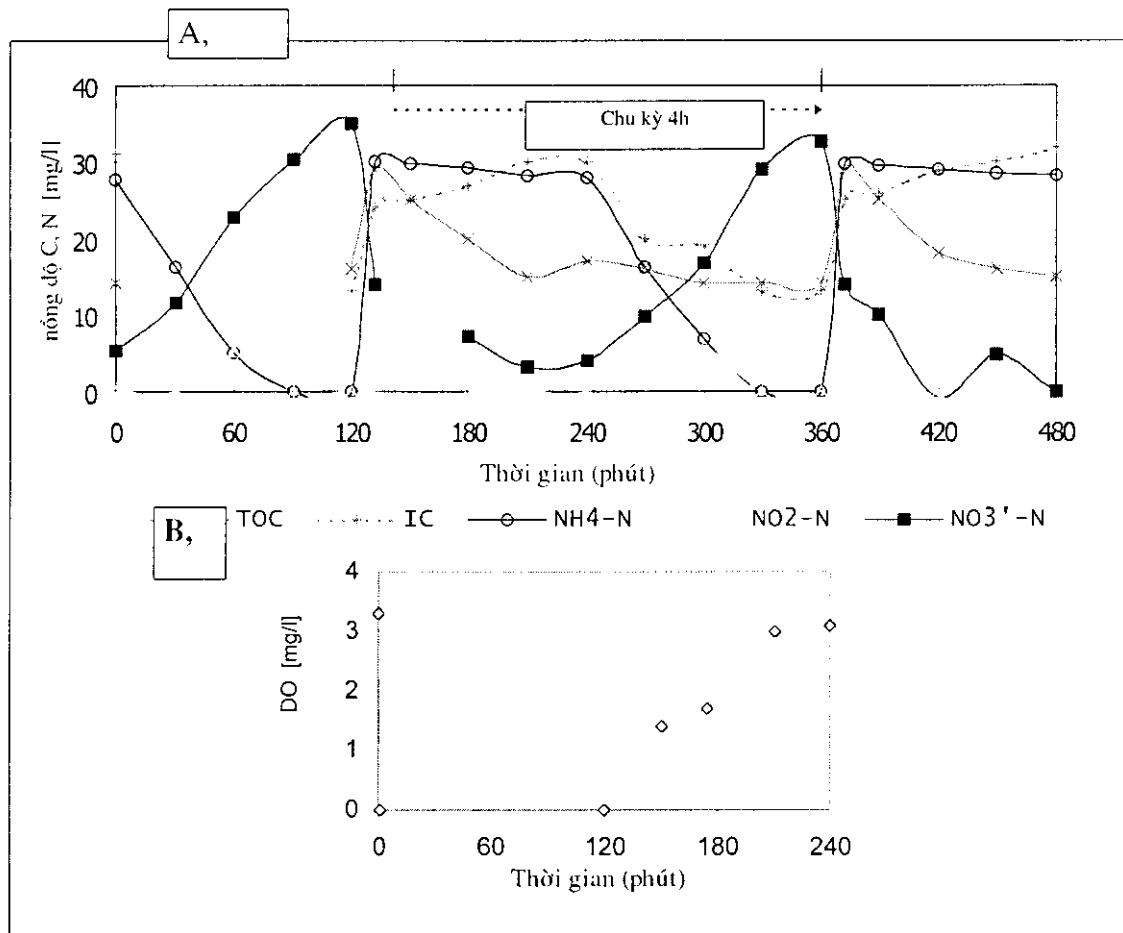
Tiếp sau đó, hệ thống được chuyển sang chế độ thông khí gián đoạn nhằm phối hợp quá trình nitrat hoá và phản nitrat hoá trong cùng một thiết bị phản ứng (pha 2). Để có thể tận dụng nguồn các hợp chất cacbon có trong nước thải, hệ thống được thông khí theo chu kỳ: pha yếm khí rồi đến pha hiếu khí. Hệ thống được thử nghiệm ở các chế độ thông khí gián đoạn khác nhau nhằm tìm hiểu điều kiện phù hợp cho quần thể các vi khuẩn nitrat và phản nitrat hoá trong cùng một thiết bị phản ứng.

Pha thông khí gián đoạn (pha 2)

Pha thông khí gián đoạn được bắt đầu với chu kỳ 2 giờ, bao gồm 40 phút yếm khí và 80 phút thông khí liên tục ở DO_{max} 3 mg/l, V_{air} 200 mg/ml và pH 7 (pha 2a). Trong pha này, hệ thống không ổn định trong 13 ngày đầu do sự vận hành thiếu ổn định của bơm hồi lưu và hệ thống thông khí. Quá trình xử lý diễn ra ổn định vào ngày thứ 55 và kéo dài 7 ngày tiếp theo. Hiệu quả xử lý TOC không thay đổi (95.7%). Tốc độ nitrat hoá giảm đi, vào ngày thứ 20 sau khi bắt đầu quá trình thông khí gián đoạn chỉ đạt tới 35.6 mg N.g⁻¹ VSS.ngày⁻¹. Như vậy chế độ thông khí gián đoạn đang áp dụng ảnh hưởng tới tập hợp các vi khuẩn nitrat hoá có trong nước thải, làm giảm tốc độ nitrat hoá. Kết quả khảo sát động thái của một chu kỳ xử lý cho thấy toàn bộ NH₄-N được cấp cho một chu kỳ được oxy hoá hoàn toàn; quá trình nitrat hoá được thực hiện hoàn toàn sau 2/3 thời gian thông khí. Tuy nhiên hàm lượng nitrat không thay đổi trong suốt quá trình yếm

khí cho thấy quá trình khử nitrat không xảy ra; vi khuẩn phản nitrat hoá chưa được hoạt hoá đủ trong thời gian 40 phút của pha yếm khí.

Để có thể hoạt hoá tập hợp các vi khuẩn phản nitrat hoá tốt hơn, chúng tôi tiến hành thử nghiệm các chế độ thông khí gián đoạn bao gồm chu kỳ 2h và chu kỳ 4h, tương ứng bao gồm pha yếm khí/ hiếu khí: 1h /1h (pha 2b) và 2h/2h (pha 2c). Hiệu quả xử lý TOC tăng lên không đáng kể, đạt 98,5% trong cả hai chu kỳ. Tốc độ nitrat hoá tăng lên $169,91 \text{ mg N.g}^{-1} \text{ VSS.ngày}^{-1}$, lớn hơn so với trong pha 2a. Tốc độ khử nitrat đạt tới $64,49 \pm 4,55 \text{ mg NO}_3\text{-N.g}^{-1} \text{ VSS.ngày}^{-1}$ trong pha 2c (hình 4). N mất mát khỏi hệ thống là 50,1% so với N cung cấp từ nước thải (bảng 2). Đây có thể coi là hiệu quả xử lý nitơ khi coi lượng N do sinh khối hấp thụ là không đáng kể (1,4% so với N cung cấp).



Hình 4. Động thái xử lý trong chu trình thông khí gián đoạn 4h, pha 2c
A, hiệu quả xử lý nitơ và TOC; B, biến đổi DO trong một chu kỳ thông khí

Về lý thuyết, để quá trình phản nitrat hoá có thể xảy ra hoàn toàn, tỉ lệ giữa phenol và nitrat cần phải là $1,19 \text{ mg/mg}^{(1)}$. Trong thực tế, giá trị được công bố còn cao hơn nữa, vào khoảng $1,3 \text{ mg phenol /mg NO}_3^{-(4)}$. ở hệ thống thí nghiệm này, tỉ lệ hợp này là $1,00 \text{ mg phenol /mg NO}_3^-$, nhỏ hơn giá trị lý thuyết cần có. Hơn thế nữa, kết quả phân tích khí thải của hệ thống cho thấy lượng N_2O chiếm tới 24% lượng N cung cấp. Như vậy hàm lượng cacbon hữu cơ cung cấp không đủ cho để quá trình phản nitrat hoá xảy ra hoàn toàn. Để quá trình xử lý nitơ có thể xảy ra hoàn toàn, và quan trọng hơn nữa là giảm lượng N_2O tạo ra trong quá trình, một trong các loại khí quan trọng trong việc tạo ra hiệu ứng nhà kính, cần bổ sung thêm nguồn cacbon hữu cơ thích hợp với quá trình xử lý.

Bảng 2

Cân bằng nitơ của hệ thống xử lý*

Pha	Ngày thí nghiệm	MLVSS (mg.l ⁻¹ .ng ⁻¹)	Phenol(TOC)		Nito**				
			Tải trọng (mg.l ⁻¹ .ng ⁻¹)	Hiệu quả (%)	Tải trọng (mg)	Sau xử lý (mg)			N mất mát (%)
						NH ₄ -N	NO ₂ -N	NO ₃ -N	
1a	19-24	2224	135,82	95,0	1094,41	0,33	8,35	1094,41	0,18
1c	30-38	2156	141,54	96,7	1639,63	14,77	19,92	1639,63	-12,95
2a	56-62	2632	135,42	95,7	977,07	6,31	0	1225,30	19,74 (4)***
2b	63-68	2638	137,38	98,5	805,31	9,37	8,12	1097,40	25,02 (1,4)
2c	69-75	2848	131,73	98,5	1166,41	23,38	6,65	785,75	50,1 (1,4)

* cân bằng nitơ được tính toán cho các giai đoạn ổn định của hệ thống

** nitơ mất mát được tính bằng: $N_{\text{mất}} = N_v - NH_4-N_r - NO_2-N_r - NO_3-N_r$;

*** N do sinh khối hấp thụ được ghi trong dấu ngoặc.

Các kết quả nhận được từ thí nghiệm này chứng minh khả năng sử dụng hệ thống bùn hoạt tính gắn với hệ thống lọc màng có thể xử lý đồng thời các hợp chất carbon và nitơ chỉ trong một bình phản ứng. Các kết quả nhận được cũng cho thấy các ảnh hưởng khác nhau đến hệ vi khuẩn nitrat hoá và phản-nitrat hoá khi áp dụng các chế độ thông khí khác nhau. Để có thể nâng cao hiệu quả xử lý nitơ theo phương pháp này, một trong những khả năng có thể xem xét là sử dụng nguồn carbon hữu cơ phù hợp bổ sung cho quá trình khử nitrat diễn ra hoàn toàn.

Summary

NITROGEN BIOREMOVAL IN A SINGLE STAGE - ACTIVATED SLUDGE PROCESS

TÔ KIM ANH, YAMAGISHI TAKAO¹

Using a cross-flow filtration reactor system in activated sludge process at feasible initial MLVSS of 2,400 mg/l, nitrogen removal can be achieved in a single vessel intermittently aerated. In spite of lack of organic carbon source for accomplished denitrification (1,00 mg phenol/ mg NO₃⁻), nitrification and denitrification rates attained the values of 169,91mg N.g⁻¹ VSS.d⁻¹ and 64,49 mg NO₃-N.g⁻¹VSS.d⁻¹ (respectively), leading to the nitrogen removal of 50.1% in 4h intermittent aeration batch. In addition TOC removal efficiency was estimated of 98.5% providing feasibility of single stage activated sludge system use for the biological nitrogen removal.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Metcalf & Eddy IN. (1991). *Wastewater engineering*. 3rd edition, McGraw-Hill International edition.
2. Pochana K. and Keller J. (1999). Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 39, 61-68.
3. Roger K. (1982). Denitrification. *Microbiological Review*. Mar. , 43-70.
4. Suwa Y., Yamagishi T., Urushigawa Y., Hirai M. (1989). Simultaneous organic carbon removal — nitrification by an activated sludge process with cross-flow filtration. *J. Fermen. Bioeng.* Vol. 67, 119-125.
5. Wiesmann U. (1994). *Biological nitrogen removal from wastewater*. *Advances in Biochem. Eng. Biotechnol.* Vol. 51, 115-154.

¹. Viện Tài nguyên và môi trường, Tsukuba, Nhật bản.

Các chữ viết tắt: (ML)VSS: sinh khối tế bào, TOD: nhu cầu oxy lý thuyết, BOD: nhu cầu oxy sinh hoá, TOC: cacbon hữu cơ tổng số, IC: cacbon vô cơ, -N_i: thành phần nước thải trước xử lý, -N_e: thành phần nước thải sau xử lý, DO: oxy hoà tan

NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA ACETALDEHYDE DEHYDRO - +

GENASE *ALD2/3* VÀ ACETYL COA HYDROLASE *ACHI* TRONG VIỆC TỔNG HỢP AXIT AXETIC DO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* TRONG QUÁ TRÌNH LÊN MEN CỒN

ĐẶNG HỒNG ANH¹, GOTO NAMI²

¹*Food Industries Research Institute, Vietnam*

²*National Research Institute of Brewing, Japan*

I. GIỚI THIỆU :

Axit axetic, một sản phẩm phụ của quá trình lên men cồn, là axit bay hơi chính trong sản phẩm đồ uống lên men. Người ta phải điều khiển tốt sự tạo thành axit axetic trong quá trình lên men bởi vì ảnh hưởng âm tính của nó tới chất lượng cảm vị của sản phẩm. Trong rượu vang, nồng độ axit axetic thường cao hơn mong muốn, trên 0,8g/lít. Tuy nhiên nồng độ cao hơn của axit axetic được tạo thành phụ thuộc vào chủng nấm men, thành phần môi trường và điều kiện lên men. Tuy vậy, những nghiên cứu về cơ chế của sự tạo axit axetic vẫn còn rất ít.

Trong quá trình lên men cồn axit axetic được tạo thành chủ yếu theo con đường pyruvate dehydrogenase (PDH), ở đây axit pyruvic được chuyển thành acetyl CoA qua acetaldehyde và axit axetic trong tế bào chất. Con đường PDH liên quan tới các enzym pyruvate decarboxylase (PDC), aldehyde dehydrogenase (ALD), và acetyl CoA synthetase (ACS).

ALD oxy hoá acetaldehyde thành axit axetic có rất nhiều đồng phân được mã hoá bởi 5 gene *ALD2-6*, đặt tên theo đề nghị của Navarro-Aviño (10). Các dạng đồng phân này khác nhau về vị trí trong tế bào cũng như hành vi biểu hiện (10). *ALD2*, *ALD3* và *ALD6* mã hoá các dạng đồng phân trong tế bào chất, trong khi đó *ALD4*, *ALD5* tương ứng với các dạng đồng phân trong ty thể. Gene *ALD6* mã hoá cho ALD chính trong tế bào chất và sự biểu hiện của nó là chủ yếu (9). Nấm men bị phá vỡ gene *ALD6* tạo lượng axit axetic thấp hơn, nhưng nếu bị phá vỡ đồng thời cả *ALD6**ALD4* thì vẫn có khả năng lên men lượng lớn đường và tạo axit axetic, điều này cho ta thấy vai trò của các thành viên khác trong gia đình ALD (12). Trong môi trường thẩm thấu cao (1M sorbitol hoặc 20% glucose) sự phiên mã của các gene *ALD2/3* tăng lên và một số lượng axit axetic lớn hơn sẽ được tạo thành (1).

ACS biến axit axetic thành acetyl CoA. Các gene *ACS1*, *ACS2* mã hoá cho hai đồng phân của nó. Người ta đã thông báo rằng *ACS1* bị ức chế dưới điều kiện yếm khí và có mặt của glucose, ngược lại *ACS2* lại cần thiết cho sự phát triển của nấm men trong môi trường glucose và sự biểu hiện của nó là chủ yếu (6, 13,14). Enzym thuận nghịch của ACS là ACH. Enzym này được mã hoá bởi gene *ACHI*, nó xúc tác cho phản ứng thủy phân acetyl CoA thành axit axetic, do vậy cũng liên quan đến sự trao đổi chất acetate của nấm men (7,8,11).

Để có thể hiểu cơ chế của sự tạo axit axetic trong quá trình lên men một cách rõ ràng hơn, chúng tôi đã thực hiện phá vỡ các gene *ACHI* và hai gene lân cận *ALD2/3* hoặc đồng thời biểu hiện quá mức các gene *ACS* và phá vỡ gene *ACHI* trong *Saccharomyces cerevisiae*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật và môi trường:

Nấm men phòng thí nghiệm *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 (MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 try-delta63 his3-delta200 leu2-delta1) được sử dụng như chủng chủ cho sự phá vỡ gene.

Escherichia coli JM109 được sử dụng cho mục đích nhân plasmid.

Ngoài ra đối với các thí nghiệm kiểm tra lên men chúng tôi có sử dụng 5 chủng đơn bội và 5 chủng đa bội thu nhận từ ngân hàng ATCC (bao gồm 1 chủng đối chứng, 4 chủng còn lại lần lượt bị phá vỡ các gene *ACH1*, *ALD2*, *ALD3*, *ALD6*).

Môi trường cơ bản cho nấm men là môi trường tối thiểu SD có bổ sung thêm 7 axit amin: uracil, lysine, adenine, tryptophan, histidine, leucine và methionine. Môi trường dùng để lựa chọn các chủng bị phá vỡ gene là môi trường cơ bản không bổ sung uracil. Đối với sự biểu hiện quá mức của các gene *ACS*, môi trường cơ bản có thêm Aureobasidin A (AbA) 0,5 mg/l đã được sử dụng.

Môi trường dùng cho các thí nghiệm lên men là môi trường cơ bản với nồng độ glucose 11%. Ngoài ra để kiểm tra sự tạo axit axetic trong môi trường thẩm thấu cao đã sử dụng môi trường cơ bản với 2% glucose; 2% glucose và 0,5M sorbitol; 11% glucose .

Kỹ thuật DNA tái tổ hợp:

Các quá trình chung như: Phản ứng chuỗi polymerase (PCR); Biến nạp *E.coli* (Theo phương pháp của Hanahan); Tách chiết và làm sạch plasmid (Theo QIAGEN Plasmid Mini kit, Cat No.12125); Biến nạp nấm men (theo phương pháp Lithium acetate); Tách chiết DNA nấm men (Theo QIAGEN Genomic DNA kit, Cat. No. 13323); Southern blot: DNA được chuyển từ gel tới màng nylon theo phương pháp dịch chuyển mao dẫn kiểm tính xuôi dòng (Downward Alkaline Capillary Transfer Method). Đầu dò được tổng hợp bởi kit tổng hợp đầu dò DIG (PCR DIG Probe synthesis kit) (Roche, Cat No. 1636069). Quá trình lai và nhận biết theo DIG High Prime Labelling and Detection Starter Kit I using NBT/BCIP (Boehringer Mannheim, Cat No. 1745832).

Các phương pháp phân tích:

Xác định axit hữu cơ bằng máy sắc ký lỏng cao áp (LC-workstation Class-LC10, Shimadzu).

Xác định alcohol bằng máy đo nồng độ cồn AL-2 hoặc phương pháp enzym (Boehringer Mannheim detection kit).

Phá vỡ *ALD2/3*:

Sự phá vỡ *ALD2/3* được thực hiện theo chiến thuật của Navarro-Aviño (10). Đoạn trên của *ALD2/3* đã được nhân lên bằng PCR sử dụng các mồi *ALD1493* (5'-CAAGGTACCGAT TATCGTGC CATGC TTTA-3') tương ứng với các nucleotide từ -305 đến -276 ngược dòng từ codon khởi đầu của *ALD2* và có chứa một vị trí enzyme giới hạn *KpnI* (chữ đậm) và *ALD1777* (5'-ACGAAGCTTTTTGATGGACATGCAATG-3') có chứa vị trí *HindIII* (gạch dưới) tương ứng với các nucleotide từ -22 đến -47. Đoạn dưới được nhân lên nhờ các mồi *ALD5564* (5'-TTCAAGCTTCATATTCTATGAAATC-3') có chứa một vị trí *HindIII* (gạch dưới) từ nucleotide +36 đến +66 xuôi dòng từ codon dừng của *ALD3* và *ALD6064* (5'-TCAGAGCTCATGATTGGTCTTTTTGAG-3') có chứa vị trí *SacI* (chữ đậm) từ nucleotide +536 đến +509. Hai đoạn được cắt bởi *HindIII* và được gắn lại với nhau. Sản phẩm gắn kết được nhân lên bằng PCR và sau đó được cắt bởi *KpnI/SacI* và được đưa vào vị trí *KpnI/SacI* của pBluescript II KS⁺. Vùng mã hoá của *CaURA3* được nhân lên bằng PCR từ pAG61 dùng các mồi SP6 và T7 có chứa vị trí *HindIII*. Sản phẩm PCR được đưa vào giữa vùng trên và vùng dưới trong pBluescript

ở vị trí *Hind*III. Sau đó toàn bộ vùng trên, dưới và vùng mã hóa *CuURA3* được nhân lên bởi PCR dùng các môi *ALD1493*, *ALD6064* và sản phẩm PCR được biến nạp vào YPH499 để phá vỡ vùng mã hoá của *ALD2/3*.

Phá vỡ *ACHI*: Theo phương pháp của Tadao Asano (2).

Một đoạn DNA (583base) trong vùng mã hoá của *ACHI* được nhân lên nhờ PCR dùng các môi *ACHI 550* (5'-CCATCGATGG CTTCGTTTCGAGGGTATTCAC-3') có chứa vị trí *Cla*I (gạch dưới) và *ACHI 1115* (5'-GGACTAGTCC GCGCGTAATGTCAACTTCT-3') có chứa vị trí *Spe*I (gạch dưới). Sau đó sản phẩm PCR được cắt bởi enzym giới hạn và được đưa vào vị trí *Cla*I/*Spe*I của vector plasmid pAG61. Plasmid được hoá thẳng bằng cách cắt bởi *Nar*I (vị trí này nằm trong đoạn *ACHI*) và sau đó plasmid thẳng được hội nhập vào chromosome của nấm men để phá vỡ gene *ACHI*.

Biểu hiện quá mức của *ACS*: Tạo các plasmid biểu hiện quá mức *ACS* theo Seiji Akamasu (1).

Vùng mã hoá của *ACS1* và *ACS2* được nhân lên bằng PCR dùng các môi *ACS1 U* (5'-GGG GGTCGACCTATAAGCAAAACCAAACAT-3'), *ACS1 L* (5'-GGGGGAGCTCTATAAAAAGGAAAGAAATCA-3') và *ACS2 U* (5'-GGGGGTCGACCAACAGAATACAGGAA AGT-3'), *ACS2 L* (5'-GGGGGAGCTCAACAGAAAAGGAGCGAAAT-3') có chứa các vị trí *Sal*I (chữ đậm) và *Sac*I (gạch dưới). Sản phẩm PCR được đưa vào vị trí *Sal*I/*Sac*I của vector con thoi biểu hiện protein pAUR123 (GenBank accession No.AB012284, Takara Shuzo Co., Kyoto) có chứa gene kháng Aureobacsidin A, *AURI-C* và vùng promoter của *ADHI*. Chủng YPH499 và chủng bị phá vỡ gene *ACHI* được biến nạp với các plasmid đã được xây dựng hoặc pAUR123 như là các chủng đối chứng.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

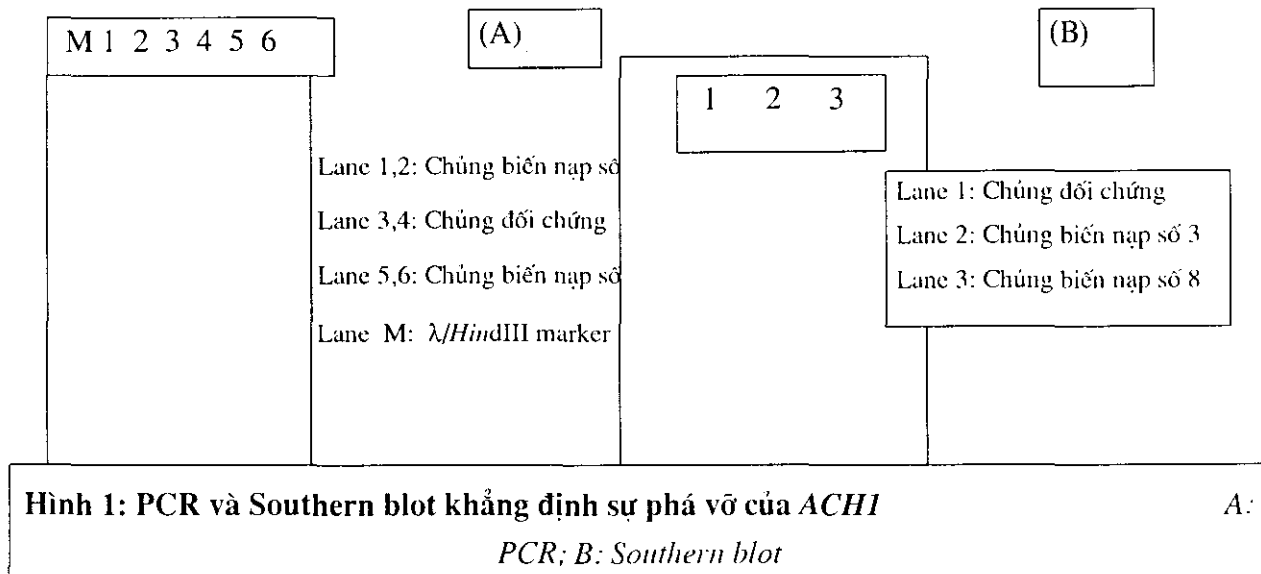
1. Phá vỡ các gene:

*Phá vỡ *ACHI*:*

Đã sử dụng hai phương pháp: PCR và Southern blot để khẳng định sự phá vỡ của *ACHI*.

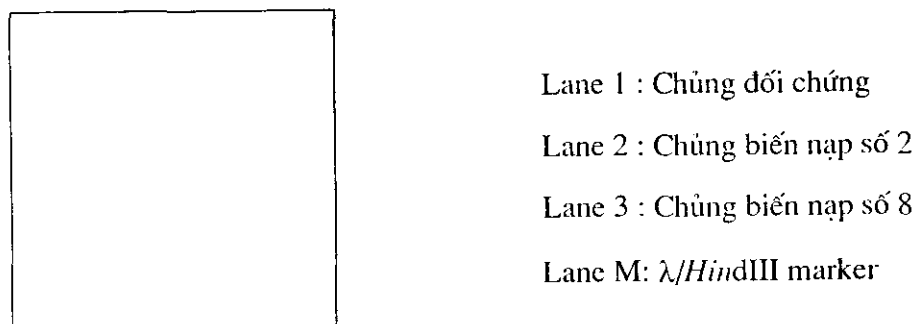
Phương pháp PCR: PCR được thực hiện dùng cặp môi *ACHI 368U* và *ACHI 1938L* (nằm kẹp hai phía của đoạn *ACHI*) và DNA của chủng đối chứng và các chủng được biến nạp như là khuôn. Kết quả PCR chỉ ra rằng chỉ có duy nhất một băng (1570 base) được tạo thành từ chủng đối chứng, trong khi có 2 băng (1570 và 7233 base) được tạo từ 2 chủng biến nạp (hình 1A).

Tuy nhiên kết quả này chưa rõ ràng nên phải sử dụng tiếp phương pháp Southern để khẳng định sự phá vỡ của *ACHI*. DNA của chủng đối chứng và hai chủng biến nạp được cắt bởi *Hind*III, đoạn *ACHI* đánh dấu DIG được sử dụng như đầu dò. Một đoạn khoảng 4000 base được phát hiện từ DNA của chủng đối chứng, trong khi 2 đoạn khoảng 6000 và trên 3000 base được phát hiện từ DNA của hai chủng biến nạp (có một vị trí *Hind*III trong pAG61) (hình 1B). Kết quả này khẳng định rằng gene *ACHI* đã bị phá vỡ. Trong chủng biến nạp số 3 có thêm một băng được phát hiện, do vậy chủng số 8 được coi như là một đại diện cho chủng nấm men bị phá vỡ gene *ACHI* trong thí nghiệm tiếp theo.



Phá vỡ ALD2/3:

Trong số 5 khuẩn lạc được lựa chọn từ sản phẩm biến nạp (số 1,2,3,4,8) có 2 khuẩn lạc (số 1 và 2) phát triển trên đĩa thạch SD chậm hơn so với 3 khuẩn lạc còn lại, do vậy chúng tôi lựa chọn 2 khuẩn lạc số 2 và số 8 đại diện cho mỗi nhóm để kiểm tra sự phá vỡ của *ALD2/3* bằng phương pháp PCR. PCR được thực hiện dùng các môi *ALD1493* và *ALD6064* và DNA của chủng đối chứng và hai chủng biến nạp như là khuôn. Một đoạn 4571 base được nhân lên từ DNA của chủng đối chứng trong khi một đoạn khoảng 3300 base từ hai chủng biến nạp (hình 2). Sản phẩm PCR đã khẳng định sự phá vỡ của *ALD2/3*.



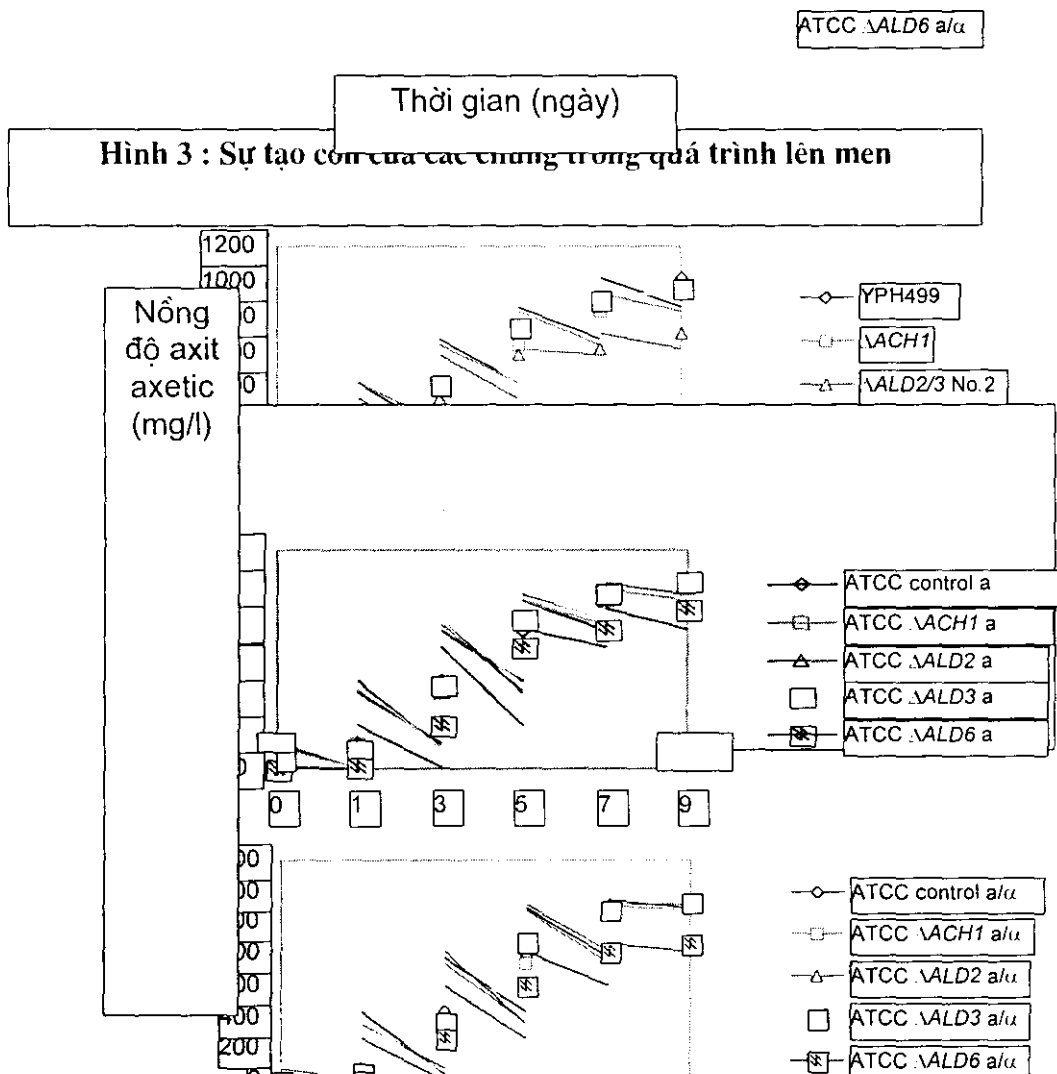
Hình 2: PCR khẳng định sự phá vỡ của ALD2/3

2. Kiểm tra lên men:

Lên men các chủng bị phá vỡ *ACH1*, *ALD2/3* và các chủng thu nhận từ ngân hàng *ATCC*:

Chủng đối chứng *YPH499*, chủng bị phá vỡ *ACH1* và hai chủng bị phá vỡ *ALD2/3* (số 2 và số 8) từ *YPH499* và 10 chủng thu nhận từ ngân hàng *ATCC* đã được sử dụng cho thí nghiệm này. Nồng độ cồn và axit axetic đã được xác định trong suốt quá trình lên men.

Nồng
độ
cồn
(%V)



Hình 4 : Sự tạo axit axetic của các chủng trong quá trình lên men

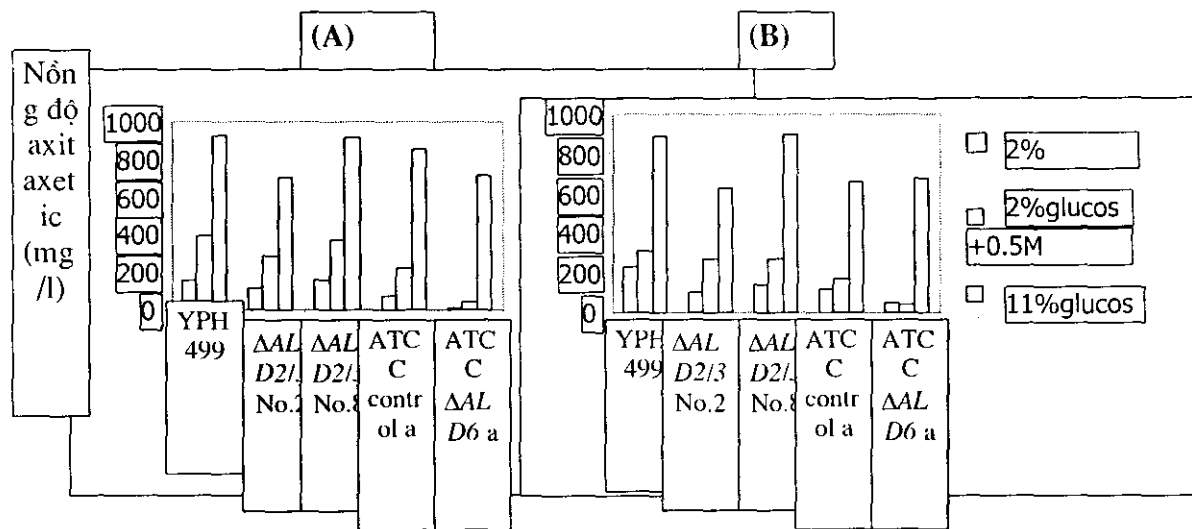
Thời gian (ngày)

Kết quả được chỉ ra trong hình 3 và 4. Không có sự khác biệt đáng kể giữa YPH499 và chủng phá vỡ *ACH1* từ nó cũng như các chủng đối chứng và bị phá vỡ *ACH1* của ngân hàng ATCC về khả năng lên men cũng như tạo axit axetic. Điều này cho phép kết luận rằng phá vỡ gene *ACH1* đã không có ảnh hưởng đáng kể đến sự tạo thành axit axetic.

Mặt khác, các chủng bị phá vỡ các gene *ALD2* hoặc *ALD3* của ngân hàng ATCC không làm thay đổi khả năng tạo cồn và axit axetic so với các chủng đối chứng. Kết quả tương tự thu được đối với chủng bị phá vỡ *ALD2/3* số 8: sự xóa bỏ *ALD2/3* đã không có ảnh hưởng đến số lượng axit axetic được tạo thành cũng như khả năng lên men. Tuy nhiên, chủng bị phá vỡ *ALD2/3* số 2 bị giảm đáng kể cả khả năng tạo cồn lẫn tạo axit axetic. Chúng tôi cho rằng ngoài các gene *ALD2/3* bị phá vỡ thì trong chủng này còn có một sự thay đổi nào đó gây nên bởi quá trình biến nạp. Chủng bị phá vỡ gene *ALD6* của ngân hàng ATCC trong giai đoạn sớm của quá trình lên men tạo thành một số lượng axit axetic thấp hơn đáng kể so với chủng đối chứng nhưng nồng độ axit axetic cuối cùng của quá trình lên men không quá thấp, điều này gợi ý rằng có một sự thay thế lẫn nhau giữa các thành viên của gia đình *ALD*.

Lên men trong môi trường thẩm thấu cao:

Người ta đã thông báo rằng trong điều kiện thẩm thấu cao sự phiên mã của các gene *ALD2/3* tăng lên. Do vậy chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm lên men trong môi trường có áp suất thẩm thấu cao nhằm kiểm tra sự tạo thành axit axetic của các chủng bị phá vỡ gene *ALD2/3*. Để so sánh, chúng tôi đã sử dụng chủng đơn bội bị phá vỡ *ALD6* và chủng đối chứng của nó thu nhận từ ngân hàng ATCC. Kết quả chỉ ra trong hình 5.



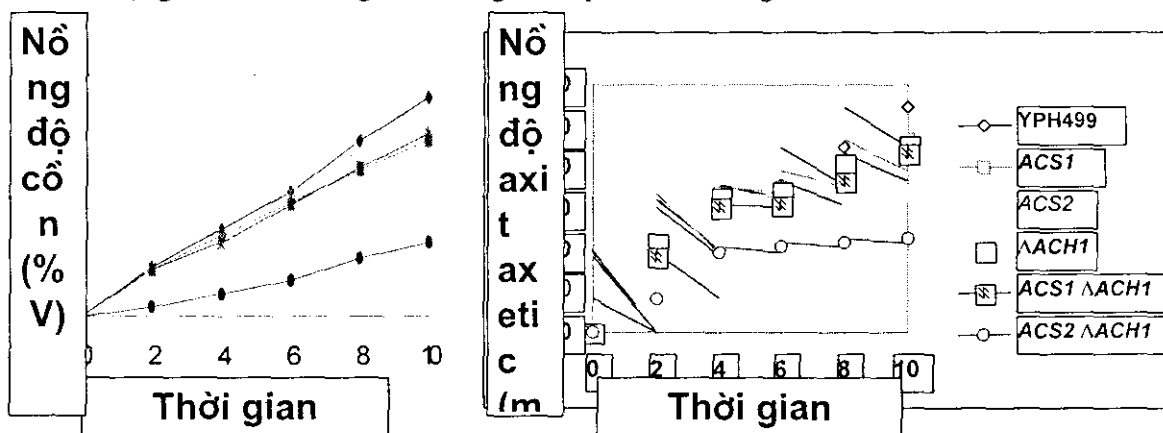
Hình 5: Ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu cao đến sự tạo axit axetic của các chủng (A) Điều kiện bán hiếu khí; (B) Điều kiện yếm khí

Ngược lại với mong đợi, các chủng bị phá vỡ *ALD2/3* (số 2 và số 8) vẫn có một điểm chung so với chủng đối chứng là tạo ra lượng axit axetic cao hơn đáng kể trong môi trường có áp suất thẩm thấu cao trong cả hai điều kiện lên men yếm khí và bán hiếu khí. Trong khi đó không có sự khác biệt đáng kể về sự tạo thành axit axetic của chủng bị phá vỡ *ALD6* trong các môi trường có áp

suất thẩm thấu cao và thấp. Tuy nhiên số lượng axit axetic được tạo thành bởi chủng này trong môi trường có nồng độ glucose cao vẫn khá lớn. Những kết quả này khẳng định vai trò chủ đạo của *ALD6* và một lần nữa gợi ý rằng các thành viên của gia đình *ALD* có thể thay thế lẫn nhau trong môi trường có nồng độ glucose cao.

Lên men dùng các chủng biểu hiện quá mức ACS:

Mặc dù sự phá vỡ *ACH1* không có ảnh hưởng đáng kể đến sự tạo cồn cũng như axit axetic, nhưng một chủng nấm men được đồng thời biểu hiện quá mức và phá vỡ hai gene mã hoá cho hai enzym thuận nghịch sẽ có ảnh hưởng như thế nào đến sự tạo cồn cũng như axit axetic? Để trả lời câu hỏi này một thí nghiệm lên men với các chủng được đồng thời biểu hiện quá mức *ACS* và bị phá vỡ *ACH1* đã được thực hiện. Để so sánh các chủng chỉ biểu hiện quá mức *ACS* cũng được sử dụng trong thí nghiệm này. YPH499 cũng như chủng bị phá vỡ *ACH1* từ nó có chứa plasmid pAUR123 được sử dụng như các chủng đối chứng. Kết quả chỉ ra trong hình 6.



Hình 6: Sự tạo cồn và axit axetic của các chủng biểu hiện quá mức *ACS*

Sự biểu hiện quá mức của *ACS1* trong YPH499 cũng như chủng bị phá vỡ *ACH1* từ nó đã không có ảnh hưởng đáng kể đến sự tạo thành axit axetic, thay vì một sự giảm nhẹ về khả năng tạo cồn của các chủng này.

Sự biểu hiện quá mức của *ACS2* đã làm giảm đáng kể cả khả năng lên men cồn lẫn tạo axit axetic, xu hướng này tăng lên mạnh mẽ hơn khi một chủng vừa được biểu hiện quá mức *ACS2* vừa bị phá vỡ *ACH1*.

IV. KẾT LUẬN

Từ tất cả các kết quả trên chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

- Phá vỡ đồng thời *ALD2/3* không làm thay đổi khả năng tạo cồn cũng và axit axetic. Chủng bị xoá bỏ đồng thời *ALD2/3* vẫn có chung đặc tính với chủng đối chứng là tạo lượng axit axetic cao hơn trong môi trường có áp suất thẩm thấu cao.
- Phá vỡ *ACH1* không ảnh hưởng đáng kể đến sự tạo thành axit axetic. Sự biểu hiện quá mức của *ACS1* đã không ảnh hưởng lớn tới sự tạo thành axit axetic; ngược lại biểu hiện quá mức

ACS2 làm giảm đáng kể cả về khả năng tạo cồn lẫn axit axetic, điều này càng được thể hiện mạnh mẽ hơn khi vừa biểu hiện quá mức ACS2 vừa phá vỡ ACH1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akamatsu, S., Kamiya, H., Yamashita, N., Motoyoshi, T., Goto-Yamamoto, N., Ishikawa, T., Okazaki, N., Nishimura, A.: Effect of Aldehyde Dehydrogenase and Acetyl CoA Synthetase on Acetate formation in Sake mash. *J. of Bioscience and Bioengineering*, 90-5, 555-560 (2000).
2. Asano, T., Kurose N., Hiraoka N., Kawakita, S.: Effect of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase gene (*IDH1*, *IDH2*) disruption of Sake yeast on organic acid composition in Saka mash. *J. of Bioscience and Bioengineering*, 88-3, 258-263 (1999).
3. Chomczynski, P.: One-hour Downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry*, 201, 134-139 (1992).
4. Giestz and Schiestl: high-efficiency transformation of yeast. *Methods in Molecular and cellular Biology*, 5[5], 225-269 (1995).
5. Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580 (1983).
6. Kratzer, S., Schuller, H.J.: Carbon source-dependent regulation of the acetyl-coenzyme A synthetase encoding gene *ACS1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 161, 75-79 (1995).
7. Lee, F.-J.S., Lin, L.-W., and Smith, J.A.: A glucose-repressible gene encodes acetylCoA hydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 255, 5215-5223 (1980).
8. Lee, F.-J.S., Lin, L.-W., and Smith, J.A.: Acetyl-CoA hydrogenase involved in acetate utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1297, 99-104 (1996).
9. Meaden, P.G., Dickinson, F.M., Mifsud, A., Tessier, W., Westwater, J., Bussey, H., and Midgley, M.: The *ALD6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic, Mg²⁺-activated acetaldehyde dehydrogenase. *Yeast*, 13, 1319-1327 (1997).
10. Navarro-Aviño, J.P., Prasad, R., Miralles, V.J., Betino, R.M., and Serrano, R.: A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible *ALD2* and *ALD3* genes. *Yeast*, 15, 829-842 (1999).
11. Prass, R.L., Isohashi, F., and Utter, M.F.: Purification and characterization of an extramitochondrial acetyl coenzyme A hydrolase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 255, 5215-5223 (1980).
12. Remize, F., Andrieu, E., and Dequin, S.: Engineering of the Pyruvate dehydrogenase Bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the cytosolic Mg²⁺ and mitochondrial K⁺ acetaldehyde dehydrogenase *Ald6p* and *Ald4p* in acetate formation during alcoholic fermentation. *Applied and environmental Microbiology*, 66-8, 3151-3159 (2000).
13. van den berg, M.A., Steensma, H.Y.: *ACS2*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase, essential for growth on glucose. *Eur. J. Biochem.*, 231, 704-713 (1995).
14. van den berg, M.A., de Jong-Gubbels, P., Kortland, C.J., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., and Steensma, H.Y.: The two acetyl-coenzyme A synthetase of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J. Biol. chem.*, 271, 28953-28959 (1996).

Summary

Study on the role of Acetaldehyde dehydrogenase *ALD2/3* and Acetyl CoA hydrolase *ACH1* in acetate formation during alcohol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

To understand the mechanism of acetate production during fermentation more clearly, the disruption or overexpression of some genes encoding enzymes in PDH bypass were investigated. The double *ALD2/3* disrupted strain exhibited unchanged alcohol and acetate productivity compared to wild type strain. The deletion of *ALD2/3* did not change the high acetate productivity on hyper-osmotic medium. The disruption of *ACH1* did not affect acetate production significantly. The *ACS2* overexpressing strain had a remarkable decrease in acetate and alcohol productivity. Especially, this trend exhibited more strongly by a strain disrupted *ACH1* and overexpressed *ACS2* simultaneously.

THU NHẬN VÀ TINH SẠCH PROTEAZA KIỀM TỪ DỊCH NUÔI CẤY *B. BREVIS B₁*, PHÂN LẬP TẠI HÀ NỘI

NGUYỄN LIÊU BA, LÊ VAN NHƯNG - ĐHBK Hà nội
NGUYỄN QUỐC KHANG - ĐHKHTN - ĐHQG Hà nội
NGUYỄN THỊ DUY - Viện Công nghiệp thực phẩm

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hầu hết những proteaza kiềm có nguồn gốc vi sinh vật phổ biến trên thị trường thế giới thường được sản xuất từ các chủng *Bacillus* [4]. Proteaza kiềm được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa và công nghiệp thuộc da. Thu nhận proteaza kiềm ở dạng tinh sạch rất phức tạp và hệ số thu nhận chỉ đạt khoảng 8,8÷ 30%.

Bài báo này trình bày kết quả thu nhận proteaza kiềm từ dịch nuôi cấy *B. brevis B₁* phân lập tại Hà nội.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Dịch nuôi cấy *B. brevis B₁* phân lập tại Hà nội.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này đều ở dạng tinh khiết dùng cho phân tích sản xuất tại Đức, Tiệp, Liên Xô cũ, Trung Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định hàm lượng protein hòa tan theo Lowry với protein tiêu chuẩn là albumin của huyết thanh bò [3].

Xác định hoạt độ enzym theo phương pháp Anson cải tiến [7].

Điện di trên gel polyacrylamit theo phương pháp của Laemmli [2].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.

3.1. Tách enzym từ dịch nuôi cấy *B. brevis B₁*

Sau khi kết thúc lên men, để thu enzym, trước hết cần làm lắng tế bào vi sinh vật và loại bỏ cặn thô của dịch canh trường, sau đó chiết rút và lọc. Quá trình này là một giai đoạn quan trọng nhất và khó khăn nhất trong kỹ thuật sản xuất chế phẩm enzym. Những phương pháp lọc khác nhau đã được tiến hành: lọc không có chênh lệch áp suất, lọc hút chân không và lọc kết hợp sử dụng các chất trợ lọc. Kết quả thử nghiệm với 100ml dịch nuôi cấy thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

Khảo sát các phương pháp tách cặn và xác tế bào để thu dịch enzym

Phương pháp lọc	Chất trợ lọc (g)	Thời gian (h)	Áp suất (at)	Thể tích sau lọc (ml)
Lọc bằng giấy lọc	0.0	24	0.0	73

Lọc hút chân không	0.0	4	-0.92	80
Lọc hút chân không có bổ sung diatomit	1.0	4h15	-0.92	78
Lọc hút chân không có bổ sung than hoạt tính	0.5	5	-0.95	75
	1.0	5	-0.97	70

Thí nghiệm cho thấy, khi lọc không chênh lệch áp suất thì thời gian kéo dài (24 giờ). Phương pháp này không kinh tế vì chất lượng dịch lọc không đảm bảo và tốn thời gian. Lọc hút chân không đã rút ngắn thời gian lọc xuống còn 4 giờ. Bổ sung chất trợ lọc diatomit hoặc than hoạt tính có làm cho dịch lọc trong hơn nhưng thao tác phức tạp mà khả năng lọc lại không tăng. Như vậy, với dịch lên men của chủng *B. brevis B₁* giải pháp được đề xuất là lọc hút chân không. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Phadataré và cộng sự [6].

Có nhiều tài liệu giới thiệu khả năng làm kết tủa enzym bằng các muối vô cơ và các dung môi hữu cơ. Trong thí nghiệm này, enzym được kết tủa ở nhiệt độ 4°C -10°C nhờ các tác nhân là: CaCl₂, Na₂SO₄, dung dịch (NH₄)₂SO₄ bão hòa, metanol, etanol và axeton với những nồng độ khác nhau. Các kết tủa thu bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút, đem hòa tan vào trong dung dịch đệm photphat pH 9,7 và xác định hoạt độ enzym, rồi so sánh với dịch enzym trước khi kết tủa. Kết quả thử nghiệm chỉ ra dưới đây (Bảng 2).

Bảng 2

Khảo sát một số tác nhân gây kết tủa với enzym proteaza kiềm tính từ chủng *B. brevis B₁*

Tác nhân kết tủa	Dịch enzym (ml)	Lượng tác nhân kết tủa	Nhận xét	Hoạt độ % so với ban đầu
CaCl ₂	80-90	10-20g	Không tủa	-
Na ₂ SO ₄	80-85	15-20g	Không tủa	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	10-20g	Kết tủa	96,3
Metanol	20	40ml-80ml	Kết tủa	57,7
Etanol 90%	20	40ml-80ml	Kết tủa	79,4
Axeton	20	40ml-80ml	Kết tủa	94,2

Số liệu phân tích cho thấy, (NH₄)₂SO₄, metanol, etanol và axeton đều có khả năng làm kết tủa enzym ở nhiệt độ 0° ÷ 10°C. Khi sử dụng tác nhân kết tủa là etanol và axeton, hoạt độ của chế phẩm không phụ thuộc vào nồng độ chất kết tủa, nhưng hoạt độ của chế phẩm tăng lên cùng với sự tăng nồng độ của metanol, đặc biệt đối với (NH₄)₂SO₄. Hiệu suất thu hồi enzym khi kết tủa bằng axeton và (NH₄)₂SO₄ cao hơn hẳn so với kết tủa bằng etanol và metanol. Mặt khác, kết tủa nhận được khi dùng (NH₄)₂SO₄ có màu sẫm, dính như keo, còn axeton cho kết tủa sáng màu hơn, bột dính hơn. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Keay [1].

Trên cơ sở khảo sát giá cả cũng như phổ biến trên thị trường và suy xét tính độc hại khi phải tiếp xúc nếu sản xuất ở qui mô công nghiệp, chúng tôi chọn (NH₄)₂SO₄ làm tác nhân kết tủa và tiếp tục nghiên cứu điều kiện thích hợp cho thu nhận proteaza kiềm từ dịch nuôi cấy chủng *B. brevis B₁*.

Quá trình kết tủa enzym chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố. Yếu tố quan trọng có tính quyết định hiệu quả quá trình là tỷ lệ giữa dịch enzym với chất gây kết tủa. Để xác định ảnh hưởng của lượng chất gây kết tủa chúng tôi bổ sung (NH₄)₂SO₄ ở dạng tinh thể vào 100ml dịch enzym cho đạt tới nồng độ nghiên cứu còn các thông số khác không đổi. Hoạt độ enzym của kết tủa và dịch trong được xác định bằng phương pháp đã mô tả rồi biểu diễn theo % so với hoạt độ ban đầu. Kết quả thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

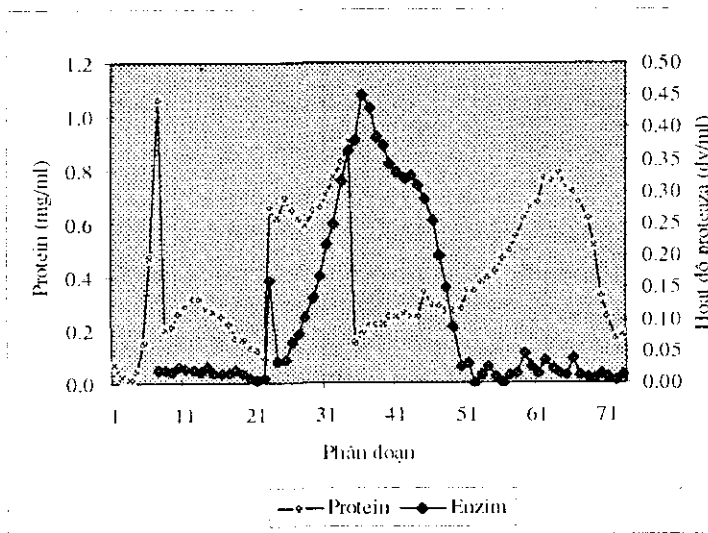
Ảnh hưởng của nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đến khả năng kết tủa proteaza kiềm từ chủng *B. brevis B_1*

%nồng độ bão hoà $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Hoạt độ enzym còn lại trong dịch (%)	Hoạt độ enzym trong kết tủa(%)
20	97,9	-
33	92,5	5
44	69,6	29
50	12	85,4
55	2	95,5
60	-	96,3

Số liệu bảng trên cho thấy, ở nồng độ 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ so với bão hòa vẫn thu được kết tủa nhưng không có hoạt tính enzym. Điều đó chứng tỏ ở nồng độ này chỉ protein tạp kết tủa. Tăng dần nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thì protein-enzim kết tủa và đạt tới tối đa (96,3%) ở nồng độ 60% so với bão hòa. Như vậy, đối với dịch nuôi cấy của chủng *B. brevis B_1* thì nồng độ thích hợp để kết tủa protein-enzim là 55 - 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ so với bão hòa. Kết quả này cũng tương tự các kết quả thu được của các tác giả Nakao, Nakayama và Harada [5].

3.2. Tinh sạch enzym

Proteaza kiềm từ dịch nuôi cấy *B. brevis B_1* được tinh sạch nhiều lần qua các bước:



Dịch enzym sau khi kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa và loại muối được tiến hành sắc ký qua cột Sephadex G-75 (2,5 x 100cm), chiết rút bằng đệm photphat 0,05M có pH 8,5; tốc độ 20ml/giờ, thu các phân đoạn sắc ký sau mỗi ống 5ml. Kết quả chỉ ra ở sắc ký đồ hình 1.

Hình 1: Sắc ký đồ proteaza qua cột Sephadex G-75 (2,5 x 100cm)

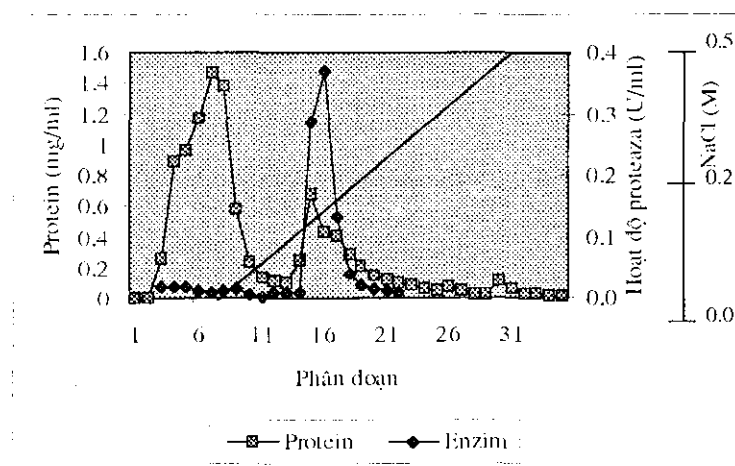
Sắc ký đồ cho thấy: dịch sau khi kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa vẫn còn lẫn nhiều tạp chất nên xuất hiện nhiều đỉnh.

- Protein có năm đỉnh hấp thụ quang phổ ở 280 nm, trong đó đỉnh thứ nhất protein có hàm lượng cao ngay từ phân đoạn 5 đến 8, đỉnh thứ hai từ phân đoạn 9 đến 21, đỉnh thứ ba từ phân đoạn 22 đến phân đoạn 34 là đỉnh protein khá tập trung và có lõm giữa nên phân thành hai đỉnh phụ. Đỉnh thứ năm phân bố rộng từ phân đoạn 50 đến phân đoạn 70 và cũng là đỉnh có hàm lượng protein cao hơn cả. Như vậy thành phần protein trong dịch chiết canh trường nuôi cấy *B. brevis B₁* khá phức tạp.

- Căn cứ trên sắc ký đồ lọc gel Sephadex-G75, đỉnh có hoạt động enzym nằm ở đoạn giữa, phân đoạn từ 21 đến 51 cho hoạt độ enzym cao nhất (0.450 U/ml).

Vì chế phẩm còn lẫn nhiều tạp chất nên chúng tôi thu thể tích của những phân đoạn này đem cô đặc rồi cho sắc ký tiếp tục qua CM-xenluloza (2 x 7cm), tách rút bằng gradient 0-0,5M NaCl trong đệm photphat 0,05M có pH 6.0, tốc độ 20ml/giờ chia làm 5 ml/ống mỗi phân đoạn.

Kết quả thể hiện qua sắc ký đồ hình 2.



Hình 2: Sắc ký đồ qua cột CM-xenluloza (2 x 7cm)

Từ sắc ký đồ cho thấy proteaza được tách ra ở đỉnh protein thứ hai (phân đoạn 14 đến 17) với nồng độ muối tách rút vào khoảng 0,2 M - 0,25M NaCl. Như vậy trong điều kiện thí nghiệm này, dịch enzym sau khi đi qua cột CM-xenluloza có độ tinh khiết khá cao (0,37 U/ml). Kết quả của các bước tinh sạch proteaza từ canh trường nuôi cấy

B. brevis B₁ thể hiện trong bảng 4.

Bảng 3

Mức độ làm sạch và hiệu suất thu hồi chế phẩm proteaza kiềm từ chủng *B. brevis B₁* qua các bước tinh chế

Các bước làm sạch	Protein tổng (mg)	Hoạt độ proteaza		Mức độ sạch (lần)	Hiệu suất thu hồi (%)
		Chung (U)	Riêng (U/mgP)		
Dịch thô	612	4236	6,900	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 60% bão hòa	207,01	4070,8	19,665	2,85	96,1
Sephadex G-75	56,72	1800,3	31,740	4,6	42,5
CM-Xenluloza	26,96	1618,75	60,030	8,7	38,2

Các dẫn liệu bảng 4 cho thấy, proteaza kiềm từ chủng *B. brevis B₁* có thể tinh sạch bằng phương pháp đơn giản qua các bước chiết rút, kết tủa nhờ (NH₄)₂SO₄ 60% bão hòa - sắc ký lọc gel qua cột Sephadex G-75 và trao đổi cation. Chế phẩm thu được có độ hoạt động riêng tăng 8,7 lần; hiệu suất thu hồi là 38,2%.

IV. KẾT LUẬN

Có thể khai thác enzym từ dịch nuôi cấy *B. brevis B₁* bằng phương pháp lọc hoặc bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sử dụng phối hợp các biện pháp làm sạch đã thu được chế phẩm proteaza kiềm với hoạt độ riêng tăng 8,7 lần, hiệu suất khai thác là 38,2%.

SUMMARY

OBTAINING AND PURIFICATION ALKALINE PROTEASE

FROM THE CULTURE OF A *B. BREVIS B₁* ISOLATED IN HANOI

The enzyme may be obtained from the culture of a *B. brevis B₁* by filtration or by using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The preparation alkaline protease with specific activity increased 8,7 times, yield 38,2% by enzyme activity has been defined by application of combination of purifications methods.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Keay Leonard, Bernard. S. Wildi, ...Biotechnology and Bioeng. Volume: XII; page 213-249, 1970.
2. Laemmli U. K. 1970. *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature: 680-685.
3. Lowry O. H. Rosebrough N. J., Farr. A. L., Raldah R. J. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal Biol. Chem. Vol. 193, 1951, 265-275
4. Matshubara H., Kasper C. B., Brown D. M. J. Biochem. 240, 1125-1134, 1965.
5. Nakao M. Nakayama T. et al. (1994) Appl Microbiol Biotechnol 41:337-343.
6. Phadatar Sangita U., Mandyan C. Srinivasan. Microb. Technol. 1993, Vol: 15.

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH ENZYM HUYẾT THANH Ở MỘT SỐ GIỐNG DÊ LAI F₁ VÀ SO SÁNH VỚI CÁC GIỐNG DÊ NỘI, NGOẠI NUÔI Ở VIỆT NAM

NGUYỄN ANH - TRINH THỊ KIM THOA

Viện Công nghệ sinh học

I. ĐẶT VẤN ĐỀ:

Trên thế giới, nhiều công trình nghiên cứu đã nhận thấy rõ vai trò của một số enzym huyết thanh như aminotransferaza (GOT, GPT), photphataza kiềm, axit có mối liên quan chặt chẽ với khả năng sinh trưởng phát triển, khả năng sinh sản và năng suất giống ở động vật chăn nuôi. Các tác giả cũng khẳng định đây chính là những chỉ tiêu sinh lý, hoá sinh và di truyền giúp cho việc tiên đoán năng suất động vật và trên cơ sở đó lựa chọn những cặp giống gia súc để phục vụ công tác lai tạo giống và lưu giữ nguồn gen quý hiếm.

Do đó, việc nghiên cứu điều tra cơ bản về hoạt tính của các enzym huyết thanh kể trên ở một số giống dê lai F₁ và so sánh với các giống dê nội, ngoại được nuôi dưỡng ở Việt Nam là vấn đề cần thiết cho công tác chăn nuôi, lai tạo giống hiện nay.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

Máu được lấy từ 40 con dê khoẻ mạnh từ 12-24 tháng tuổi, có trọng lượng từ 20-40kg, được nuôi tại nhà nuôi của Viện Công nghệ sinh học và Trung tâm nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây.

- Máu dê ngoại được lấy từ 40 dê con dê ngoại thuộc những giống : Beetal, Barbary, Jamuirapary và Bách Thảo được nuôi tại Trung tâm nghiên cứu dê thỏ Sơn Tây.

- Máu được lấy từ 90 con dê lai F₁ của 9 cặp lai : Barbary với Bách thảo (A x BT), Barbary với Jamuirapary (A x J), Beetal với Bách thảo (B x BT), Beetal với cỏ (B x C), Bách thảo với cỏ (BT x C), Bách thảo với Jamuirapary (BT x J); Jamuirapary với cỏ (J x C).

- Hoạt tính enzym Aminotransferaza (GOT, GPT) xác định theo phương pháp Reitman - Frelkel, đo trên máy so màu quang điện ERMA với bước sóng $\lambda = 470\text{nm}$.

- Hoạt tính enzym photphataza kiềm, axit được xác định theo phương pháp Bodan với cơ chất - glyxero photphat, đo trên máy so màu quang điện với bước sóng $\lambda = 420\text{nm}$.

I. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

Trên bảng 1 Là kết quả phân tích hoạt tính của enzym huyết thanh. Aminotransferaza và photphataza của một số giống dê lai F₁ được nuôi tại Việt Nam.

Enzym Aminotransferaza: GOT (glutamic Oxaloacetic Transaminaza) của các giống dê lai F₁ có hoạt tính được sắp xếp theo thứ tự giảm dần từ cao xuống thấp:

- Giống dê Barbary lai với dê Bách thảo (AxBT) là $1,490 \pm 0,100 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

- Giống dê Barbary lai với dê cỏ (A x C) là $1,160 \pm 0,090 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

- Giống dê Jamuirapary lai với dê Bách thảo (JxBT) là $1,130 \pm 0,080 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

- Giống dê Jamuirapary lai với dê cỏ (JxC) là $1,080 \pm 0,090 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

- Giống dê Beetal lai với dê cỏ (BxC) là $1,000 \pm 0,070 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

- Giống dê Barbary lai với dê Beetal (AxB) là $0,930 \pm 0,170 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

- Giống dê Jamuirapary lai với dê Barbary (J x A) là $0,860 \pm 0,040 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

- Hoạt tính của enzym GOT huyết thanh trung bình của các giống dê lai F_1 là $1,090 \pm 0,090 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

Enzym Aminotransferaza: GPT (glutamic pyruvic Transaminaza) huyết thanh của các giống dê lai F_1 có hoạt tính được sắp xếp theo thứ tự giảm dần từ cao xuống thấp như sau:

- Giống dê Jamuirapary lai với dê cỏ (JxC) là $2,290 \pm 0,280 \mu\text{mol/ml/giờ}$.
- Giống dê Jamuirapary lai với dê Bách thảo (JxBT) là $2,260 \pm 0,190 \mu\text{mol/ml/giờ}$.
- Giống dê Beetal lai với dê cỏ (BxC) là $2,240 \pm 0,200 \mu\text{mol/ml/giờ}$.
- Giống dê Barbary lai với dê cỏ (AxC) là $2,040 \pm 0,190 \mu\text{mol/ml/giờ}$.
- Giống dê Barbary lai với dê Bách thảo (AxBT) là $1,890 \pm 0,140 \mu\text{mol/ml/giờ}$.
- Giống dê Barbary lai với dê Beetal (AxB) là $1,700 \pm 0,100 \mu\text{mol/ml/giờ}$.
- Giống dê Jamuirapary lai với Barbary (JxA) là $1,460 \pm 0,250 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

- Hoạt tính enzym GPT huyết thanh trung bình của tất cả các giống dê lai F_1 là $1,980 \pm 0,190 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

Enzym phosphataza kiềm (Alkaline phosphatase huyết thanh của các giống dê lai F_1 có hoạt tính được sắp xếp theo thứ tự giảm dần từ cao xuống thấp như sau:

- Giống dê Jamuirapary lai với dê Barbary (JxA) là $5,455 \pm 1,136$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Jamuirapary lai với dê cỏ (J x C) là $4,090 \pm 0,690$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Barbary lai với dê Beetal (A x B) là $3,484 \pm 0,590$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Beetal lai với dê cỏ (B x C) là $3,406 \pm 0,600$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Barbary lai với dê Bách thảo (A x BT) là $3,295 \pm 0,557$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Barbary lai với dê cỏ (A x C) là $2,977 \pm 0,843$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Jamuirapary lai với dê Bách thảo (JxBT) là $2,046 \pm 0,540$ đơn vị Bodan.

- Hoạt tính của enzym phosphataza kiềm của tất cả các giống dê lai trung bình là $3,540 \pm 0,710$ đơn vị Bodan

Enzym phosphataza axit (Acid phosphatazase) huyết thanh của các giống dê lai F_1 có hoạt tính được sắp xếp theo thứ tự giảm dần từ cao xuống thấp như sau.

- Giống dê Jamuirapary lai với dê Barbary (J x A) là $1,307 \pm 0,057$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Beetal lai với dê cỏ (B x C) là $1,137 \pm 0,230$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Jamuirapary lai với dê cỏ (J x C) là $1,136 \pm 0,190$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Jamuirapary lai với dê Bách thảo (JxBT) là $1,022 \pm 0,180$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Barbary lai với dê cỏ (A x C) là $0,909 \pm 0,095$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Barbary lai với dê Bách thảo (A x BT) là $0,664 \pm 0,111$ đơn vị Bodan.
- Giống dê Barbary lai với dê Beetal (A x B) là $0,617 \pm 0,110$ đơn vị Bodan.

- Hoạt tính enzym phosphataza axit huyết thanh trung bình của tất cả các giống dê lai F_1 là $0,970 \pm 0,140$ đơn vị Bodan.

Qua những số liệu trên chúng tôi nhận thấy hoạt tính của hai enzym GOT, GPT huyết thanh ở những giống dê lai F_1 có sự sai khác giữa các giống, mặc dầu sự chênh lệch không nhiều. Điều này cũng chứng tỏ những giống dê lai F_1 trong điều kiện khí hậu và động vật nuôi dưỡng ở Việt Nam đã thích nghi. Những enzym trên đã ổn định màn tính di truyền của từng

giống. Smirnov 1974 cho rằng hoạt tính GOT, GPT thuộc loài động vật có sừng theo hướng sữa thì giữa chúng ít khác nhau qui luật này cũng tương tự đối với động vật hướng thịt, song ở động vật có sừng hướng thịt hoạt tính enzym này cao hơn ở động vật hướng sữa một cách đáng kể.

So sánh với kết quả phân tích của một số tác giả ở nước ngoài như Basilio Flovis và cộng sự, 1992 và Chiofalo và cộng sự, 1982 có thấp hơn đôi chút. Điều đó cũng rõ ràng phù hợp với nhận định của Smirnov. Hoạt tính của hai enzym này có sự sai khác nhau giữa các giống và các điều kiện địa lý, khí hậu xa cách nhau. Còn về kết quả hoạt tính hai enzym photphataza kiềm, axit trong huyết thanh của những giống dê F₁ có khác nhau. Giữa các giống dê lai F₁, sự chênh lệch của hoạt tính photphataza kiềm lớn hơn, của hoạt tính photphataza axit.

Số liệu của chúng tôi thu được phù hợp với của Chiofalo và c.s 1985 nghiên cứu hoạt tính enzym photphataza kiềm ở giống dê Tibetan Drarf. Nguyễn Thiện và cộng sự, 1993 đánh giá cao về năng suất sữa ở hai giống Jamuirapari và Barbari phù hợp với Coabris và cộng sự (1985) đã phát hiện được hàm lượng mỡ, sữa có mối liên quan chặt chẽ với hoạt tính enzym photphataza trong huyết thanh. Nhận định của các tác giả trên phù hợp với kết quả phân tích của chúng tôi ở huyết thanh các giống dê lai F₁.

Bảng 1: Hoạt tính enzym huyết thanh (aminotransferaza: GOT, GPT và photphataza kiềm, axit) của một số giống dê lai F₁ nuôi tại Việt nam.

Enzym Giống lai	Aminotransferaza (μ mol/ml/giờ)		Photphataza (Đơn vị Bodan)	
	GOT	GPT	Kiểm	Axit
Ax BT n=10	1,49±0,10	1,89±0,14	3,295±0,557	0,664±0,111
A x C n=10	1,16±0,09	2,04±0,19	2,977±0,843	0,909±0,095
AxB n=10	0,93± 0,17	1,70± 0,10	3,484± 0,590	0,617±0,110
JxA n=10	0,86± 0,04	1,46± 0,25	5,455±1,136	1,307± 0,057
JxC n=10	1,08± 0,09	2,29± 0,28	4,094± 0,690	1,136±0,190
BxC n=10	1,00± 0,070	2,24± 0,20	3,406± 0,600	1,137± 0,230
JxBT n=10	1,13± 0,08	2,26± 0,790	2,046± 0,540	1,022± 0,180
LAI CHUNG	1,090± 0,090	1,980± 0,190	3,540± 0,710	0,970± 0,140

Ở bảng 2 được thể hiện kết quả phân tích hoạt tính enzym huyết thanh so sánh giữa ba giống nội dê ngoại và dê lai kinh tế F₁ được nuôi ở Việt Nam.

Enzym aminotransferaza: GOT (glutamic Oxaloacetic transaminaza) huyết thanh có hoạt tính trung bình ở các giống dê theo thứ tự cao xuống thấp:

Cao nhất ở giống dê nội có GOT là $1,670 \pm 0,160 \mu\text{mol/ml/giờ}$, sau đó đến giống dê lai F₁ có GOT là $1,090 \pm 0,090 \mu\text{mol/ml/giờ}$ và thấp nhất ở giống dê ngoại có GOT là $1,070 \pm 0,140 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

Enzym aminotransferaza : GPT (Glutamic pyruvic transaminaza) huyết thanh có hoạt tính trung bình ở các giống dê theo thứ tự sắp xếp:

Cao nhất ở giống dê nội có GOT là $2,370 \pm 0,680 \mu\text{mol/ml/giờ}$, sau đó đến giống dê lai F₁ có GPT là $1,980 \pm 0,190 \mu\text{mol/ml/giờ}$ và thấp nhất ở giống dê ngoại có GPT là $1,498 \pm 0,173 \mu\text{mol/ml/giờ}$.

Enzym phosphataza kiềm huyết thanh có hoạt tính trung bình ở các giống dê theo thứ tự sắp xếp:

Cao nhất ở giống dê cao lai F₁ có hoạt tính là 3,540±0,710 đơn vị Bodan, sau đó đến giống dê ngoại có hoạt tính enzym là 3,393±1,240 đơn vị Bodan và thấp nhất ở giống dê nội có hoạt tính enzym là 2,150±0,510 đơn vị Bodan.

Enzym phosphataza axit huyết thanh có hoạt tính trung bình ở các giống dê theo thứ tự sắp xếp:

Cao nhất ở giống dê ngoại có hoạt tính enzym là 1,464±0,210 đơn vị Bodan, sau đó đến giống dê nội có hoạt tính enzym là 1,023±0,150 đơn vị Bodan và thấp nhất ở giống dê lai F₁ có hoạt tính enzym là 0,970±0,140 đơn vị Bodan.

Qua kết quả trên về hoạt tính của các enzym huyết thanh ở các giống dê nội, ngoại, lai F₁ có sự sai khác tuy nhiên mức độ chênh lệch không đáng kể hai enzym GOT, GPT huyết thanh đều có hoạt tính được sắp xếp giảm dần theo thứ tự ở các giống: Dê nội, dê lai, dê ngoại. Điều đó một phần thể hiện ở giống dê nội nhu cầu vận chuyển các nhóm amin để tổng hợp protein trong cơ thể cao hơn ở các giống dê lai và dê ngoại và một phần thể hiện tính ổn định hoạt tính enzym aminotranpheraza ở các giống dê nuôi tại Việt Nam. So sánh với hoạt tính hai enzym này ở giống dê nước ngoài của các tác giả Chiofalo và cộng sự, 1982 và Basilio Floris, Mer Paolo Bini, Gianpaolo Pintori, 1992 thì kết quả của chúng tôi thấp hơn đôi chút. Còn nhóm enzym photphataza kiềm axit và nhất là ở nhóm kiềm ở giống dê ngoại và lai F₁ cao hơn ở giống dê nội. Điều đó có thể giải thích là do ở các giống dê ngoại và lai F₁ các enzym này cần tham gia trong quá trình tạo xương, trao đổi cacbon, lipid và axit nucleic mạnh mẽ hơn ở giống dê nội. So sánh với kết quả ở các giống dê nước ngoài của các tác giả Chiofalo, Magisbri và cộng sự, 1982.

Thì kết quả hoạt tính enzym photphataza axit của chúng tôi lại cao hơn đôi chút có nghĩa là kết quả về hoạt tính enzym này của chúng tôi và của các tác giả nước ngoài đều thống nhất dao động trong một khoảng hẹp cho phép và ổn định của các giống dê nói chung.

Bảng 2: Hoạt tính enzym huyết thanh của ba giống dê nội, ngoại và lai kinh tế F₁.

Giống	Enzym		Phosphataza (Đơn vị Bodan)	
	Aminotransferaza (µmol/ml/giờ)		Kiểm	Axit
	GOT	GPT		
Nội	1,67±0,16	2,37±0,08	2,15±0,51	1,023±0,150
Ngoại	1,07±0,14	1,498±0,173	3,393±1,24	1,464±0,210
Lai F ₁	1,090±0,090	1,980±0,190	3,540±0,710	0,970±0,140

I. KẾT LUẬN:

1. Hoạt tính các enzym huyết thanh ở những giống dê lai khác nhau có khác nhau :

Enzym GOT huyết thanh ở giống dê lai Barbary với Bách thảo có hoạt tính cao nhất và ở giống dê lai Jamuirapary với Barbary có hoạt tính thấp nhất.

- Enzym GPT huyết thanh ở giống dê lai Jamuirapary với dê cỏ có hoạt tính cao nhất và ở giống dê lai Jamuirapary với Barbary có hoạt tính thấp nhất.

-Enzym photphataza kiềm ở giống dê lai Jamuirapary với Barbary có hoạt tính cao nhất và ở giống dê lai Jamuirapary với Bách thảo có hoạt tính thấp nhất.

- Enzym photphataza axit ở giống dê lai Jamuirapary với Barbary có hoạt tính cao nhất và ở giống dê lai Barbary với Beetal có hoạt tính thấp nhất.

2. So sánh enzym huyết thanh của giống dê lai F₁ với các giống dê nội và ngoại: Hai enzym GOT, GPT huyết thanh đều có hoạt tính được sắp xếp thứ tự theo chiều giảm dần: Dê

nội, dê lai F₁ và dê ngoại. Còn 2 enzym photphataza kiềm, axit ở giống dê ngoại và dê lai F₁ cao hơn ở giống dê nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Basilio Floris, Giovanni Maria Cubeddu, Pier Paolo Bini, Giampaolo Pintori, (1992) : " Blood Parameters in the Sardinian Goat". Obietivi e documenti verinati (I taly). ISSN 0392 - 1913 (Mar. 1992).
2. Kohlerova. J, Lossmann. J, Krasa. 1, Simek, M, Rudolfova. S (1991).
3. Mahabile w. 1990. Blood parameters of goat in Botswana. Tropical agriculture (Trinidad and tobago) ISSN 0041 - 3216 October 1990.
4. Romagnoli Aldo, 1992: " Relationship of concentration of some plazma constituenis with milk and physiological status in dairy goat". Annali della Facolta di medecina Veterinaria di pisa (I taly) ISSN 0365 - 4729 (1991).
5. Smirnov O.K, 1974 : Tiên đoán năng suất động vật. NXB Bông lúa Moskva (Tiếng Nga).

Improving IMPORTED QUALITY RICE VARIETIES USING INDUCED MUTATION TECHNIQUE.

DO HUU AT*, BUI HUY THUY*, TRAN DUY QUY*
NGUYEN HUU DONG* AND NGUYEN MINH CONG**

I/ INTRODUCTION:

In ten innovation years recently, we have been achieving great achievement in agricultural field. From the country that is short of food in the war, Vietnamese rice was exported into world market with the second position, after Thailand, now. However, our price of exported rice is usually lower than that one of Thailand about 25-30 USD/ton. One of these causes is our rice quality is low, processing technology is not very high. Therefore, studying, creating of new rice varieties for high yield, good quality, good resistance to diseases to service demands the domestic consumption and exporting are very necessary.

Our studying objects are improvement some imported quality rice varieties using induced technique.

II. MATERIAL AND METHOD:

2.1. Material:

- Bacthom number 7 rice seeds were collected from National Seed Company I.

*Institute of Agricultural genetics

**Hanoi Teacher Training University.

- Khangdan rice seeds: were collected from National Seed Company I

Both of them have the origin from China.

2.2. Method:

- Using nuclear technique to induce artificial mutations: rice seeds were divided by small bags with 1000 seeds for each bag, soaked in clean water until 36hrs for absorbing until saturation, cleaned, then kept them at temperature of 32°C in incubator until different time points of 66hrs, 69hrs, 72hrs and 75hrs. After that, they were exposed with lethal dosages of 10Krad, 15Krad, 20Krad and 25Krad with gamma rays (^{60}Co) at Hanoi Irradiation Center. They were sowed to receive the first generation (Mutation- M_1). In M_1 30 seeds at mean of each panicle from each main panicle were sowed to receive M_2 , at the same time, to discover some useful rice mutants for rice breeding.

- To treat data by biological statistics methods.

2.3. Experimental places:

- Experimental field of Institute of Agricultural Genetics (IAG).

- The national farm for variety evaluation and seed certification.

III. RESULT AND DISCUSSION:

In M_1 , the treated experiment lots with lethal dosage of 25Krad have died from the nursery. In M_2 , we have discovered some macro-mutations. The stem length is longer or shorter than that one of the control 20cm could be watched as high or short stem mutants. Panicle was longer or shorter than that one of the control 4cm could be watched as long or short panicle mutants. Size of seed was bigger than that one of the control could be watched as big seed. Table 1 was showed, lethal dosage of 15Krad; high stem mutation consequence was high. General calculating on two rice varieties (Bacthom number 7 and Khangdan rice Vars.) were high at time points of 69hrs (0.12 ± 0.06) and 75hrs (0.13 ± 0.06). However, high stem mutation

consequence is higher at lethal dosage of 20Krad-69hrs (0.21 ± 0.09). High stem mutation consequence is the lowest at lethal dosage of 15Krad-66hrs (0.02 ± 0.02). Short stem mutation consequence is the highest at time point of 66hrs with treated dosage of 10Krad. (0.10 ± 0.05) in total 4 treated time points (66hrs, 69hrs, 72hrs and 75hrs). This is as same as at lethal dosage of 15Krad-66hrs (0.16 ± 0.06). However, short stem mutation consequence is the highest at treated dosage of 20Krad with time point of 75hrs (0.24 ± 0.09). Generally calculating, on 3 lethal dosages (10Krad, 15Krad and 20Krad) at two rice varieties, lethal dosage of 10Krad at 72hrs treated time point having short stem mutation consequence is the lowest (0.03 ± 0.03) (Table 2).

Long and big grain mutants were easily observed visually by their size of grain and hull colour. The control Bacthom number 7 rice variety, hull has yellow colour but its mutants have yellow and dark brown colour hull. The kind of yellow hull has short awn and other kind hasn't awn. In Khangdan rice variety, the grain is also bigger than that one of the control, but hull colour is lost to become light yellow colour (The Khangdan control rice variety has yellow hull, too.). The big grain mutation consequence on two rice varieties was showed at Table 3. Its mutation consequence is increased at lethal dosages of 10Krad and 15Krad with treated time points of 66hrs and 69hrs (0.12 ± 0.05) and 0.29 ± 0.09) respectively. General calculating on 3 treated dosages with 4 different time points of 66hrs, 69hrs, 72hrs and 75hrs, lethal dosage of 15Krad at 66hrs treated time point appearing mutation consequence is the highest (0.29 ± 0.09).

There were two kinds of panicle mutation (long and short panicle) on Bacthom number 7 and Khangdan rice varieties. General calculating on 3 lethal dosages (10Krad, 15Krad and 20Krad) the highest mutation consequence was shown at lethal dosage of 15Krad with 66hrs treated time point (0.16 ± 0.06), other lethal dosages like 10Krad-72hrs, 20Krad-69hrs and 20Krad-75hrs weren't appeared (Table 4).

The short panicle mutation consequence was the highest at lethal dosage of 20Krad with 69hrs treated time point (0.26 ± 0.09) and the lowest at lethal dosage of 10Krad with treated time point 72hrs (0.03 ± 0.03) (Table 5).

As we know that, the irradiation sensitivity level of different phases in the first mitosis cycle on germinating seeds is different, and in arrangement order: $G_2 > M > S > G_1$ phase (Mashubayshi Iwao 1971). The rice breeding significant mutants were showed at time points of 66hrs-75hrs. These time points belong to G_2 phase - DNA post-synthetic phase. Maybe, the wet seeds were exposed by ^{60}Co resource with lethal dosages of 10Krad, 15Krad and 20Krad at these time points easily created useful mutants for rice breeding as above.

IV. Conclusion:

- Long or short stem mutation consequence appeared high at lethal dosage of 20Krad-75hrs (0.21 ± 0.29) and (0.24 ± 0.09), respectively.
- Long and big grain mutation consequence is the highest at lethal dosage of 15Krad-66hrs (0.29 ± 0.09).
- At lethal dosage of 15Krad with treated time point of 66hrs, long panicle mutation consequence was high (0.16 ± 0.06).
- Short panicle mutation consequence is the highest at lethal dosage of 20Krad-69hrs (0.26 ± 0.19).
- The macro-mutations could be selected at the lethal dosage interval of 10-20Krad. Rice breeding significance mutants appeared at dosages of 10Krad, 15Krad with irradiation treated time points of 66hrs-75hrs.

ABSTRACT

Two imported quality rice varieties (Bachthom number 7 and Khangdan rice varieties) were improved using induced mutation technique. Seeds of them were soaked in clean water until 36hrs, cleaned and kept them in incubator with temperature of 32°C until 66hrs, 69hrs, 72hrs and 75hrs. After that, they were exposed with lethal dosages of 10Krad, 15Krad, 20Krad and 25Krad with ⁶⁰Co resource at Hanoi National Irradiation Center. In M₁, 30 seeds from each main panicle of each individual were collected and sowed to receive M₂. From M₂, macro-mutations were discovered for rice breeding. The rice breeding significance mutants have been discovered at 10Krad, 15Krad lethal dosages with 66hrs, 69hrs, 72hrs and 75hrs wet treating time points.

References

- 1/ **Amano, E.** 1995. Development of breeding materials in rice by use of induced mutation, workshop on M. Breeding using radiation technology on cereal crop 10-1995, Philippines.
- 2/ **At D.H and Cong N.M.** 1995. Appearance of some promising mutants in the second-generation (M₂) when treating by gamma rays (⁶⁰Co) at different time points of the first mitosis cycle on germinating seeds of TAM THOM rice Variety. Genetics and Application Magazine. No 3-1995.
- 3/ **At D.H and Cong N.M.** 1996. Character of appearance of chlorophyll mutations in M₂ seedling period of TAM THOM rice Var. when treating gamma rays (⁶⁰Co) at different time points of germinating seeds in M₀. Scientific Announcement Magazine, Hanoi Teacher Training University No 1-1996.
- 4/ **Cong N.M, Ro P.V and At D.H.** 1999. Research and creation of new mutant rice variety "Tep hanh dot bien". Monthly journal of Agriculture and Food Industry, 4/1999.p 173-174.
- 5/ **Cong N.M, Ro P.V and At D.H and Thuc N.D.** 1999. To research and create of new mutant rice variety "Tai nguyen dot bien 100". Monthly journal of Agriculture and Food Industry, 5/1999.p210-212.
- 6/ **Joint FAO/IAEA.** 1987. Divisions of Isotope and Radiation Applications of Atomic Energy for Food and Agricultural Development International Atomic Energy Agency. 1987. Rice mutation breeding in California, Mutation Breeding Newsletter. Vienna. P13-14.
- 7/ **Joint FAO/IAEA.** 1997. Divisions of Isotope and Radiation Applications of Atomic Energy for Food and Agricultural Development International Atomic Energy Agency. 1997. The most widely cultivated rice variety "Zhefu 802" in China and its Genealogy. p3-7.
- 8/ **Kawai T, Amano E.** 1991. Mutation Breeding in Japan. Plan Mutation Breeding for Crop Improvement, International Atomic Energy Agency, Vienna. Vol.1, p 47-66.
- 9/ **Liang Qu.** 1996. Plant Mutation Breeding in Asia. China Agricultural Sciencetech Press.
- 10/ **Lin Qing Wang.** 1991. Induced mutation for crop improvement in China. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1991. Vol.1.p 9-32.
- 11/ **M.A. Awan.** 1991. Use of induced mutations for improvement in Pakistan. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement, Vol.1, p67-72. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- 12/ **Ro P.V and At D.H.** 2000 Improvement of traditional local rice varieties through induced mutations using nuclear techniques. Seminar on Methodology for Plant Mutation Breeding for quality: Effective use of Physical/Chemical Mutagens. October 9-13, 2000. Hanoi, Vietnam.

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH LÊN MEN TỔNG HỢP PROTEAZA KIỂM CỦA CHỦNG *B. BREVIS B₁* PHÂN LẬP TẠI HÀ NỘI

NGUYỄN LIÊU BA, LÊ VĂN NHƯỜNG - *DHKB HÀ NỘI*

NGUYỄN THỊ DUY - *Viện Công nghiệp thực phẩm*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Mối liên quan giữa việc hình thành proteaza ngoại bào với các điều kiện nuôi cấy vi sinh vật mang tính chất phức tạp. Một số vi sinh vật, ví dụ *B. subtilis*, có thể tổng hợp enzym tối nhất trong giai đoạn sinh trưởng, nhưng một số khác lại tổng hợp enzym với năng suất cao nhất sau khi pha sinh trưởng kết thúc, hoặc trong pha cân bằng hay thậm chí trong giai đoạn tạo bào tử [3]. Rất nhiều chủng vi sinh vật được phát hiện là chủng sản sinh enzym ngoại bào có khả năng tích lũy cực đại sau giai đoạn phát triển [5]. Những hiểu biết về đặc điểm quá trình tổng hợp enzym trong thời gian phát triển của vi khuẩn như thời gian, bản chất của quá trình và những yếu tố ảnh hưởng khác là rất quan trọng để nhận được enzym với hoạt độ cao. Trong công trình trước [1] chúng tôi đã trình bày việc thiết lập một công thức môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp proteaza kiểm của chủng *B. brevis B₁* phân lập tại Nhà máy xà phòng Hà Nội.

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu quá trình lên men sinh tổng hợp proteaza kiểm của chủng trên.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chủng vi khuẩn

Chủng *B. brevis B₁* phân lập từ mẫu nước thải Nhà máy xà phòng Hà Nội.

2. Môi trường lên men (%)

Bột đậu tương: 3; Tinh bột: 5; Khô lạc thủy phân: 2; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 0,09; CaCO_3 : 0,1; MgSO_4 : 0,05; KCl : 0,15; CaCl_2 : 0,01; pH= 7,0.

Môi trường được thanh trùng ở áp suất 1at trong thời gian 45 phút, trước khi tiếp giống được chỉnh pH tới 9,5-9,7 bằng dung dịch Na_2CO_3 20% đã thanh trùng.

3. Thiết bị lên men

Thiết bị lên men pilot 15 lit của Hungari đặt tại Khoa Công nghiệp Dược - Trường Đại học Dược Hà nội

4. Kỹ thuật nuôi vi khuẩn

Vi khuẩn được nuôi trong các bình tam giác dung tích 500 ml chứa 50 ml môi trường trên máy lắc ổn định nhiệt (37°C) với tốc độ 220 vòng/phút hoặc trong thiết bị lên men

pilot dung tích 15 lít chứa 5 lít môi trường, có hệ thống ổn định nhiệt, sục khí, phá bọt. Định kỳ lấy mẫu và đánh giá sự tổng hợp proteaza kiềm với cơ chất là casein theo phương pháp Anson cải tiến [7].

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của tuổi giống và thời gian lên men

Để xác định thời điểm tiếp giống thích hợp cho chủng *B. brevis B₁* trong các thí nghiệm sau này, 1 đến 2 vòng que cấy của chủng đã hoạt hóa được cấy vào 50 ml môi trường (pH ban đầu 9,7). Quá trình nhân giống thực hiện trên máy lắc (220 vòng/phút) ở nhiệt độ 37°C. Thông

thường, pha sinh trưởng theo hàm số mũ của vi khuẩn bắt đầu từ 16 giờ kéo dài đến 20 giờ, ở một số chủng đến 24 giờ. Bởi vậy, giống để tiếp vào môi trường lên men với tỷ lệ 10% có độ tuổi khác nhau là: 16h, 18h, 20h, 22h, 24h. Theo định kỳ, sau 30h, 36h, 40h, 44h, 48h lên men trên máy lắc (220 vòng/phút) ở nhiệt độ 37°C, tiến hành lấy mẫu và phân tích hoạt độ proteaza theo phương pháp đã mô tả. Kết quả trình bày ở hình 1 và bảng 1:

Bảng 1: Ảnh hưởng của tuổi giống và thời gian lên men đến quá trình sinh tổng hợp proteaza kiềm từ *B. brevis B₁*

N ^o	Tuổi giống (giờ)	Thời gian LM (giờ)	pH sau LM	HđP (U/ml)
1	16	30	8.5	3.12
2	16	36	8.5	3.20
3	16	40	8.5	4.84
4	16	44	8.5	4.93
5	16	48	8.5	4.43
6	18	30	8.5	2.475
7	18	36	8.5	2.716
8	18	40	8.5	3.117
9	18	44	8.5	4.84
10	18	48	8.5	3.68
11	20	48	8.5	3.36
12	22	48	8.5	3.52
13	24	38	8.5	4.00
14	24	40	8.5	4.28
15	24	44	8.5	3.84
16	24	48	8.5	3.840

Số liệu phân tích cho thấy thời gian nhân giống trong khoảng 16 giờ - 18 giờ và thời gian lên men là 44 giờ cho hoạt độ proteaza cao nhất. Thời điểm cấy truyền được chọn vào giờ thứ 17 cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2 Ảnh hưởng của điều kiện thông khí

Độ thông khí trong môi trường có ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh tổng hợp proteaza. Tuy nhiên, ảnh hưởng này có khác nhau tùy theo từng chủng vi sinh vật. Tăng thông khí đến giới hạn xác định thì sự phát triển của vi sinh vật cũng tăng theo. Đối với nhiều vi sinh vật, thông khí sẽ làm tăng tốc độ sinh trưởng, rút ngắn pha tiền phát, nâng cao lượng sinh khối. Trong một số trường hợp, thiếu oxy tuy có kìm hãm sinh trưởng của vi sinh vật nhưng lại làm tăng quá trình tổng hợp proteaza. Lượng oxy thích hợp cho các vi sinh vật không giống nhau. Ngay cả đối với một vi sinh vật nhất định, sự hiếu khí cũng ảnh hưởng khác nhau đến quá trình tổng hợp các proteaza khác nhau. Trong một số trường hợp, hiếu khí mạnh lại kìm hãm sinh tổng hợp proteaza. Chủng *B. brevis B₁* là vi khuẩn hiếu khí, vì vậy, trong quá trình nuôi cấy, lên men, lượng oxy hòa tan là một trong những yếu tố quan trọng có ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển cũng như khả năng sinh tổng hợp enzym. Khi nuôi cấy vi sinh vật hiếu khí trong các bình nhỏ đặt trên máy lắc, tốc độ hòa tan của oxy phụ thuộc vào tốc độ máy lắc (số vòng hoặc số lần lắc trong một phút) và kiểu lắc (lắc tròn hay lắc ngang), cũng như tỷ số thể tích môi trường với thể tích chung của bình. Trong điều kiện lên men trên máy lắc, chúng tôi nghiên cứu chế độ thông khí bằng cách cho vào bình tam giác lượng môi trường lên men khác nhau: 25ml, 50ml, 75ml, 100ml, 150ml, 200ml. Tiếp giống 10% so với lượng môi trường đưa vào. Phân tích hoạt độ proteaza sau 44 giờ lên men. Thí nghiệm được tiến hành trên máy lắc tròn. Kết quả thí nghiệm thể hiện ở bảng 2:

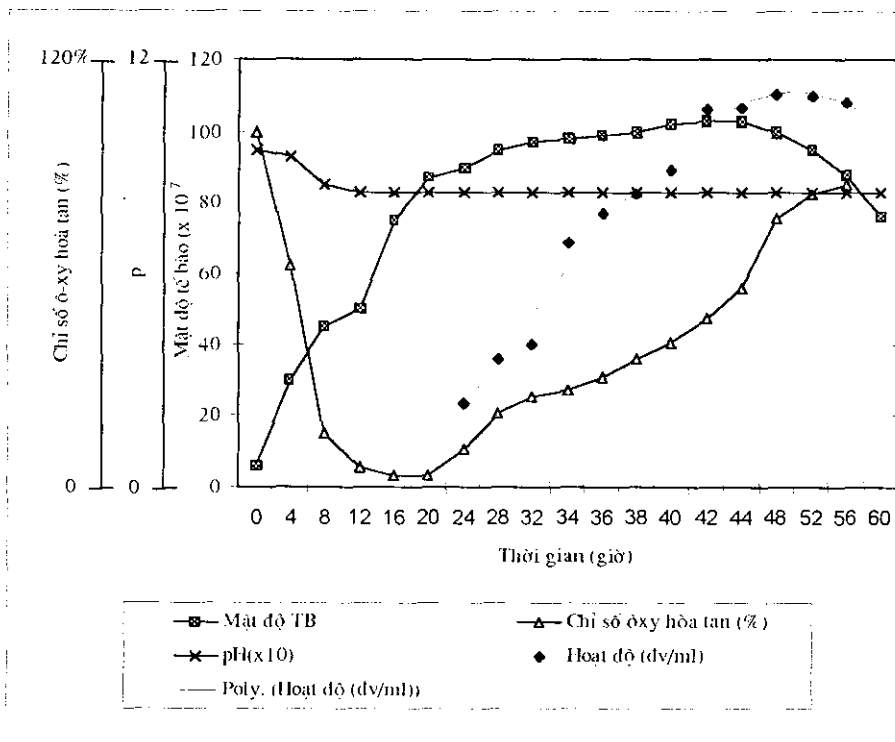
Bảng 2: Khảo sát điều kiện thông khí trên máy lắc tròn

N ^o	Thể tích dịch lên men trong bình lắc (ml)	pH sau LM	HĐ P(U/ml)
1	25	8.5	4.414
2	50	8.5	5.523
3	75	8.5	4.743
4	100	8.5	-

Kết luận có thể rút ra từ số liệu ở bảng 2 là: nếu lên men ở máy lắc tròn trong bình tam giác dung tích 500ml với 50ml môi trường sẽ đạt hoạt độ proteaza cao nhất. Ở chế độ này cho thấy chủng *B. brevis B₁* có nhu cầu oxy tương đối cao. Bằng cách xác định theo chỉ số sulfit thì độ thông khí này tương đương với mức độ sục khí theo tỷ lệ 1:1:1 và tốc độ khuấy là 400 vòng/phút ở bình lên men.

3.3 Động thái sinh trưởng và tổng hợp proteaza của chủng *B. brevis* B₁

Sau khi đã lựa chọn các thông số về lên men, chúng tôi tiến hành thực nghiệm ba đợt lên men ở pilot 15 lit tại phòng thí nghiệm khoa Công nghiệp Dược, trường Đại học Dược Hà nội. Thiết bị lên men có hệ thống phá bọt, role điều chỉnh nhiệt độ và bộ phận lấy mẫu phân tích. Sự thông khí thực hiện bởi hệ thống cánh khuấy. Tốc độ khuấy là 400 vòng/phút. Không khí sau khi qua bộ phận lọc vô trùng được cung cấp vào dịch canh trường nhờ máy nén khí. Tốc độ thông khí là: 1 lit không khí/1 lit môi trường/1 phút. Dung tích bình lên men 15 lit, lượng môi trường lên men thực tế là 11 lit. Giống được nuôi hiếu khí 16 giờ trên máy lắc. Sau khi tiếp giống, dịch lên men được đồng thời lấy vào bình tam giác 500 ml để tiến hành lên men đối chứng trên máy lắc. Số liệu phân tích cho phép xây dựng động thái quá trình sinh tổng hợp proteaza kiềm của chủng *B. brevis* B₁. Các biến động về pH môi trường, oxy hòa tan, sự tích lũy sinh khối cũng như tích tụ enzym được thể hiện trên hình 2.



Hình 2: Động thái quá trình sinh trưởng và tổng hợp proteaza của chủng *B. brevis* B₁

Theo dõi quá trình lên men, nhận thấy từ giờ thứ 12 có hiện tượng tạo bọt rất mạnh nên bắt đầu từ lúc này cân bổ sung chất phá bọt. Hai chất phá bọt được thử nghiệm là silicon và dầu ăn bình thường (dầu cánh buồm). Những phân tích sau lên men cho thấy khi sử dụng dầu ăn để phá bọt, lượng proteaza tích lũy trong canh trường cao hơn. Điều này có thể lý giải là bản thân dầu ăn chứa một vài vitamin hoặc dầu ăn đã hòa tan các vitamin A,

D, E, K có trong bột đậu tương của môi trường [2] và chính những vitamin này đã kích thích sự sinh trưởng của vi khuẩn, tương tự như thông báo của một số tác giả: trong môi trường dinh dưỡng, nếu bổ sung mỡ cá voi, hoạt độ proteaza có thể tăng tới 30%. Ngoài ra, đối với vi khuẩn *B. brevis* B₁, khi tỉ lệ tiếp giống và tuổi giống là 16 giờ, trong điều kiện lên men này hầu như không tồn tại pha tiềm phát. Hiện tượng không thực sự tồn tại pha thích ứng trong quá trình sinh trưởng của vi khuẩn *B. brevis* B₁ trong thí nghiệm này có thể giải thích do sự thích ứng trước của vi khuẩn với môi trường trong canh trường giống. Vì thế chủng vi khuẩn *B. brevis* B₁ có pha sinh trưởng bắt đầu gần như ở ngay thời điểm đầu của quá trình lên men.

Một đặc điểm khác biệt của chủng này so với sự phát triển chung của vi sinh vật là có điểm dừng ở giữa pha phát triển nhanh theo hàm số mũ; đồ thị có dạng của sự sinh trưởng kép. Dạng sinh trưởng này thường đặc trưng cho các chủng vi sinh vật sinh bào tử. Hiện tượng tương tự đã quan sát thấy ở chủng vi khuẩn chịu nhiệt sản sinh proteaza *B. brevis* 224 phân lập từ những suối nước nóng của núi Iangan-Tay [6]. Ở giai đoạn này, thoát tiên vi sinh vật phát triển rất nhanh - số lượng tế bào tăng theo hàm số mũ, tiếp đến là điểm dừng của sự phân chia tế bào và tạo bào tử, sau đó bắt đầu sự sinh trưởng lặp lại rồi chuyển dần sang pha cân bằng sau 24 giờ lên men. Lượng oxy hòa tan trong môi trường giảm mạnh. Quan sát sự biến động pH cho thấy trong 4 giờ đầu của quá trình lên men pH giảm từ 9,5 xuống 8,5, sau đó tiếp tục giảm xuống 8,3 ở giờ lên men thứ 8 và dao động quanh pH này trong các ngày tiếp theo cho đến cuối quá trình lên men. Khi lượng tế bào đạt tới pha cân bằng, oxy hòa tan giảm xuống thấp nhất khoảng 3%. Pha cân bằng kéo dài từ giờ lên men thứ 24 đến hết giờ lên men thứ 48 sau đó sinh khối bắt đầu giảm dần tuy rất chậm. Thời điểm thu chế phẩm enzym thích hợp luôn được đặt ra cho mọi quá trình nuôi cấy vi sinh vật. Thời điểm này có khi chỉ sau vài giờ nuôi cấy ở chủng này, nhưng cũng có khi kéo dài vài ngày hoặc vài tuần ở chủng khác. Ngay đối với cùng một chủng, khi nuôi ở các điều kiện khác nhau thì khả năng tích tụ enzym và thời điểm đạt giá trị cực đại cũng khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho thấy sự tích tụ proteaza của *B. brevis* B₁ trong điều kiện thí nghiệm được phát hiện sau 20 giờ lên men, tức là vào khoảng giữa pha phát triển nhanh theo hàm số mũ, tương tự như nghiên cứu của Millet [4]. Trong đó đường cong biểu diễn sinh tổng hợp proteaza ở nửa sau của pha logarit được thể hiện tương quan với đường cong tăng trưởng sinh khối, và sau đó nhanh chóng tăng lên cho đến giữa giai đoạn cân bằng. Lượng proteaza tăng nhanh vào ngày thứ hai, đặc biệt sau giờ lên men thứ 34 và đạt cực đại ở giờ thứ 44, tại cuối pha cân bằng. Sau thời gian này sự tổng hợp proteaza trong canh trường tuy có tăng nhưng không đáng kể. Lượng proteaza giữ ổn định trong suốt giai đoạn đầu của pha suy vong. Ở gần cuối pha suy vong sự tổng hợp proteaza bắt đầu giảm. Hiện tượng hoạt độ enzym bị giảm nhanh sau thời điểm đạt cực đại thường được quan sát thấy ở nhiều chủng vi sinh vật và được giải thích bởi nhiều lý do khác nhau. Tuy nhiên, kết quả phân tích cho thấy mặc dù có sự giảm sinh khối của chủng nghiên cứu nhưng hoạt độ

proteaza trong canh trường cũng không giảm nhiều ở thời điểm này. Tóm lại, với mỗi chủng, ở điều kiện nuôi cấy nhất định sẽ cho một thời điểm sinh tổng hợp enzym cao nhất. Do vậy, thời điểm để thu chế phẩm proteaza kiềm của chủng *B. brevis B₁* được xác định vào khoảng 44-48 giờ. Các nghiên cứu tiếp theo, proteaza đều được thu nhận sau giờ lên men thứ 44.

4 KẾT LUẬN

* Điều kiện thông khí thích hợp cho *B. brevis B₁*: Trên máy lắc tròn: 50ml môi trường trong bình tam giác 500ml; Trong hệ thống pilot 15 lit: tốc độ khuấy 400 vòng/phút với lưu lượng 1lit không khí/ một lít môi trường/1phút.

* Sinh tổng hợp enzym đạt cực đại tại gần cuối pha cân bằng trong quá trình lên men gián đoạn. Thời điểm thu chế phẩm là sau giờ lên men thứ 44.

5 TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Liễu Ba, Nguyễn Thị Dự, Lê Văn Nhung. *Ảnh hưởng của thành phần môi trường tới sinh tổng hợp proteaza kiềm của chủng B. brevis B₁ phân lập tại Hà nội*. Kỹ yếu - hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 1999.
2. Phạm Văn Biên, Hà Hữu Tiến, Phạm Ngọc Quý, Trần Minh Tâm, Bùi Việt Nữ. *Cây đậu nành*. Nhà xuất bản nông nghiệp. 1996.
3. Kubo M., Pierro D. J., Mochizuki Y., Kojima T., Yamazaki T., Satoh S., Takizawa N and Kiyohara H. *Bacillus stearothermophilus cell shape determinant gene, mreC and MerD and their stimulation of protease production in Bacillus subtilis*. Biosci. Biotech. Biochem. Vol. 60, N 2, 1996, 171-176.
4. Millet J. *Charaterization of proteinases excreted by Bacillus subtilis Marburg strain during sporulation*. J. Appl. Bacteriol. 33:207-219. 1970.
5. Zuidweg M. H. J., Bos C. J. K. and Van Welzen H. *Proteolytic components of alkaline proteases of Bacillus strains. Zymograms and electrophoretic isolation*. Biotechnology Bioengineering 1972 Sep. **14**(5); 685-714.

ABSTRACT

Fermentation proces of alkaline protease - producing *B. brevis B₁* isolated in Hanoi.

The strain *B. brevis B₁* isolated in Hanoi had ability to produce high alkaline protease. The fermentation result showed that: with 17h culture and at the aeration rate of 1 vol/vol/min, stirration rate of 400 rpm, it produce 5,6 U/ml alkaline protease.

LES PLANTES TRANSGÉNIQUES RÉSISTANTES AUX INSECTES HERBIVORES NUISIBLES

NGUYEN QUOC BINH, DOMINIQUE MICHAUD.

Centre de recherche en horticulture, Université Laval, Québec, Canada.

À l'heure actuelle, le contrôle des populations d'insectes ravageurs en milieu agricole repose essentiellement sur l'utilisation de pesticides chimiques, efficaces à faible coût. L'usage croissant de ces substances, par contre, présente plusieurs inconvénients. D'abord, les insecticides chimiques sont en général non sélectifs; ils peuvent être toxiques pour les animaux et l'homme, en plus de conduire souvent à une destruction complète de la faune entomologique non ciblée dans les zones traitées. De surcroît, leur utilisation à grande échelle a conduit au cours de temps à l'apparition de populations d'insectes résistants toujours plus nombreuses et difficiles à contrôler. L'insecte ravageur du chou *Plutella xylostella* et le doryphore de la pomme de terre *Leptinotarsa decemlineata*, par exemple, sont aujourd'hui résistants à presque tous les insecticides de synthèse disponibles sur le marché; actuellement, les seuls insecticides réellement efficaces pour lutter contre ces insectes sont les biopesticides dérivés de la bactérie sporulante *Bacillus thuringiensis*, ou Bt.

Sur le plan appliqué, les biopesticides de type Bt ne répondent toutefois pas à certaines exigences de base comme une stabilité sous diverses conditions climatiques ou un effet protecteur pour les plantes s'étalant tout au long de la saison de croissance. Pour remédier à ces contraintes, plusieurs ont proposé le développement et l'emploi de plantes transgéniques exprimant un caractère entomopathogène d'intérêt, en particulier la toxine du Bt (voir Van Rie 2000). Les premières plantes transgéniques exprimant une toxine du Bt montraient des niveaux de résistance très significatifs vis-à-vis des insectes cibles, en comparaison à des plantes témoins non modifiées. Un avantage additionnel des plantes transgéniques insecticides est la possibilité d'envisager une régulation spatiale et temporelle de l'expression du biopesticide recombinant dans la plante, à l'aide de séquences promotrices appropriées.

À ce jour, deux approches principales ont été considérées pour la création de plantes transgéniques résistantes aux insectes herbivores: les toxines du Bt, généralement très spécifiques aux insectes cibles, et les inhibiteurs de protéases, beaucoup moins spécifiques.

I. Les endotoxines du *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis est une bactérie du sol Gram positive, sporulante et aérobie facultative, dont la niche écologique préférentielle semble être les insectes morts. Au cours du processus de sporogénèse, *B. thuringiensis* synthétise une inclusion parasporale de nature protéique appelée "cristal" (Hanay & Fitzjames 1955). Les formes cristallines retrouvées dans la cellule bactérienne résultent de l'assemblage de sous-unités polypeptidiques de masse moléculaire de ~70 ou de ~130 kDa (Bulla et al. 1977). Les gènes codant pour les toxines du Bt sont souvent portés par des plasmides; une localisation chromosomique a parfois été observée, en général en association avec une localisation plasmidique (Klier et al 1978)

Structure et classification des toxines du Bt – Bien que se présentant sous une grande variété de formes, les toxines du Bt possèdent parfois entre elles de fortes homologies qui

permettent de les regrouper en familles. Historiquement, les toxines du Bt ont été catégorisées en quatre familles, désignées cry I, cryII, cryIII et cryIV (Lereclus et al. 1989; Höfte et Whiteley 1989), sur la base de leur spécificité envers les insectes cibles. Récemment, un mode de classement alternatif basé sur l'homologie structurale primaire des toxines a été proposée par Clickmore et al. (1998); selon cette méthode, vingt-deux familles ont été définies, désignées par les chiffres arabes 1 à 22.

Indépendamment de leur spectre d'activité, les endotoxines du Bt peuvent aussi être regroupées en deux classes selon leur taille; un premier groupe comprenant les toxines de ~130 kDa, et un second groupe incluant celle de ~70 kDa. Les endotoxines du premier groupe sont constituées, sous leur forme immature, de deux domaines de taille égale mais de rôles différents. La moitié aminoterminal de la protoxine donne naissance, après protéolyse par les protéases digestives de l'insecte cible, à la toxine proprement dite, dont la taille est d'environ 70 kDa. La moitié carboxyterminale ne joue aucun rôle pour la toxicité; elle contribuerait plutôt à la stabilité de la protéine et jouerait un rôle dans la formation des inclusions cristallines dans la bactérie hôte. À l'inverse, les endotoxines du second groupe ne possèdent qu'un domaine, en l'occurrence la toxine active de 70 kDa, bien que des cristaux puissent tout de même se former à partir de ces protéines. D'un point de vue structural, l'organisation des domaines 'actifs' (ou toxiques) est relativement conservée au sein des toxines du Bt (Sanchis et al. 1989). Cinq sous-domaines composés de 10 à 45 acides aminés sont retrouvés dans la plupart des toxines; les autres régions, très variables sur le plan structural, seraient responsables de la spécificité de l'interaction *toxine-recepteur* au niveau de l'épithélium digestif de l'insecte sensible.

Plantes transgéniques Bt – Les premières plantes transgéniques insecticides exprimant une toxine du Bt ont été obtenues en 1987 par des groupes de recherche indépendants (Vaeck et al. 1987; Fischhoff et al. 1987; Barton et al. 1987). Les plantes développées, des lignées de tabac et de tomate, exprimaient le gène *cryIA*, spécifique aux insectes de l'ordre des Lépidoptères. En résumé, ces travaux démontraient que des plantes n'exprimant que le produit du gène tronqué – n'incluant que la partie codant pour le domaine toxique – montraient un niveau de toxicité plus élevé contre l'insecte modèle *Manduca sexta*, en comparaison à des plantes transgéniques exprimant la toxine entière. Dans tous les cas, toutefois, le niveau d'expression du gène *Bt* dans les cellules végétales était très faible, en raison de l'incompatibilité fonctionnelle des systèmes d'expression procaryotique (les transgènes Bt) et eucaryotique (la machinerie cellulaire des cellules végétales). D'un point de vue biochimique, cette incompatibilité se situait à deux niveaux: au niveau transcriptionnel et au niveau traductionnel. Au niveau de la transcription, de nombreux motifs riches en A/T dans la région codante du gène *Bt* constituaient ni plus ni moins des signaux de polyadénylation pour la cellule végétale (Haffani et al. 2000), ou encore des signaux d'épissage (*RNA splicing*; Haseloff et al. 1997) empêchant une synthèse normale des ARNm du transgène. Dans les premières plantes transgéniques *Bt*, l'ARNm correspondant au gène *Bt* représentait moins de 0.001% des ARNm totaux et était indétectable par une hybridation de type *northern*. De plus, la plupart des ARNm *Bt* accumulés étaient de taille plus faible que celle attendue, suggérant une perturbation du processus de transcription du transgène procaryotique. Au niveau de la traduction, des codons retrouvés rarement dans les cellules végétales forment un part non négligeable des gènes *Bt*, ce qui réduisait considérablement la vitesse de synthèse de protéines recombinantes (Perlack et al. 1991).

Pour éviter ces problèmes techniques, deux stratégies efficaces ont été mises au point. La première, utilisée pour la première fois par les chercheurs de la compagnie Monsanto à St-Louis aux États-Unis, a consisté à modifier le gène bactérien de façon à adapter ses codons à la machinerie transcriptionnelle de la plante, tout en conservant la séquence en acides aminés

originale de la toxine naturelle. Par cette approche, des lignées transgéniques insecticides montrant un niveau d'accumulation en toxines du Bt jusqu'à dix fois supérieur au seuil nécessaire pour assurer une mortalité élevée des insectes cibles ont été obtenues (Perlak et al. 1991). Une deuxième approche permettant d'accroître considérablement l'efficacité des plantes modifiées a consisté à transformer le génome chloroplastique des cellules foliaires. En permettant l'intégration d'un nombre élevé (5000-10000) de copies du transgène *Bt* au génome de chaque cellule transformée et parce que d'un point de vue fonctionnel, le génome chloroplastique est compatible avec l'appareil transcriptionnel des bactéries, l'accumulation des toxines du Bt dans les feuilles pouvait maintenant atteindre un taux 40,000 fois supérieur au seuil nécessaire pour tuer la plupart des insectes de la population cible (Kota et al. 1999).

Depuis 1995, où la première lignée de pomme de terre transgénique *Bt* a été commercialisée, la surface totale en plantes transgéniques ne cesse d'augmenter. Pour l'année 2000 aux États Unis, les surfaces relatives en cultures transgéniques pour le maïs, le soya et le coton étaient respectivement de 25%, 54% et 61% (Lassner & Bedbrook 2001). Au champ, la culture de lignées végétales transgéniques *Bt* permet de diminuer considérablement le nombre d'applications et la quantité d'insecticides employés. En Australie, par exemple, une réduction de l'emploi d'insecticides pour le coton transgénique s'est chiffrée à environ 40%, par rapport au coton non transgénique. En Chine, la réduction s'est avérée beaucoup spectaculaire, avec des diminutions de l'ordre de 60 à 80% pour la même culture (Betz et al. 2000).

II. Les inhibiteurs de protéases

Malgré ces résultats positifs obtenus avec les plantes transgéniques *Bt*, l'intérêt des gènes *Bt* en protection des plantes est dans plusieurs cas limité par la grande spécificité des toxines produites. En pratique, une plante transformée avec un gène *Bt* nécessite toujours l'utilisation d'insecticides de synthèse contre les autres insectes herbivores qui s'attaquent à la plante, d'ordinaire non sensibles à la toxine recombinante. En revanche, les inhibiteurs de protéases, ou IPs, montrent un spectre d'activité plus étendu et représentent en théorie un groupe de molécules d'intérêt plus général en protection des plantes. Lorsqu'elles sont attaquées par un prédateur herbivore ou un agent pathogène, les plantes produisent une variété de composés de défense, au nombre desquels se retrouvent les IPs, qui servent de 'pseudo-substrats' aux protéases digestives des organismes ennemis pour bloquer leur activité et altérer la digestion des tissus de la plante hôte (Ryan 1990). De fait, il est maintenant bien établi que les IPs sont produits par une multitude d'organismes non seulement pour assurer la régulation de leurs protéases endogènes, mais aussi pour se défendre contre leurs ennemis naturels. Ainsi, les IPs contribuent activement aux interactions complexes qui lient entre eux les différents organismes d'un écosystème donné, en agissant comme régulateurs naturels des processus protéolytiques extracellulaires qui y surviennent (Michaud 2000).

Plantes transgéniques IP – Dans ce contexte, il n'est pas surprenant que les IPs aient été proposés par plusieurs comme un outil potentiel pour la lutte aux prédateurs et aux agents pathogènes. Jusqu'ici, des stratégies de lutte aux organismes nuisibles basées sur l'inhibition de protéases extracellulaires à l'aide d'IPs naturels ou recombinants ont été développées pour le contrôle d'organismes aussi variés que les virus, les insectes herbivores, les nématodes parasites et les agents pathogènes microbiens (Michaud 2000). Bien que les fonctions métaboliques précises altérées par les IPs demeurent peu connues dans la plupart des cas, l'importance des protéases extracellulaires chez les organismes cibles ne fait aucun doute. L'effet répressif des IPs sur la croissance et le développement des insectes herbivores, par exemple, a été décrit pour plusieurs

espèces (Gatehouse et Gatehouse 1998). Sur la base de ces observations, l'expression d'IPs recombinants dans des plantes transgéniques a été proposée comme un moyen pour protéger les plantes contre une panoplie d'ennemis naturels. Depuis une quinzaine d'années, l'expression d'IPs recombinants dans les plantes a été menée à bien pour une variété d'espèces d'importance économique, et des effets répressifs significatifs ont été notés dans plusieurs cas (Hilder et al. 1987, Schuler et al. 1998).

À la recherche d'IPs plus efficaces – Malgré ces résultats prometteurs, l'utilité générale des IPs recombinants en protection des plantes demeure toutefois toujours à démontrer. *In vivo*, le spectre d'inhibition des IPs protéiques est limité à une classe protéasique unique, laissant dans le milieu des protéases insensibles non inhibées, appartenant à d'autres classes protéasiques. En raison d'une adaptation graduelle des insectes herbivores aux IPs retrouvés naturellement dans leur diète, le spectre d'activité des IPs végétaux est même dans plusieurs cas limité à la sous-classe, augmentant encore plus le nombre de protéases insensibles présentes dans le milieu. Ces protéases insensibles, qui peuvent permettre à l'herbivore de compenser pour la perte d'une fraction de ses protéases actives, peuvent aussi altérer l'intégrité des IPs protéiques en les dégradant, diminuant d'autant leur efficacité *in vivo* (Jongsma et Bolter 1997; Michaud 1997).

Dans ce contexte, il apparaît évident que des études exhaustives demeurent nécessaires, par exemple, pour élucider les processus physiologiques à la base des phénomènes compensatoires chez les insectes herbivores, ou pour comprendre la dégradation des protéines végétales par les agents pathogènes bactériens ou fongiques lorsqu'ils infectent les tissus d'une plante-hôte. Néanmoins, alors que plusieurs questions importantes demeurent sans réponse quant aux interactions fines survenant entre les protéases extracellulaires des organismes herbivores et les IPs végétaux, les développements récents quant à l'amélioration des IPs recombinants par diverses approches moléculaires permettent d'envisager des progrès considérables au cours des prochaines années pour l'emploi des IPs en protection des plantes. En pratique, des IPs seront efficaces s'ils inhibent fortement certaines protéases de l'organisme cible, et si le nombre de protéases non inhibées suite à l'inhibition est minimal (Michaud 1997). Plusieurs stratégies ont été considérées depuis quelques années pour améliorer l'efficacité des IPs protéiques, incluant l'altération de leur affinité pour les protéases cibles, le *design* d'IPs hybrides possédant un spectre d'activité élargi, l'isolement d'IPs améliorés par 'phage display', et l'emploi d'IPs animaux ou de prorégions protéasiques agissant comme IPs (Michaud et Nguyen-Quoc 2000). Lorsque exprimés dans des plantes transgéniques, ces inhibiteurs, taillés sur mesure pour l'inhibition de systèmes protéasiques spécifiques, pourront contribuer de manière significative au développement de cultures végétales transgéniques résistantes aux herbivores nuisibles.

III. Les plantes transgéniques en lutte intégrée

Considérant les développements récents en génie génétique et en transgénèse végétale, les séquences nucléotidiques d'une variété de protéines utiles peuvent désormais être intégrées au génome des plantes pour compléter l'effet de leur appareil de défense naturel, contribuant ainsi à l'obtention de rendements élevés en conditions agricoles. Les plantes transgéniques Bt, par exemple, s'avèrent d'un intérêt considérable dans les systèmes où des toxines sont disponibles pour la lutte aux insectes qui attaquent la plante à protéger. L'effet antibiotique des plantes Bt leur confère un statut de résistance très élevé au champ, d'où leur popularité déjà importante à l'échelle mondiale.

Des problèmes de résistance? – Des molécules efficaces comme les toxines du Bt, par contre, sont des composés uniques au même titre que les pesticides de synthèse et leur emploi à

grande échelle dans les systèmes de production agricole causera une forte pression de sélection sur les herbivores ciblés, avec comme conséquence probable et prévisible l'apparition de populations résistantes (Brattsen 1991). Plusieurs études récentes ont démontré la capacité des insectes herbivores à développer de la résistance aux toxines du Bt, et l'apparition de souches résistantes aux plantes transgéniques Bt apparaît plausible (Tabashnik 1994). Afin de minimiser le développement de résistance dans les populations cibles et pour assurer leur efficacité à long terme, les plantes transgéniques exprimant un facteur de résistance unique comme une toxine du Bt devront être considérées comme *un* élément parmi d'autres dans une stratégie de lutte intégrée basée sur l'emploi de plusieurs outils de lutte.

Dans cette optique, les IPs recombinants apparaissent d'un intérêt particulier. À l'inverse des protéines toxiques, ces composés ne tuent pas directement les organismes cibles. Dans la plupart des cas, l'ingestion de fortes doses d'IPs par les organismes herbivores cause plutôt des retards de croissance et des troubles de reproduction, diminuant de façon marquée la performance (ou *fitness*) de ces organismes en conditions naturelles. Du même fait, les IPs donnent à la plante un statut de résistance partielle, faisant de cette approche un élément approprié pour le développement de stratégies de lutte basées sur l'emploi d'outils multiples et complémentaires. Par exemple, des insectes herbivores montrant un taux de croissance diminué après ingestion d'IPs pourraient s'avérer plus sensibles à des prédateurs naturels utilisés en lutte biologique. De même, des IPs recombinants pourraient, en bloquant les protéases digestives de l'insecte herbivore, améliorer l'effet de toxines du Bt recombinantes ou encore celui des protéines de défense endogènes de la plante-hôte en protégeant leur intégrité structurale (Michaud 1997).

À la recherche d'un équilibre... – Considérant les développements rapides dans le domaine, il apparaît clair que ce n'est qu'une question de temps avant que des IPs recombinants hautement efficaces soient disponibles pour le développement de lignées végétales transgéniques résistantes à plusieurs insectes nuisibles (Michaud 2000). À ce stade, des efforts soutenus seront toujours nécessaires, toutefois, pour comprendre plus à fond les interactions *protéase IP* à l'interface des plantes et de leurs ennemis naturels. Tel que mentionné plus haut, un élargissement du spectre d'activité des IPs par génie génétique contribuera au développement de plantes IP hautement résistantes aux herbivores nuisibles, mais une telle approche pourrait s'avérer peu utile au champ. En théorie, élargir le spectre d'action d'un IP contre les protéases digestives d'un herbivore accroîtra son efficacité mais diminuera en même temps sa spécificité. Alors que des composés toxiques comme les toxines du Bt montrent de l'intérêt en raison de leur grande spécificité, des IPs à large spectre pourront éventuellement interférer avec les autres organismes présents dans l'écosystème (Malone et Burgess 2000). Comme alternative, bloquer un processus clé dans la cascade complexe de réactions protéolytiques menant à la dégradation des protéines pourrait être suffisant pour éviter les phénomènes de compensation et de dégradation observés couramment (Brunelle et al. 1999). Dans cette optique, le défi sera alors de définir un 'équilibre d'inhibition' dans l'environnement permettant d'altérer des fonctions physiologiques précises mais cruciales dans l'organisme nuisible sans inhiber les protéases des organismes retrouvés dans le même environnement. Alors que des efforts considérables sont déployés depuis quelque temps pour maximiser l'efficacité des IPs recombinants – une étape essentielle pour établir le potentiel de ces protéines en protection des plantes, la prochaine étape sera plutôt d'optimiser leurs effets inhibiteurs dans l'environnement en bloquant les protéases de l'insecte cible « juste assez, mais pas trop ».

Références

- Barton KA, Whiteley HR, Yang N-S. (1987) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant physiol.* 85, 1103-1109.
- Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL. (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol.* 32, 156-173.
- Brattsen LB (1991) Bioengineering of crop plants and resistant biotype evolution in insects: counteracting coevolution. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 17, 253-267.
- Brunelle F, Nguyen-Quoc B, Cloutier C, Michaud D (1999) Protein hydrolysis by Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: the catalytic role of cathepsin D. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 42, 88-98.
- Bulla LA Jr, Davison LT, Kramer KJ. (1977) Characterization of the entomocidal toxins of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 130, 373-383.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 807-813.
- Fischhoff DA, Bowdish KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SM, Niedermayer JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG, Fraley RT, (1987) Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio Technology* 5, 807-813.
- Gatehouse AMR, Gatehouse JA (1998) Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pestic. Sci.* 52, 165-175.
- Haffani YZ, Overney S, Yelle S, Bellemare G, Belzile FJ. (2000) Premature polyadenylation contributes to the poor expression of the *Bacillus thuringiensis* cry3Ca1 gene in transgenic potato plants. *Mol Gen Genet.* 264, 82-88.
- Hannay CL, Fitz-james PC. (1955) The protein-crystals of *Bacillus thuringiensis* berliner. *Can J Microbiol.* 1, 694-710.
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci.* 94, 2122-2127.
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sherman SE, Boulter D (1987) A novel mechanism for insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330, 160-163.
- Hofte H, Whiteley HR. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.* 53, 242-255.
- Jongsma MA, Bolter CJ (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 885-895.
- Klier A, Lecadet MM, Rapoport G. (1978) Transcription in vitro of sporulation-specific mRNA's by RNA polymerase from *Bacillus thuringiensis*. In: *Chap.* 205-212.
- Kota M, Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ. (1999) Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci.* 96, 1840-1845.
- Lassner M, Bedbrook J. (2001) Directed molecular evolution in plant improvement. *Curr Opin Plant Biol.* 4, 152-156.
- Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, Lecadet M. (1989) Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 51, 211-217.
- Malone LA, Burgess EPJ (2000) Interference of protease inhibitors on non-target organisms. Dans: Michaud (2000), pp. 89-106.
- Michaud D (1997) Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends Biotechnol.* 15, 4-6.

Michaud D (2000) Recombinant Protease Inhibitors in Plants. Eurckak.com, Georgetown TX, 241 pp.

Michaud D, Nguyen-Quoc B (2000) Using natural and modified protease inhibitors (in pest control). Dans: Michaud D (2000). pp. 114-127.

Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA. (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci*. 88, 3324-3328.

Ryan CA (1990) Proteinase inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425-449.

Sanchis V, Lereclus D, Menou G, Chaufaux J, Lecadet MM. (1988) Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* aizawai 7.29. *Mol Microbiol.* 2, 393-404.

Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR (1998) Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.* 16, 168-175.

Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 47-79.

Vaeck M, Reynaerts A, Höfte H, Jansens S, De Beuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, Leemans J. (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328, 33-37.

Van Rie J. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Int J. Med Microbiol.*, 290, 463-469.

TÓM TẮT

CHUYỂN NẠP GEN Bt HAY GEN ỨC CHẾ MEN PHÂN GIẢI ĐẠM (PROTEASE INHIBITOR) VÀO CÂY ĐỂ KHÁNG SÂU (INSECT). TRIỂN VỌNG VÀ HẠN CHẾ.

NGUYỄN QUỐC BÌNH, DOMINIQUE MICHAUD

Trung tâm Nghiên cứu Nghề làm vườn, Trường DHHH Laval, Québec, Canada.

Dùng công nghệ sinh học bằng cách chuyển nạp gen toxin Bt (*Bacillus Thuringiensis*) hay gen ức chế men phân giải đạm (protease inhibitor) để chống sâu bệnh đang được nghiên cứu rộng rãi. Việc dùng gen Bt tự nhiên để chuyển nạp vào cây đã gặp nhiều khó khăn. Khó khăn lớn nhất là do lượng độc tố Bt tích lũy rất thấp trong cây chuyển nạp gen. Nguyên nhân chính là do ARNm và protein của Bt bị phá hủy nhanh trong cây. Để khắc phục nhược điểm đó, nhiều loại gen Bt nhân tạo đã được tổng hợp, dựa trên thành phần axit amin của gen Bt tự nhiên, song tổ hợp codon đã được thay đổi cho phù hợp với codon của cây. Lượng toxin trong cây chuyển nạp với gen Bt nhân tạo có thể lên tới 1000 lần cao hơn so với gen Bt thiên nhiên. Trong hướng thứ hai, sử dụng gen protease inhibitor để kháng sâu, đã gặt hái được những thành quả nhất định song còn có nhiều khó khăn, khó khăn chính có nhiều loại protease khác nhau trong mỗi loài sâu. Mặt khác, sâu bệnh thích ứng khá nhanh với sự có mặt của inhibitor trong cây. Song sử dụng inhibitor có nhiều lợi thế, vì sự đa dạng có trong thiên nhiên của những bộ gen inhibitor khác nhau. Mặt khác, những gen đó có thể sử dụng thẳng gen của cây trồng. Tính độc hại đối với người thấp, vì đã được thử thách về tính độc hại một cách tự nhiên.

Mặc dù có nhiều hạn chế, song việc sử dụng những phương pháp trên có nhiều triển vọng vì nó làm giảm giá thành sản phẩm, giảm một cách đáng kể lượng thuốc trừ sâu, nguồn ô nhiễm môi trường lớn.

TƯƠNG QUAN GIỮA pH VÀ SINH TỔNG HỢP NISIN CỦA *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS*.11

NGUYỄN VIỆT CUÔNG ⁽¹⁾, PHAN THỊ KHÁNH HOA ⁽²⁾, LÊ THANH BÌNH ⁽³⁾

⁽¹⁾ : Viện Công nghiệp Thực phẩm - Bộ Công nghiệp

⁽²⁾ : Viện Công nghệ Sinh học - TTKHTN & CNQG

⁽³⁾ : Viện Di truyền Nông nghiệp - Bộ Nông nghiệp và PT Nông thôn

I. MỞ ĐẦU

Lactococcus lactis subsp. *lactis* 11 là chủng vi khuẩn lactic sinh nisin, một bacteriocin thuộc nhóm lantibiotic đã được nghiên cứu và ứng dụng trong bảo quản thực phẩm [1].

Nghiên cứu nâng cao năng suất sinh tổng hợp nisin của chủng luôn là mục tiêu quan trọng hàng đầu. Giá trị pH của môi trường là yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin của chủng [2,3,4,5,6]. Đã có một số nghiên cứu về ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng và sinh tổng hợp bacteriocin của vi khuẩn lactic như nghiên cứu của Ten Brink và es (1994); Thomas và es (1996); Tom L. J. Verellen và es (1998); Leroy.F và es (1999) [2-5], hay trong mô hình tối ưu của E. Parente và es (1992)[6]. Hầu hết các chủng vi khuẩn lactic sinh trưởng và sinh tổng hợp bacteriocin tốt trong dải pH ban đầu từ 6,5 đến 8,0. Bên cạnh đó cũng có nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp duy trì pH trong suốt quá trình lên men của chủng sản xuất nhằm nâng cao sinh tổng hợp nisin, như nghiên cứu của Minerva Olympia và es (1995) khi duy trì pH ở 5,5 và 6,0 đã nâng cao đáng kể khả năng sinh tổng hợp pediocin của *Pediococcus* sp ISK-1 [7]; Biswas và es (1996) [8] duy trì pH ở 6,5; Thomas duy trì pH từ 3,7 đến 7,92 [3].

Trong bài này, chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu về mối tương quan giữa pH môi trường và hoạt tính sinh tổng hợp nisin của *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Môi trường và vi sinh vật

- Môi trường nuôi cấy vi sinh vật : môi trường MRS [9]
- Chủng vi sinh vật: Chủng sinh nisin *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11 trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghệ Sinh học được phân lập từ sản phẩm thịt lên men truyền thống của Việt Nam.
- Chủng kiểm định: *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 do trung tâm giống vi sinh vật Nhật Bản cung cấp (JCM - Japan collection microorganism).

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Xác định sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin

Chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11 được nuôi cấy trên môi trường MRS ở 30°C. Tốc độ sinh trưởng của chủng được xác định bằng mật độ quang đo ở bước sóng 600nm (OD₆₀₀).

Hoạt tính sinh nisin của chủng được xác định theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch với chủng kiểm định *L. plantarum* JCM 1149 [10].

2.2. Ảnh hưởng của pH lên sinh tổng hợp nisin

a. Ảnh hưởng của pH ban đầu

Chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II được nuôi cấy trên các môi trường MRS có pH ban đầu khác nhau. Hoạt tính sinh tổng hợp nisin của chủng được xác định bằng hoạt tính của dịch li tâm (AU/ml) sau 16^h nuôi cấy.

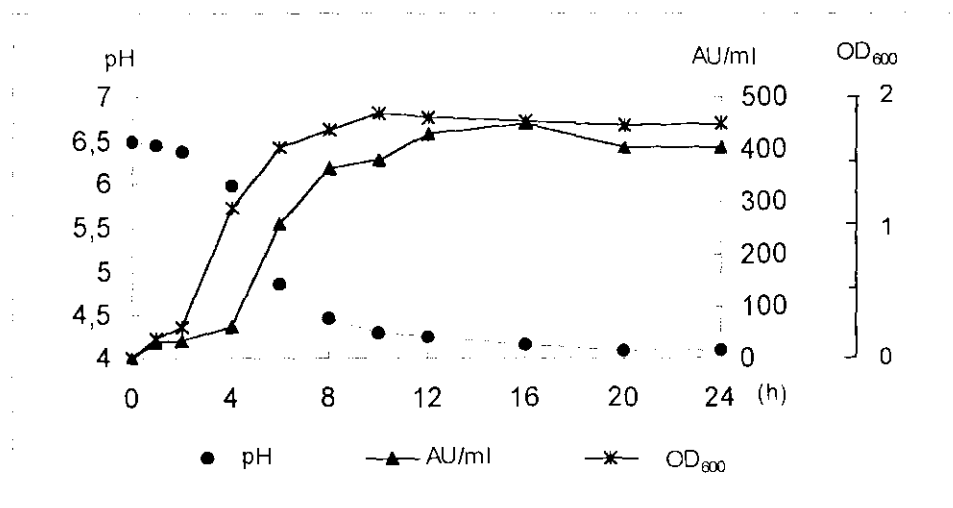
b. Ảnh hưởng của pH duy trì

Chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II được nuôi cấy trên môi trường MRS có pH ban đầu 7,0. Sau khi pH giảm xuống các giá trị 6,8; 6,5; 6,2 thì duy trì ở các pH này trong suốt thời gian nuôi cấy còn lại bằng NaOH 2N và HCl 1N. Cứ 15 phút chỉnh pH một lần.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Sự thay đổi của pH môi trường trong quá trình sinh tổng hợp nisin

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II sinh axit lactic làm giảm pH của môi trường. Đây là một đặc trưng rất cơ bản của vi khuẩn lactic. Sự thay đổi của pH, sinh khối tế bào (OD_{600}) và hoạt tính sinh tổng hợp nisin của *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II được nghiên cứu trong khoảng thời gian 24 giờ.



Hình 1. Sự biến đổi pH môi trường trong quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin của chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II

Kết quả hình 1 cho thấy chủng bắt đầu pha sinh trưởng ở 2 giờ và sinh tổng hợp nisin mạnh sau 4 giờ. Như vậy quá trình sinh tổng hợp nisin diễn ra sau sinh trưởng của chủng. Pha sinh trưởng của chủng được kéo dài từ 2 giờ đến 10 giờ thì chuyển sang pha cân bằng. Sinh khối đạt cực đại tại 10 giờ ($OD_{600} = 1,90$). Trong khi đó quá trình sinh tổng hợp nisin vẫn được tiếp tục và đạt cực đại tại 16 giờ (450 AU/ml). Tuy nhiên, khoảng 80% lượng nisin đạt được sau 8 giờ đầu nuôi cấy và chỉ còn lại 20% được tạo ra trong 8 giờ tiếp theo. Sau 16 giờ hoạt tính sinh nisin của chủng giảm nhưng không đáng kể.

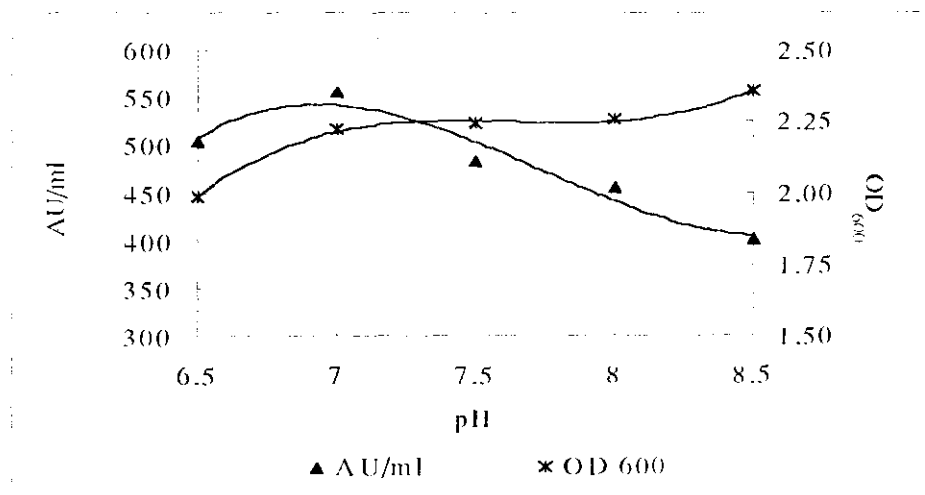
Cùng với sự tăng nhanh về sinh khối tế bào và sinh tổng hợp nisin là sự giảm mạnh pH. Trong 10 giờ đầu, pH của môi trường giảm từ 6,5 xuống còn 4,30. Khi tốc độ sinh trưởng của chủng mạnh nhất là khoảng thời gian từ 2 giờ đến 4 giờ thì pH của môi trường giảm từ 6,4 xuống 6,0. Đặc biệt pH môi trường giảm mạnh từ 6,0 xuống còn 4,8 trong khoảng thời gian từ 4 giờ đến

6 giờ. Đó cũng chính là khoảng thời gian chủng sinh tổng hợp nisin mạnh nhất. Có thể pH thích hợp cho sinh trưởng của *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11 trong khoảng từ 6,4 đến 6,0, còn pH thích hợp cho sinh tổng hợp nisin từ 6,0 đến 4,8.

Như vậy để có thể tăng khả năng tích lũy nisin cần thiết phải duy trì sao cho tế bào luôn ở trạng thái sinh trưởng bằng điều khiển chế độ dinh dưỡng hay pH môi trường. Vấn đề này có thể thực hiện được bằng cách nâng cao pH ban đầu hoặc duy trì một pH thích hợp cho sinh trưởng hoặc liên tục bổ sung nguồn dinh dưỡng mới (nuôi cấy liên tục). Để nâng cao năng suất sinh tổng hợp nisin của *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11 chúng tôi đã nghiên cứu theo 2 phương pháp: nâng cao pH ban đầu và duy trì pH của môi trường tại một số giá trị dự đoán là thích hợp trong suốt quá trình nuôi cấy.

2. Ảnh hưởng của pH ban đầu lên sự sinh tổng hợp nisin

Chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11 được nuôi cấy trên các môi trường có pH ban đầu từ 6,5 - 8,5. Tốc độ sinh trưởng của chủng và hoạt tính sinh tổng hợp nisin (AU/ml) được xác định sau 16 giờ nuôi cấy.

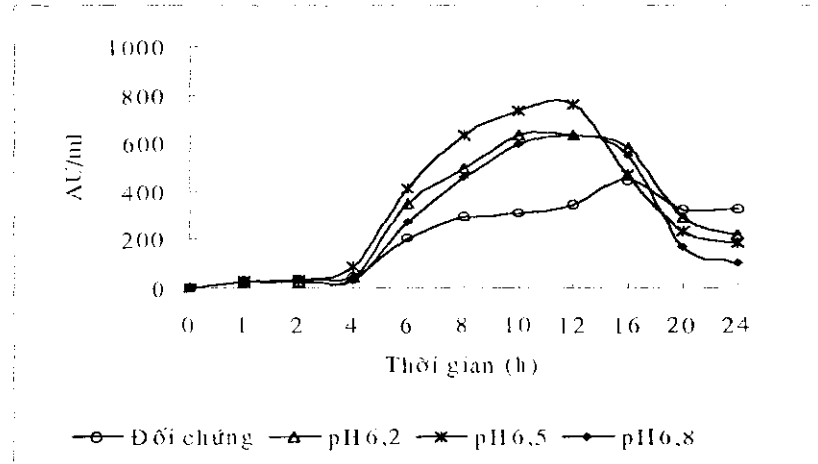


Hình 2. ảnh hưởng của giá trị pH ban đầu lên sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin của chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11

Kết quả trình bày ở hình 2 cho thấy, khi tăng pH ban đầu từ 6,5 lên 8,5 thì sinh trưởng của chủng tăng (OD_{600} tăng từ 1.96 lên 2.35). Điều đáng chú ý là sinh tổng hợp nisin chỉ tăng khi pH=7,0 (556AU/ml) còn khi tăng pH ban đầu trên 7,0 thì chủng đều sinh nisin yếu hơn. Như vậy sự tích lũy nisin không hoàn toàn phụ thuộc vào sinh trưởng của tế bào. Nếu vậy thì khả năng này chỉ xuất hiện ở những điều kiện nhất định. Một giả thiết khác được đặt ra là sự tích lũy các tiền nisin phụ thuộc vào pH của môi trường, tức là ở một pH nào đó mà tế bào bắt đầu bị ức chế sinh trưởng. Mineka và cs (1995) cũng đã tìm ra pH=5,5 là thích hợp nhất cho sinh tổng hợp pediocin của *Pediococcus* sp ISK-1. Kết quả hình 1 cho thấy trên môi trường có pH ban đầu 6,5 chủng sinh trưởng mạnh nhất ở pH từ 6,4 đến 6,0 và sinh tổng hợp nisin mạnh nhất ở pH từ 6,0 đến 4,8. Kết hợp với kết quả hình 2 (chủng sinh tổng hợp nisin tốt nhất trên môi trường có pH ban đầu 7,0) có thể dự đoán pH thích hợp nhất cho sinh tổng hợp nisin ở tổng khoảng từ 6,0 đến 6,8.

3. Ảnh hưởng của duy trì pH trong quá trình sinh tổng hợp nisin

Chủng *Lactococcus lactis*.subsp. *lactis* II được nuôi trên môi trường MRS và duy trì ở các pH khác nhau là 6,2; 6,5 và 6,8 theo như phương pháp đã trình bày. Đối chứng không duy trì pH.



Hình 3. Khả năng sinh tổng hợp nisin của *Lactococcus lactis*.subsp. *lactis* II khi duy trì pH

Kết quả hình 3 cho thấy ở tất cả các thí nghiệm duy trì pH chủng đều sinh tổng hợp nisin cao hơn so với đối chứng. Đặc biệt, khi duy trì pH ở 6,5 năng suất sinh nisin đạt mức 762 AU/ml. Còn khi duy trì pH ở 6,2 và 6,8 thì hoạt tính sinh nisin của chủng cũng đạt tới 635 AU/ml. Như vậy duy trì ở các pH này là thích hợp cho sinh tổng hợp nisin của chủng và pH 6,5 là thích hợp nhất. Hơn nữa, khi duy trì ở các pH 6,2; 6,5 và 6,8 thì hoạt tính sinh nisin cực đại sau 12 giờ, sớm hơn 4 giờ so với đối chứng. Nguyên nhân này có thể là do ở pH thích hợp tốc độ sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin của chủng mạnh hơn nên nguồn dinh dưỡng của môi trường được đồng hóa nhanh hơn và chủng sớm đạt tới pha cân bằng.

Điểm đặc biệt trong thí nghiệm này là sau khi đạt tới pha cân bằng hoạt tính giảm mạnh khi duy trì ở các pH trên. Khi duy trì ở pH 6,5 hoạt tính giảm xuống còn 233 AU/ml tại 24 giờ (giảm 69,4% so với tại 12 giờ). Trong khi ở mẫu đối chứng hoạt tính sinh tổng hợp nisin của chủng giảm không đáng kể. Đây là một đặc điểm quan trọng cần được nghiên cứu nhiều hơn nữa về mối tương quan giữa pH và sinh tổng hợp nisin của chủng.

IV. KẾT LUẬN

Giá trị pH đóng một vai trò đặc biệt quan trọng trong quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp nisin của *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II. Quá trình sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp nisin của chủng diễn ra đồng thời với sự thay đổi pH của môi trường. Kết quả cho thấy chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II sinh tổng hợp nisin mạnh nhất trên môi trường có pH ban đầu bằng 7,0. Đặc biệt khi duy trì pH môi trường ở 6,5 trong suốt quá trình nuôi cấy đã nâng được 69% khả năng sinh tổng hợp nisin của chủng nuôi cấy.

Kết quả đã xác định được ý nghĩa của pH trong mối tương quan với hoạt tính sinh nisin đồng thời cũng xây dựng được một mô hình lên men sinh tổng hợp nisin bằng phương pháp duy trì pH cố định ở 6,5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Lê Thanh Bình.** 1997. Vi khuẩn lactic và kỹ thuật gen, những vấn đề và triển vọng trong sản xuất thực phẩm. Unesco Workshop Hanoi, (20 - 26/10) 1 - 11
2. **Ten Brink. B., Minekus, M., van derVossen. J.M.B.M., Leer, R.J. & Hulsink Veld. J.H.J.** 1994, 'Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M 46', Journal of Applied Bacteriology, vol.77, pp.140-148.
3. **Thomas, L.V and Wimpenny, J.W.T.** 1996, Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Applied and environmental microbiology, June, pp. 2006-2012.
4. **Verllen, T.L.J., Bruggeman.G., van Recnen, C.A., Dicks. L.M.T & Vandamme. E.J.** 1998, 'Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. Journal of Fermentation and Bioengineering, vol.86, no.2, pp.174-179.
5. **Leroy.F & De Vuyst.L.** 1999, 'Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K', Applied and Environmental Microorganism, American Society for Microbiology, vol.65, no.1, pp. 974-981.
6. **Perente. E. and Hill. C.** 1992, A Comparison of affecting the produce of two bacteriocins from lactic acid bacteria. J. of Appl Bacteriol, 73, pp. 290 - 298.
7. **Minerva Olympia, Hajime Fuduka, Hisayo Ono, Yuoshinobu Kaneko, Mitsuo Takano.** 1995
8. **Biswas.S.R, Purbita.R., Johnon.M.C & Ray.B.** 1991, Influence of growth conditions on the production of bacteriocin, pediocin AcH, by *pediococcus acididactici* H+, Applied and Environmental Microbiology, April, 1991, p.1265-1267.
9. **Trần Thị Thuý, Mai thị Hằng, Phạm thị Ngọc Lan, Nguyễn Việt Cường, Lê Thanh Bình.** 2000, Tuyển chọn định hướng vi khuẩn lactic sinh bacteriocin từ một số thực phẩm giàu protein lên men lactic ở Việt nam, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội (thông báo khoa học số1/2000).
10. **Rodriguez J. M, L. M. Cintas, P. Casaus, N. Horn, H. M. Dodd, P.E. Hernandez and gasson.** 1995, Isolation of nisin — production *Lactococcus lactis* strain from dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriol, 78, pp. 109 -115.

SUMMARY

INFLUENCE OF PH ON NISIN PRODUCTION IN *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS*.11

The influence of pH medium on the production of nisin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11 was studied. This strain produced large quantities of nisin at initial pH = 7.0. Yield of nisin production was increased 69% when pH was maintained at 6.5.

TÁC DỤNG TRỪ SÂU HẠI RAU CỦA CHẾ PHẨM MOMOSERTATIN TÁCH TỪ HẠT GẮC (*MOMORDICA COCHINCHINENSIS*)

PHẠM THỊ TRẦN CHÂU, PHAN THỊ HÀ, MAI NGỌC TOÀN,
TRỊNH HỒNG THÁI, NGUYỄN QUỲNH UYẾN, HOÀNG THU HÀ

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

TRẦN QUANG TẤN, HOÀNG THỊ VIỆT, TRẦN ĐÌNH PHẢ,
PHẠM ANH TUẤN, LƯƠNG THANH CỪ

Viện Bảo vệ Thực vật Hà Nội

I. MỞ ĐẦU

Phòng trừ sâu hại cây trồng là một trong những nhiệm vụ quan trọng hàng đầu trong ngành nông nghiệp. Hiện nay để phòng trừ sâu bệnh, người ta đã sử dụng nhiều loại thuốc hoá học.

Các thuốc trừ sâu hoá học đang được sử dụng phổ biến hiện nay ở mức độ khác nhau đều gây ô nhiễm môi trường. Các chất hoá học này khá bền ở điều kiện tự nhiên, vì vậy dư lượng của chúng trên rau quả gây tác hại nghiêm trọng đến sức khoẻ của người và động vật nhất là khi sử dụng không đúng qui cách. Do đó, việc nghiên cứu tìm các thuốc trừ sâu ít độc hại, bị phân huỷ nhanh đang là vấn đề bức xúc. Các thuốc trừ sâu có bản chất protein đáp ứng được các yêu cầu này. Ngoài các protein của *Bacillus thuringiensis* đã được thương mại hoá và sử dụng rộng rãi, một số protein kìm hãm proteinaza (PPI) tách từ thực vật cũng được phát hiện có tác dụng diệt côn trùng. Tuy nhiên cho đến nay các PPI vẫn chưa được sử dụng rộng rãi và chưa có công trình nào công bố về hoạt tính trừ sâu của các PPI thuộc họ bầu bí. Hiệu quả trừ sâu của các PPI được xem là do ái lực hoặc tác dụng đặc hiệu của PPI đối với proteinaz ở trong ống tiêu hoá của côn trùng [1, 7]. Do tính chất tác dụng đặc hiệu cao của các PPI nên điều quan trọng là cần phải biết được tính chất đặc trưng của proteinaz ở ruột mỗi loại côn trùng và tìm được các PPI tương thích có tác dụng kìm hãm mạnh proteinaz của mỗi loại côn trùng.

Nhiều năm qua, phòng công nghệ Enzim - Protein thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội đã tinh sạch, nghiên cứu tính chất của các PPI từ nhiều đối tượng khác nhau [2, 3, 4, 10, 12], proteinaz của một số sâu phá hoại rau [6, 11, 13, 14], thử tác dụng của các PPI đối với các proteinaz của sâu và đã xác định được các PPI của hạt gấc kìm hãm mạnh proteinaz sâu [5, 6]. Từ kết quả trên đã tạo ra được chế phẩm **MOMOSERTATIN** có tác dụng trừ sâu.

Báo cáo này giới thiệu tóm tắt qui trình sản xuất, một số tính chất quan trọng và hiệu lực trừ sâu của chế phẩm **MOMOSERTATIN (Mo)** dùng riêng rẽ hoặc sử dụng phối trộn với các chế phẩm khác.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

- Hạt gấc: hạt của quả gấc chín, đã tách bao màng đỏ, sấy khô.
- Sâu khoang (*Spodoptera litura* F.), sâu tơ (*Plutella xylostella* L.) do Trung tâm Đấu tranh Sinh học, Viện Bảo vệ Thực vật cung cấp.
- Các hoá chất sử dụng đều có độ sạch phân tích.

2. Phương pháp

- Xác định protein theo phương pháp Lowry. [8]
- Xác định hoạt độ proteinaz theo phương pháp Anson cải tiến. [9]
- Xác định hoạt độ kìm hãm proteinaz (PIA) bằng cách xác định hoạt độ enzym còn lại sau khi ủ chất kìm hãm với enzym trong khoảng thời gian xác định.
- Thử nghiệm tác dụng diệt sâu trong phòng thí nghiệm: lá rau bắp cải, lá lạc tươi, lá thầu dầu đã rửa sạch, hong khô, nhúng vào chế phẩm Momosertatin cho ướt đều, hong khô. Đặt lá vào các đĩa petri, chọn sâu tuổi II hoặc tuổi III có kích thước tương đương nhau cho vào các đĩa đã đựng lá. Tiến hành thử nghiệm nhiều lần, mỗi công thức tiến hành với 3 lần nhắc lại. Mẫu đối chứng được tiến hành song song ở cùng điều kiện nhưng thay chế phẩm bằng nước.

Hàng ngày theo dõi sự biến đổi sinh học của sâu, số sâu chết, mức độ ăn lá của sâu so với đối chứng. Tính kết quả theo công thức Abbott :

$$M (\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

M: tỉ lệ phần trăm sâu chết ở lô thí nghiệm.

C: số sâu còn lại ở lô đối chứng. T: phần trăm sâu sống sót ở lô thí nghiệm

- Thí nghiệm ngoài đồng ruộng: lô thí nghiệm phun chế phẩm, lô đối chứng thay chế phẩm bằng nước. Điều tra sâu trước khi thử nghiệm và trong quá trình thử nghiệm.

Tính kết quả theo công thức Henderson Tillton:

$$E = 100 \times \left(1 - \frac{O_2 \times K_1}{O_1 \times K_2} \right)$$

E: hiệu quả phòng trừ (%). O_1 : số lượng sâu sống ở ruộng trước thí nghiệm. O_2 : số lượng sâu sống ở diện tích có phun chế phẩm sau khi thí nghiệm. K_1 : số lượng sâu sống ở diện tích đối chứng trước khi thí nghiệm. K_2 : số lượng sâu sống ở diện tích đối chứng sau khi thí nghiệm.

- Xác định độc tính cấp của chế phẩm MOMOSERTATIN (Viện kiểm nghiệm Bộ Y tế thực hiện): chuột nhắt trắng (chủng Swiss) trọng lượng $20 \pm 2g$, khoẻ mạnh do Viện vệ sinh dịch tễ cung cấp. Thử theo phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc (NXB Y học - 1996). Chuột được cho ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống tự do, đưa thuốc thẳng vào dạ dày chuột. Sau khi thăm dò liều uống, thí nghiệm được tiến hành trên 50 chuột, chia 5 nhóm, mỗi nhóm 10 chuột, Nhóm đối chứng uống 50ml nước cất/kg chuột, các nhóm khác cho uống MOMOSERTATIN với các liều khác nhau từ 35ml/kg chuột - 50ml/kg chuột. Dung dịch MOMOSERTATIN có nồng độ 4mg protein/ml. Theo dõi chuột 5 ngày sau khi cho uống thuốc.

III. KẾT QUẢ

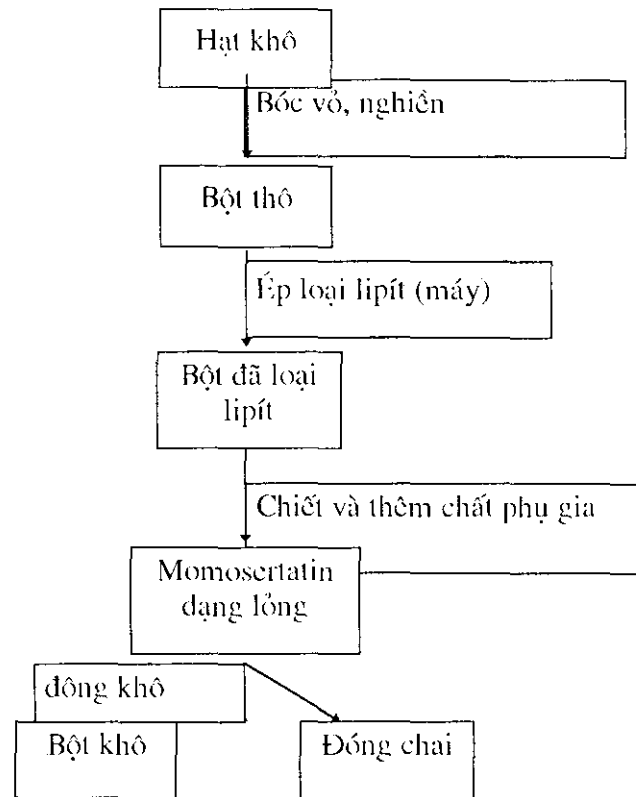
1. Quy trình sản xuất chế phẩm

* Sơ đồ quy trình sản xuất MOMOSERTATIN (hình 1)

2. PPI và protein của chế phẩm

Hàm lượng protein của chế phẩm qua các đợt sản xuất năm 2000 vào khoảng 34mg/ml, hoạt độ của chế phẩm tính theo hoạt độ ức chế triptxin (TIA) vào khoảng 30 mIU/ml. Một đơn vị hoạt độ (IU) là lượng chất ức chế làm giảm 50% hoạt độ của 2mg triptxin.

Dùng phương pháp điện di trên gel poliacrilamit (PAGE) để xác định thành phần protein và PPI của chế phẩm cũng cho thấy tính ổn định của quy trình sản xuất.



Hình 1. Sơ đồ quy trình sản xuất MOMOSERTATIN

3. Độc tính của chế phẩm

Chế phẩm Momosertatin đã được gửi đi kiểm tra độc tính cấp tại Viện kiểm nghiệm, Bộ Y tế. Kết quả liều dưới liều gây chết chuột khi sử dụng đã xác định được “liều dưới liều gây chết với chuột nhất trắng là 25ml/kg”. Liều này cao hơn nhiều so với liều dùng khi phun.

4. Thời gian phân rã của chế phẩm

Thí nghiệm này nhằm xác định thời gian cách li sau khi phun thuốc để có thể sử dụng rau được an toàn cho người. Chúng tôi đã tiến hành trồng cây trong chậu, trong nhà kính (theo kỹ thuật thủy canh), ngoài đồng ruộng và xác định dư lượng chế phẩm trong lá rau. Kết quả cho thấy ở tất cả các điều kiện trên, sau 4-6 ngày xử lý, hoạt độ kim hãm tripxin (TIA) của chế phẩm chỉ còn dưới 10% hoạt độ ban đầu. Sau khi xử lý lá rau với hàm lượng đủ làm chết sâu khoảng 60-70 %, sau 4 ngày, lượng tồn dư của chế phẩm còn lại thực tế không ảnh hưởng đến quá trình tiêu hoá của người sử dụng rau [15].

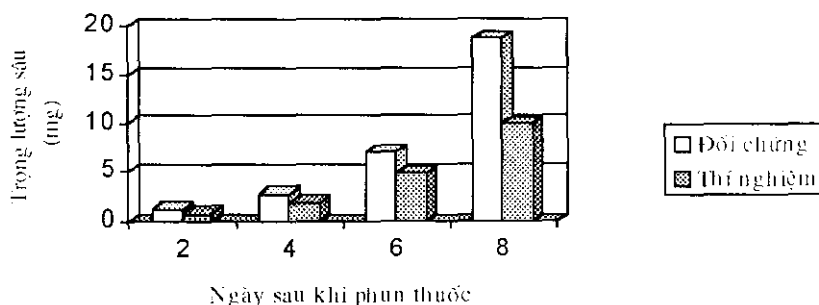
Chế phẩm cũng không ảnh hưởng đến các chỉ tiêu sinh lý (cường độ quang hợp, cường độ hô hấp), sinh hoá (hàm lượng vitamin C, β -caroten, hoạt độ catalaz, peroxidaz) của rau.

5. Hiệu quả trừ sâu

5.1. Chế phẩm Momosertatin (Mo)

5.1.1. Ảnh hưởng của chế phẩm Momosertatin đối với sự phát triển của sâu khoang (*Spodoptera litura* F.) hại rau:

Sâu khoang (*Spodoptera litura*) thuộc họ Ngài đêm (Noctuidae), bộ Cánh vẩy (Lepidoptera) là một loại sâu đa thực và cũng là đối tượng gây hại nặng trên rau. Kết quả nghiên cứu tác dụng của chế phẩm đối với sâu tuổi 2 cho thấy chế phẩm đã có tác động hạn chế được sự phát triển của sâu khoang. Trọng lượng của sâu ở lô thí nghiệm theo các ngày đều thấp hơn so với đối chứng (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của chế phẩm Momosertatin đối với sự phát triển của sâu khoang (*Spodopera litura* F.) (thí nghiệm trong phòng)

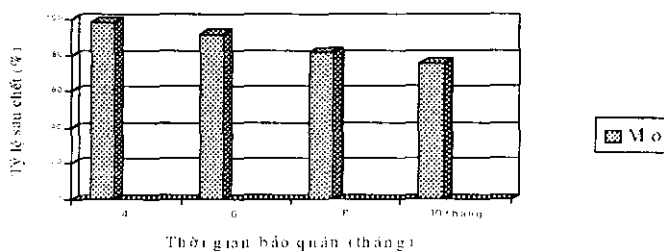
Chế phẩm Momosertatin phân nào cũng có ảnh hưởng tới giai đoạn nhộng của sâu khoang. So sánh giữa lô thí nghiệm và đối chứng thì tỷ lệ sâu non vào nhộng, trọng lượng nhộng đều nhỏ hơn, ngược lại, tỷ lệ bướm dị dạng lại cao hơn (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế phẩm Momosertatin đối với giai đoạn nhộng của sâu khoang (*S. litura* F.) (thí nghiệm trong phòng)

TT	Chỉ tiêu theo dõi	Công thức thí nghiệm		Ghi chú
		Momosertatin	Đối chứng	
1	Tỷ lệ sâu chết (%)	0	0	t°C = 31°C A ³ = 69%
2	Tỷ lệ sâu non vào nhộng (%)	81,11	92,17	
3	Trọng lượng nhộng (mg/nhộng)	3,2 ± 0,1	7,6 ± 0,01	
4	Tỷ lệ nhộng vũ hoá (%)	94,26	96,84	
5	Tỷ lệ bướm dị dạng (%)	16,42	8,56	

5.1.2. Ảnh hưởng của chế phẩm MOMOSERTATIN dạng dịch thể đối với sâu tơ (*Plutella xylostella* L.).

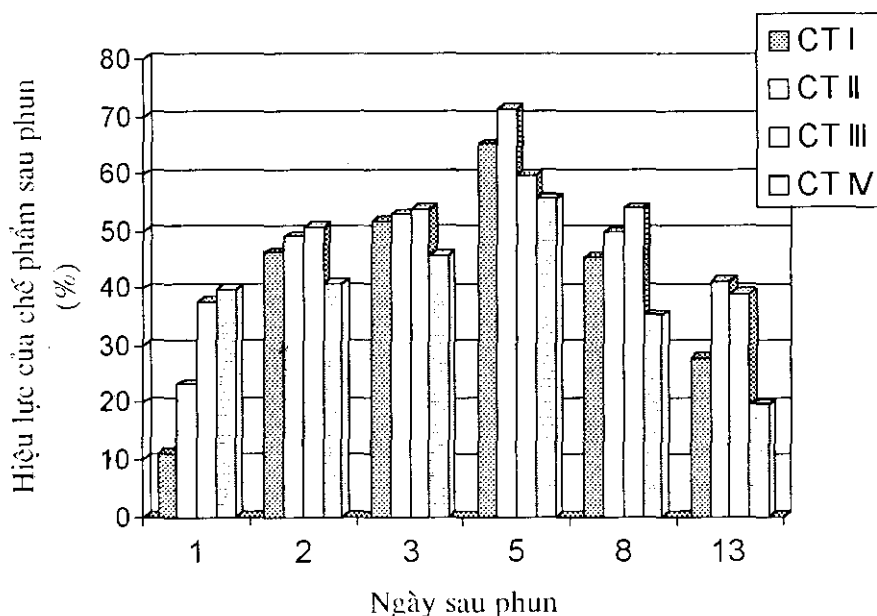
* *Thí nghiệm trong phòng*: kết quả nghiên cứu đối với sâu tơ tuổi 2 cho thấy sau 1 ngày thí nghiệm tỉ lệ sâu chết đạt 65-69%, sau 3-4 ngày đạt 98-100%. Hoạt độ của chế phẩm cũng như hiệu quả trừ sâu của chế phẩm dạng lỏng bảo quản ở 5°C hầu như không bị giảm sau 4 tháng, và sau 8 tháng vẫn còn 81% (hình 3).



Hình 3. Hiệu quả trừ sâu tơ (*Plutella xylostella* L.) của chế phẩm Mo dạng dịch thể sau bảo quản (thí nghiệm trong phòng)

* *Thí nghiệm ngoài đồng ruộng:* Thí nghiệm được tiến hành tại ruộng su hào ở hợp tác xã Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc. Kết quả điều tra ở ruộng cho thấy: sâu tuổi 1, tuổi 2 chiếm hơn 62%, tuổi 3, tuổi 4 chiếm khoảng 34% và nhộng chiếm hơn 4%. Sau khi phun thuốc tiếp tục điều tra sâu và tính hiệu lực trừ sâu theo công thức Henderson Tillton. Kết quả trên hình 3 cho thấy sau khi phun thuốc 5 ngày tỉ lệ sâu chết cao nhất. Trong các loại chất phụ gia thì diệt lục tố và dầu thực vật cho kết quả cao hơn cả.

(CTI: Momosertatin; CTII: Mo +0,5% diệt lục tố; CTIII: Mo + 0,5% dầu thực vật; CTIV: Mo+ 0,5% mực tầu)



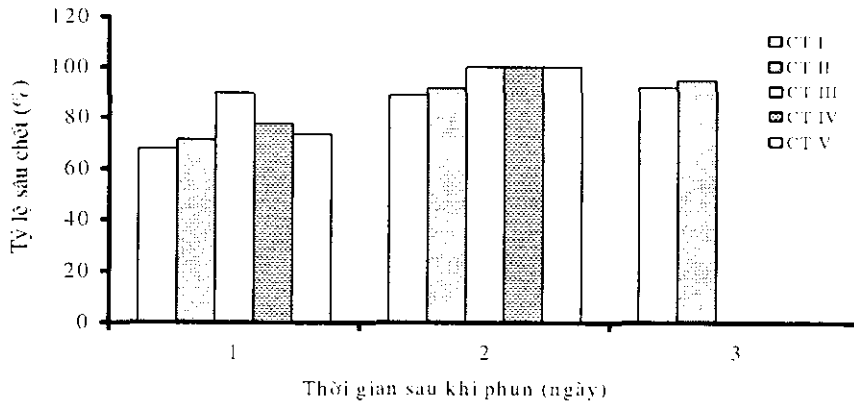
Hình 4. Hiệu lực (%) của chế phẩm Mo trừ sâu tơ (*Plutella xylostella L.*) hại su hào tại HTX Yên Nhân- Tiên Phong - Mê Linh - Vĩnh Phúc (tháng 1 năm 2000)

5.2. Chế phẩm hỗn hợp :

5.2.1. *Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn Mo với các chế phẩm khác để tạo chế phẩm hỗn hợp:*

Vì giá thành của chế phẩm Momosertatin tương đối cao nên chúng tôi đã nghiên cứu tạo chế phẩm MM. Chúng tôi đã nghiên cứu phối trộn Momosertatin với các chế phẩm sinh học khác nhau như MT1, BACNA và CN (đây cũng là các chế phẩm sinh học của các đề mục khác thuộc đề tài cấp nhà nước KHCN-02-08 do chúng tôi chủ trì), kết quả thí nghiệm cho thấy chế phẩm phối trộn ít nhiều đều có tăng hiệu quả nhưng có trường hợp ảnh hưởng xấu đến lá rau. Trên thế giới đã có nghiên cứu cho thấy khi phối trộn Bt với một số PPI làm tăng hiệu quả trừ sâu, tuy nhiên chưa có công trình nào sử dụng PPI của hạt cây họ bí. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành phối trộn Momosertatin với Bt.

Thí nghiệm thêm các lượng Bt khác nhau vào dung dịch Mo cho thấy hiệu lực diệt sâu tơ có tăng lên (hình 5). Khi nồng độ Bt đạt đến 0,05% (công thức III), sau 1 ngày tỉ lệ sâu chết cao hơn các công thức khác, tuy nhiên đối với công thức này vẫn chưa giảm được giá thành. Tuy nhiên ở công thức IV: phối trộn theo tỉ lệ 50% liều dùng của Mo và 50% liều dùng của Bt, sau 2 ngày tỉ lệ sâu chết đạt 100%. Với công thức này (**chế phẩm MM**) giảm được giá thành và cũng giảm được lượng Bt (theo một số công bố Bt có thể có tác dụng độc), vì vậy chế phẩm MM được dùng trong các thí nghiệm tiếp theo.

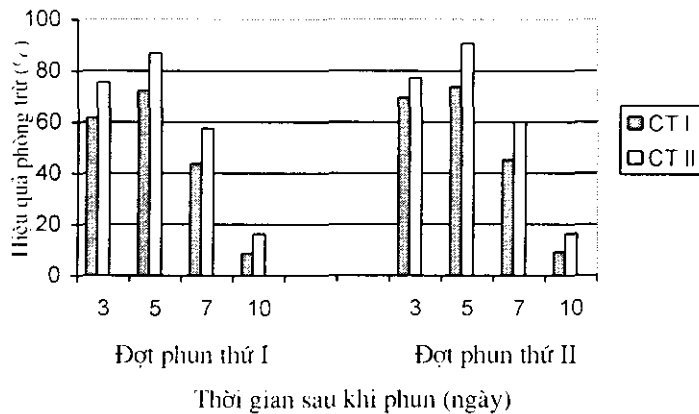


Hình 5: Hiệu quả trừ sâu tơ (*Plutella xylostella* L.) của chế phẩm MM (thí nghiệm trong phòng)

Ghi chú: CT I: Momosertatin ; CT II : Momosertatin + Bt 8.500IU/mg (25% liều lượng dùng) ; CT III: Momosertatin + Bt 17.000IU/mg (50% liều lượng dùng) ; CT IV: Momosertatin (50% liều lượng dùng) + Bt 17.000IU/mg (50% liều lượng dùng); CT V: Bt 35.000IU/mg (liều lượng khuyến cáo) ; IU: Số lượng bào tử của *B. Thuringiensis*

5.2.2. Tác dụng của chế phẩm MM đối với sâu tơ (*Plutella xylostella* L.) ở ruộng bắp cải. (Thí nghiệm tại Hợp tác xã Yên Nhân - Tiên Phong - Mê Linh - Vĩnh Phúc từ 23/5/2000 đến 20/6/2000)

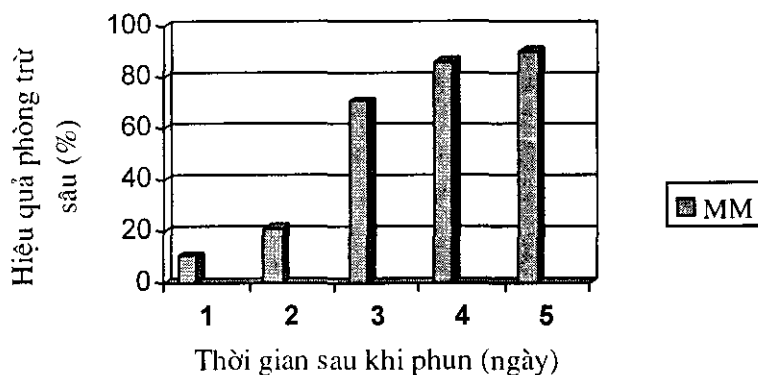
Trước khi phun thuốc đã tiến hành điều tra sâu tơ ở ruộng bắp cải, kết quả cho thấy: mật độ sâu tơ trung bình là 15 con/cây bắp cải, sâu tuổi 1-tuổi 3 chiếm 62%, tuổi 4-tuổi 5 khoảng 37%.



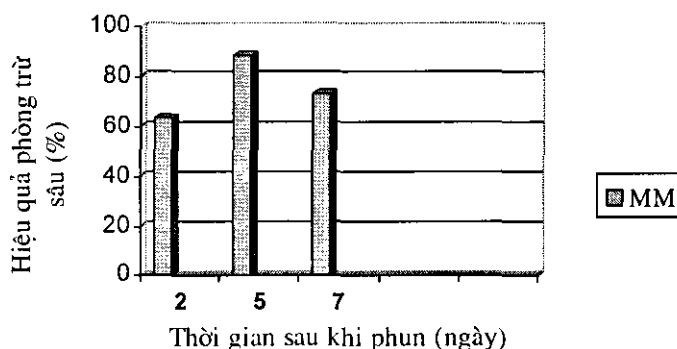
Hình 6. Hiệu quả trừ sâu tơ (*Plutella xylostella* L.) hại bắp cải của chế phẩm MM tại HTX Yên Nhân - Tiên Phong - Mê Linh - Vĩnh Phúc. Đợt I (23/5-4/6/2000) và đợt II(5/6-20/6/2000)

Đã tiến hành phun 2 đợt: đợt I (23/5 - 4/6/2000) khi rau còn non, đang bắt đầu cuốn, ruộng được chia thành các ô để xử lý: đối chứng chỉ phun nước, các ô khác phun Mo hoặc MM hoặc Bt 0,1%, tiến hành điều tra sâu vào các ngày thứ 3, 5, 7 và 10 sau khi phun. Kết quả cho thấy: hiệu quả phòng trừ sâu tơ của chế phẩm MM luôn cao hơn Mo (hình 6) sau 5 ngày phun, hiệu quả trừ sâu của chế phẩm MM đạt 86%, nhưng đến ngày thứ 7 hiệu quả trừ sâu của cả 2 chế phẩm đều giảm. Vì vậy đến ngày thứ 11 (5/6) bắt đầu phun đợt thứ hai và lại tiến hành điều tra như trên. Kết quả cũng tương tự đợt I, hiệu quả đạt cao nhất (90%) vào ngày thứ 5 sau khi phun,

Chế phẩm MM cũng đã được thử nghiệm đối với các ruộng rau cải ngọt (hình 7), rau súp lơ (hình 8), và cũng nhận được kết quả tương tự: sau 5 ngày phun hiệu quả trừ sâu đạt đến 90% (cải ngọt có chu kỳ sinh trưởng ngắn nên chỉ phun một lần).



Hình 7. Hiệu quả trừ sâu tơ hại rau cải ngọt của chế phẩm MM vụ rau đông năm 2000. (Tại HTX Yên Nhân - Tiên Phong - Mê Linh - Vĩnh Phúc)



Hình 8. Hiệu quả trừ sâu tơ hại rau súp lơ của chế phẩm MM vụ rau đông năm 2000. (Tại HTX Yên Nhân - Tiên Phong - Mê Linh - Vĩnh Phúc)

VI. KẾT LUẬN

1. Đã xây dựng và hoàn thiện qui trình sản xuất chế phẩm MOMOSERTATIN từ hạt gác (dạng lỏng hay dạng bột) với chất lượng ổn định. Chế phẩm có tác dụng trừ sâu tơ cao hơn đối với sâu khoang và sâu xanh. Chế phẩm dạng lỏng khi bảo quản ở 5°C hầu như không bị giảm sau 4 tháng và còn 80% sau 8 tháng.

2. Đã tạo được chế phẩm hỗn hợp MM bao gồm: MOMOSERTATIN và Bt mỗi thứ 50% liều dùng. Chế phẩm có tác dụng trừ sâu tơ cao; hiệu quả trừ sâu tơ của chế phẩm MM cao hơn chế phẩm MOMOSERTATIN.

3. Hiệu quả trừ sâu tơ hại rau (thí nghiệm ngoài đồng ruộng) bắp cải, cải ngọt, súp lơ đều đạt trên 86% sau khi phun thuốc 5 ngày và không ảnh hưởng xấu đến lá rau nhưng sau đó lại giảm. Vì vậy khi sử dụng MM cách 10 ngày phải phun lại đợt khác.

V. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Broadway, R. M.; Duffey, S. S. (1986): Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. J. Insect. Physiol. 32: 827-833.
2. Pham Thi Tran Chau, J. Leluk, T. Wilusz, A. Polanowski (1985): Isolation of two trypsin inhibitors from resting seeds of the white bush (*Cucurbita pepo* var. *patissonina*) and their properties. Acta Biochim. Pol. 32 (4): 319-328.
3. Pham Thi Tran Chau, J. Leluk, A. Polanowski, T. Wilusz (1985): Purification and characterization of the trypsin inhibitor from *Cucurbita pepo* var *patissonina* fruits. Biol. Chem. Hoppe - Seyler 366 (10): 939 - 944.
4. Pham Tran Chau, V. T. Hien, P.T. Ha, N.H.M. Quyen, N.T. Mai (1993): Preliminary data of trypsin inhibitors (TIs) from squash seeds of Vietnam. 10th Federation of Asian and Oceanian Biochemists Symposium on Protein Research. December 7 - 10/1993, Taiwan, Taipei Abstracts PIII - 21.
5. Pham Tran Chau, Toan N.M and Tan Tran Q. (1997): Effects of Momosertatin on the growth and mortality of insect pests, *Plutella xylostella* (Px) and *Spodoptera litura* (Sl). 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. August 24-29, 1997, San Francisco CA. Abstract reference No 333.
1. 6. Pham Thi Tran Chau, Phan Thi Ha, Trinh Hong Thai (1998): Characteristics of Proteinases from Larvae of *Heliothis armigera* and *Spodoptera litura*. J. Biochem. Mol. Biol. and Biophys. Vol 2 (3): 1-7.
6. Gatehouse, A.M.R.; Boulter, D. (1983): Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea and other legumes on the development of the bruchid beetle. J. Sci. Food Agric. 34: 345-350.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.C., Randall R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-270.
8. Pietrowa J.S., Wincjunajte M.M., (1966): Opređenje proteolitičeskoj aktivnosti fermentnykh preparatov mikrobiologičeskovo proiskhozhdenia. Priklad. Biochem. Mikrobiol, 2:232 (Tài liệu tiếng Nga).
9. N.H.M. Quyen and P.T.T. Chau (1994) : Distribution of trypsin inhibitors in loofah (*Luffa cylindrica* Roem) and Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). Proceedings of the 11th FAOBMB symposium 15-18/11/1994. Biopolymers and Bioproducts: Structure and Application p. 309-404. samalhisana (dokya) Public Company limited , 1995.
10. Phạm Trân Châu, Trịnh Hồng Thái (1995): Tinh sạch và nghiên cứu một số tính chất của sâu xanh (*Heliothis armigera*). Tạp chí Khoa học Đại học quốc gia Hà nội, KHTN, T. XI (1): 42-50.
11. Phạm Trân Châu, Nguyễn Tuyết Mai, Phan Thị Hà (1993): Tinh sạch antilizin từ phổi bò, nghiên cứu tính chất và sơ bộ thăm dò khả năng ứng dụng của chế phẩm. Tạp chí Sinh học 15(4): 8-10.
12. Trịnh Hồng Thái, Phạm Trân Châu (1993): Hoạt độ proteolytic và hoạt độ antiproteolytic của dịch chiết từ sâu xanh (*Heliothis armigera*). Tạp chí sinh học T. 15(4): 35-40.
13. Trịnh Hồng Thái, Phạm Trân Châu (1995): Hoạt độ proteolytic và antiproteolytic của sâu xanh (*Heliothis armigera*) trong quá trình biến thái từ nhộng đến con sinh trưởng. Tạp chí sinh học T. 17 (3): 28-33.
14. Nguyễn Quang Vinh, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Tuyết Mai, Phan Thị Hà (1998): Nghiên cứu dư lượng của chế phẩm Momosertatin trên lá theo thời gian sau khi xử lý lá với chế phẩm. Tạp chí Khoa học và Công nghệ XXXVI, 6B, 25-29.

SUMMARY

INSECTICIDE EFFECT OF MOMOSERTATIN, A PREPARATION FROM *MOMORDICA COCHINCHINENSIS* SEEDS

PHAM THI TRAN CHAU, PHAN THI HA, MAI NGOC TOAN, TRINH
HONG THAI, NGUYEN QUYNH UYEN, HOANG THU HA.

Biotechnology Center, Vietnam National University, Hanoi.

TRAN QUANG TAN, HOANG THI VIET, TRAN DINH PHA,
PHAM ANH TUAN, LUONG THI ANH CU.

Institute of plant Protection, Hanoi.

Protein insecticides are usually harmless or have low toxicity for humans and animals, they are easily degraded in natural conditions, therefore long duration quarantine is not necessary after spraying.

Proteins extracted from *Bacillus thuringiensis* (Bt) are efficacious insecticide proteins that are marketed and broadly used. However, concerns have begun to raise regarding pest resistance to Bt. Therefore, since more than ten years, searches for other proteins have begun to be carried out. Enzyme inhibiting proteins, out of which protein proteinase inhibitors (PPI), have begun to be studied for use as insecticide.

MOMOSERTATIN is a PPI preparation isolated from *Momordica cochinchinensis* seeds. Three PPIs were studied in terms of primary structure². The laboratory test showed that after 2 days feeding second instar larvae of *Plutella xylostela* L. by leaves treated with **Momosertatin** (Mo), the insecticide effect reached 80-90%. The preparation was able to inhibit the growth and the development of *Spodoptera litura* F. and *Plutella xylostela* L. 2nd and 3rd instar larvae, thus reducing their destroying ability.

Besides, Mo reduced the proportion of pests entering the pupa, and increased the rate of anomalous butterflies.

Experiments on the field with kohlrabi, cabbage, cauliflower ... showed that the insecticide effect against *Plutella xylostela* L. of the preparation reached more than 60%.

Mixture of Mo with Bt (each ingredient 50% of its using dose) increased the insecticide effect against *Plutella xylostela* L. and reduce the cost price of the preparation

NGHIÊN CỨU TẠO IMMUNOTOXIN TÁI TỔ HỢP

PHAN VĂN CHI

Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN & CNQG

I. IMMUNOTOXIN - HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG

Cộng hợp độc tố miễn dịch (Immunotoxin-ITs) được xác định là những chất gây độc cho tế bào, được tạo ra để giết một cách chọn lọc quần thể tế bào mà ở đó có biểu hiện những kháng nguyên hoặc receptor bề mặt đặc hiệu. Những độc tố dạng này đang được nghiên cứu và chế tạo không chỉ trong trị liệu ung thư [1], mà còn được thử nghiệm trên các bệnh khác như GvHD (graft-versus-host disease), các bệnh tự miễn dịch và AIDS [2]. Immunotoxin được tạo ra bằng việc kết hợp giữa hai yếu tố là chất gây độc (toxins) có bản chất là protein và tác nhân hướng đích theo các phương pháp liên kết hoá học hoặc bằng công nghệ ADN tái tổ hợp. Cho đến nay, các toxin thường hay được dùng nhất để chế tạo ITs là các protein từ vi khuẩn [*Pseudomonas* exotoxin (PE) hay diphtheria toxin (DT)], hay từ thực vật [nhóm các protein bất hoạt ribosom (Rips) như: Ricin, Pokweed anti-viral protein (PAP), Saporin (SAP)...]. Cả hai loại toxin này tác động lên tế bào theo cơ chế làm bất hoạt EF-2 (PE, DT) hay tác động lên điểm gắn của EF-2 (Rips) trên tiểu phần ribosom 28S, làm ức chế quá trình sinh tổng hợp protein. Mặc dù các toxin kể trên thường có hoạt tính cao và chỉ bằng không đến 10 phân tử có thể giết chết một tế bào đích, việc kết hợp chúng để tạo ra ITs còn mang lại giá trị sử dụng cao hơn nhiều. Các kết quả nghiên cứu cũng đã cho thấy ITs tạo ra từ các toxin kể trên có khả năng ức chế tế bào ung thư mạnh và hiệu quả do có tính hướng đích và chọn lọc [3]. Các tác nhân hướng đích được dùng để chế tạo ITs là các loại kháng thể đơn dòng (MoAbs), hormon sinh trưởng, cytokin, receptor tan... Trên thế giới, nhiều tác giả cũng đã thử và thành công trong việc tạo cộng hợp độc tố miễn dịch RIPS với các kháng thể đơn dòng. Một hướng khác cũng đang được tiến hành là nghiên cứu tạo dòng phân tử protein lai tái tổ hợp giữa RIPS hoặc các độc tố khác với các protein hoặc peptid có khả năng nhận diện các tế bào đích thông qua các kháng nguyên hoặc receptor đặc hiệu trên bề mặt tế bào đích. Đây là những hướng nghiên cứu được coi là có triển vọng nhằm tạo ra những sản phẩm là độc tố miễn dịch tái tổ hợp (recombinant immunotoxin) đặc hiệu phục vụ cho việc trị liệu không chỉ cho một số dạng ung thư mà còn cho một số bệnh tự miễn và AIDS.

II. IMMUNOTOXIN VÀ QUÁ TRÌNH APOPTOSIS

Những thử nghiệm về tác động của PE và DT lên quá trình ribozyl hoá ADP của EF-2 cho thấy có thể hậu quả của những tác động này chính là cái chết đã được mã hoá (apoptosis) cho tế bào [4-6]. Mặc dù chưa rõ về cơ chế tác động nhưng những kết quả tương tự cũng đã thu được khi nghiên cứu tương tác của immunotoxin dựa trên cơ sở PE và kháng nguyên Lewis^x trên các tế bào biểu mô của các dạng ung thư vú và ruột kết [7]. Có hai đặc tính đã được ghi nhận trong quá trình gây chết cho tế bào là (1) kích hoạt nhóm các cystein protease (còn được gọi là caspase) và (2) phân cắt các "cơ chất chết" như PARP [poly(ADP-ribose) polymerase] do xúc tác của caspase [8]. Các kết quả nghiên cứu về ức chế caspase và sử dụng cơ chất huỳnh quang mang những trình tự nhận biết đặc hiệu cũng chứng minh ITs tham gia kích hoạt caspase-3 hoặc một loại protease có liên quan

Tính gây độc cho tế bào của ITs cũng có thể so sánh với TNF- α , khi mà sự hiện diện của chúng hoàn toàn phụ thuộc vào cơ chế apoptosis [7]. Bổ xung chất ức chế caspase hoặc kích hoạt sinh tổng hợp anti-apoptotic protein Bcl-2 có thể hoàn toàn dừng quá trình apoptosis. Trong các điều kiện như trên cả PE và TNF đều không thể xúc tác cho phản ứng phân cắt PARP. Các kết quả này cho thấy, có thể PE giết các tế bào bằng cả hai cơ chế: ức chế sinh tổng hợp protein và gây ra apoptosis bằng quá trình hoạt hoá caspase [8]. Tuy nhiên cũng phải thấy rằng apoptosis không chỉ đơn thuần là sản phẩm phụ của quá trình ức chế sinh tổng hợp protein. Cycloheximide ức chế sinh tổng hợp

protein bằng một cơ chế hoàn toàn khác nhưng lại không gây sự phân cắt PARP. Như vậy, để đánh giá rõ hơn vai trò của cơ chế apoptosis cần có những thử nghiệm về tác động của ITs trên tế bào trong những điều kiện về nồng độ và thời gian tiếp xúc nhất định.

III. TẠO IMMUNOTOXIN TÁI TỔ HỢP TRÊN CƠ SỞ GEN MÃ HOÁ CHO PROTEIN BẤT HOẠT RIBOSOM (RIP)

Protein bất hoạt ribosom (Rips) là những chất độc có hoạt tính rRNA N-glycosidase (EC 3.2.2.22). Các protein này có khả năng nhận biết và cắt gốc adenine đặc hiệu trên cấu trúc “loop” bảo thủ của rRNA, làm ức chế quá trình sinh tổng hợp protein. Nhờ có cơ chế tác động đặc biệt này, Rips được quan tâm nghiên cứu nhiều vì có khả năng được sử dụng trong Y-Dược để tạo các dạng immunotoxin.

Trong thời gian 1998-2000 các cán bộ ở Phòng Hoá sinh Protein, Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN & CNQG đã nghiên cứu thành công không chỉ tạo dòng phân tử, xác định trình tự gen mà còn tạo được hệ biểu hiện gen mã hoá cho Trichobakin, một loại protein bất hoạt ribosome từ cây *Trichosanthes* sp. Bac Kan 8-98 (Họ *Cucurbitaceae*) [9, 10]. Trichobakin tái tổ hợp sau khi được biểu hiện ở *E. coli*, đã được tinh sạch và chứng minh là có hoạt tính rRNA N-glycosidase cao và có khả năng ức chế quá trình sinh tổng hợp luciferase trên mô hình RRL (Rabbit reticulocyte Lysate) [11]. Những thử nghiệm ban đầu cũng cho thấy chế phẩm protein có khả năng không chỉ kháng vi khuẩn, virus, mà còn ức chế các dòng tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*.

Để có thể có những ứng dụng hiệu quả hơn, hướng nghiên cứu chính đang được triển khai là nghiên cứu tạo immunotoxin tái tổ hợp và giải quyết vấn đề hướng đích đặc hiệu cho loại protein này. Một số dạng protein lai được thiết kế dựa trên sự liên kết trình tự gen mã hoá cho Trichobakin với đoạn gen mã hoá cho vùng EGF-like domain ở uPA hoặc trình tự gen mã hoá cho GnRH (gonadotropin-releasing hormone). Cơ sở để chọn các gen kể trên là do các receptors của uPA thường được biểu hiện khá nhiều trên một số tế bào ung thư di căn và được coi là những chỉ thị phân tử quan trọng trong chẩn đoán ung thư ở người [12]. Còn ở các tế bào ung thư mang GnRH receptor thường lại có biểu hiện loại “death receptor” Fas [13]. Sự liên kết giữa GnRH (hoặc dẫn xuất) với GnRH receptor trên các tế bào ung thư kích hoạt biểu hiện Fas ligand, gây ra quá trình apoptosis cho tế bào [14]. Các thiết kế gen được tiến hành dựa trên cơ sở hệ vector biểu hiện Trichobakin pQV-20 như đã được công bố [9]. Trình tự polynucleotid mã hoá cho EGF-like domain từ gen uPA của người được nối tiếp với gen mã hoá cho Trichobakin từ đầu N, tạo nên một trình tự có nghĩa bao gồm 807 bp, mã hoá cho 269 amino acid. Protein lai này có khối lượng phân tử khoảng 30 kDa. Còn đoạn gen mã hoá cho GnRH được nối với gen mã hoá cho Trichobakin thông qua một polynucleotid trung gian mã hoá cho khoảng 13 amino acid. Kích thước của phân tử lai này sẽ là 31 kDa. Thiết kế các amino acid (hoặc peptid) nằm giữa hai polypeptid trong phân tử của protein lai tạo nên sự mềm dẻo trong cấu trúc và tính tan của protein. Với những kích thước tương tự, các immunotoxin tái tổ hợp được coi là ít gây các phản ứng phụ hơn so với các loại cộng hợp độc tố miễn dịch có kích thước lớn (~ 200 kDa) được tạo nên bằng phương pháp liên kết hoá học. Hơn nữa, các immunotoxin kích thước nhỏ còn có thể đáp ứng các yêu cầu để điều trị cho các khối u thể rắn [1]. Các hệ vector biểu hiện puPA-TBK và pGnRH-TBK như đã thiết kế được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21(DE3). Các protein tái tổ hợp cũng đã được biểu hiện và tinh chế theo các phương pháp như đã được mô tả với Trichobakin tái tổ hợp [11]. Các immunotoxin tái tổ hợp đã được chứng minh là có hoạt tính bất hoạt ribosom và ức chế quá trình sinh tổng hợp protein trên mô hình tế bào nuôi cấy *in vitro* (RRL). Những thử nghiệm đang tiếp tục được triển khai để kiểm tra liệu các immunotoxin tái tổ hợp như đã thiết kế trên cơ sở gen mã hoá cho Trichobakin có khả năng tác động và gây nên apoptosis trên các tế bào đích hay không. Các chế phẩm protein-ITs tái tổ hợp đang được thử nghiệm không chỉ trên các dòng tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*, mà còn đối với một số mô hình bệnh lý khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kreitman, R.J., and Pastan, I. (1998) // *Advanced drug delivery reviews* **31**, 53-88
2. Thrush, G.R., Lark, L.R., Clinchy, B.C. and Vitetta, E.S. (1996) // *Ann. Rev. Immunol.* **14**, 49-71
3. Li, B.Y., and Ramakrishnan, S. (1994) // *J. Biol. Chem.* **269** (4), 2652-2658
4. Chang, M.P., Bramhall, J., Graves, S., Bonavida, B., and Wisnieski, B.J. (1989) // *J. Biol. Chem.* **264**, 15261-15267
5. Morimoto H., and Bonavida, B. (1992) // *J. Immunol.* **149**, 2089-2094
6. Brinkmann, U., Brinkmann, E., Gallo, M. (1996) // *Biochemistry* **35**, 6891-6899
7. Keppler-Hafkemger, A., Brinkmann, U., and Pastan, I. (1998) // *Biochemistry* **37**, 16934-16942
8. Houchins, J.P. (2000) // *Stem Cell* **18**(5), 384-385
9. Nguyen Thuy Ha, Hoang Quoc Truong, Tong Quynh Mai, Nguyen Thi Ty, Nguyen Huu Hien, Phan Quoc Kinh, Le Tran Binh and Phan Van Chi (1999) // *Proceedings of Natl. Biotech. Conference*, Dec. 9-10, 1999, Hanoi, pp. 1121-1128
10. Phan Van Chi, Hoang Quoc Truong Nguyen Thuy Ha, Le Tran Binh and Won-Il Chung (2000) // *The 3rd International Symposium on Life Science*, Sept. 19, 2000, Cheju, Korea, pp. 13
11. Phan Van Chi, Hoang Quoc Truong, Nguyen Thuy Ha, Pham Cong Hoat and Le Tran Binh (2000) // *in Problems of Basic Research in Biology, Vietnam Natl. Uni. Publ. House*, Hanoi, 2000, pp. 23-28
12. Andreasen, P.A., Kjeller, L., Christensen, L., and Dufy, M.J. (1997) // *Int. J. Cancer* **72**, 1-22
13. Imai, A., Horibe, S., Takagi, A., Tagaki, H., Ohno, T., and Tamaya, T. (1997) // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **74**, 73-78
14. Imai, A., Takagi, A., Horibe, S., Tagaki, H., and Tamaya, T. (1997) // *Int. J. Oncol.* **13**, 97-100

SUMMARY

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT IMMUNOTOXINS

PHAN VAN CHI

Institute of Biotechnology (IBT)

National Center for Natural Science & Technology (NCST)

Several kinds of immunotoxins (ITs) designed to selectively kill populations of cells that display specific cell surface antigens, have been generated by using recombinant DNA technology. They have been developed by the fusion of the nucleotide sequence of the Trichobakin, a type 1 ribosome-inactivating protein (RIP) from *Trichosanthes* sp. Bac Kan 8-98 with specific rRNA N-glycosidase activity and the sequences encoding for an EGF-like domain of human uPA and/ or GnRH whose receptors are overexpressed in several metastatic tumor cells and are strong prognostic marker in some human tumors. The resulting recombinant toxins were produced in *Escherichia coli* by using pET-vector system (Novagen). As the purified chimeric proteins were characterized for its ribosome-inactivating activity and proved to be potent inhibitors of protein synthesis in cell-free assays, it's interesting to investigate if the ITs have the ability to induce apoptosis in targeted cells. The purified recombinant ITs are now tested not only for killing tumor cells, but also for other immunologically related diseases.

SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ VI SINH TRONG SẢN XUẤT

PHÂN BÓN HỮU CƠ VI SINH

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG CHI- LÝ KIM BÀNG, TANG THỊ CHÍNH, LÊ GIA HUY, PHẠM THANH HÀ, HỒ KIM ANH, PHAN TUYẾT MINH, LÊ THANH XUÂN, NGUYỄN THỊ QUỲNH MAI

Viện Công nghệ Sinh học- TTKHTN&CNQG

I. GIỚI THIỆU CHUNG

Sau hơn nửa thế kỷ sử dụng rộng rãi đến mức lạm dụng phân bón hóa học, các nước tiên tiến trên thế giới chợt nhận ra mặt trái của vấn đề là các chất hóa học dùng trong nông nghiệp đã gây ô nhiễm môi trường trầm trọng. Quá trình sản xuất các chất phân bón hóa học vừa tốn kém trong chi phí đầu tư lại vừa làm ô nhiễm môi trường không khí, nước, đất. Đồng thời khi bón nhiều và lâu dài xuống ruộng, các chất hóa học đã phá huỷ sinh thái đất, tồn dư trong đất làm vô cơ hóa đất, gây ô nhiễm môi trường đất và gây nhiễm độc thực ăn cho người và động vật qua rau xanh, ngũ cốc.

Các kết quả nghiên cứu từ Mỹ, Canada, Nga, Nhật, Ấn Độ, Trung Quốc, Thái Lan... cho thấy sử dụng chế phẩm vi sinh vật có thể cung cấp cho đất và cây trồng từ 30 đến 60 kg Nitơ/ ha đất/ năm, có thể thay thế từ 1/3 đến 1/2 lượng lân hóa học. Nhiều tác giả đã khảo sát thấy hiệu quả sử dụng phân lân hóa học rất thấp do các phản ứng kết tủa ngược xảy ra trong đất. Premono (1994- Indonexia) đã thông báo hiệu quả này chỉ đạt 1- 5%. Chỉ có nhờ vi sinh vật mới có thể chuyển hóa tốt các hợp chất photphat khó tan trong đất thành dễ tiêu cho cây.

Gần đây ở một số địa phương, nhất là ở Tây Nguyên đã xuất hiện một số cơ sở sản xuất chế phẩm phân bón hữu cơ- sinh học, dựa trên nguyên tắc phối trộn giữa than bùn với các phế thải của nông nghiệp và phân chuồng, thêm một tỷ lệ thấp phân hóa học đạm lân và kali. Các qui trình ủ và phối trộn này về bản chất chủ yếu dựa vào hệ vi sinh vật hoang dại có sẵn trong phân, rác và một phần do tác dụng các axit mùn (axit humic, fulvic...) có sẵn trong than bùn. Vì vậy thời gian ủ trộn kéo dài và chất lượng không ổn định vì không có sự chọn lọc định hướng hệ vi sinh vật. Cũng có một số cơ sở đã sử dụng các chế phẩm vi sinh vật để ủ than bùn hoặc các chất phế thải: vỏ bã cà phê..., nhưng cũng chỉ dừng lại ở mức phân hữu cơ sinh học. Hầu như rất hiếm có chế phẩm đúng nghĩa là phân hữu cơ- vi sinh, bởi vì không chứa một lượng lớn vi sinh vật hữu ích cho cây trồng.

Với những lý do trên, việc nghiên cứu để sản xuất các chế phẩm phân hữu cơ- vi sinh vật từ các phế liệu trong nước là vấn đề cấp thiết, nhằm nâng cao năng suất và chất lượng nông sản, giảm chi phí đầu tư sản xuất, tiết kiệm ngoại tệ và bảo vệ môi trường không khí, đất, nước, xây dựng nền nông nghiệp sinh thái bền vững.

Trong báo cáo này chúng tôi muốn trình bày một số kết quả chính trong nghiên cứu sử dụng công nghệ vi sinh vật để sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh từ nguyên liệu hữu cơ là rác thải đô thị (phân hữu cơ) và từ than bùn

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Các chủng vi sinh vật lấy từ bộ sưu tập chủng của các phòng thí nghiệm thuộc Viện Công nghệ Sinh học

- Đánh giá các chủng vi sinh vật theo định hướng có lợi của chúng bằng cách nuôi cấy trong các môi trường riêng biệt và xác định hàm lượng các sản phẩm tạo thành (gồm 14 phương pháp)

- Phân loại các chủng vi sinh vật theo các khóa phân loại của Raper (1966), Nonomura, Bergey (1984, 1989), Kít chuẩn của Biomireux: API20E, API20NE, 50CHB. Quan sát và chụp ảnh hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử

- Tối ưu hóa các thành phần của môi trường dinh dưỡng (các giai đoạn) bằng phương pháp toán học kế hoạch hóa thực nghiệm theo Makximov và Phedôrob

- Đánh giá chất lượng các chế phẩm bằng các phương pháp hóa, lý và sinh học

- Xác định tác dụng của các chế phẩm lên cây trồng: thử nghiệm chậu vại, đồng ruộng trên các đối tượng lúa, ngô, hoa, cà chua, vườn cây ăn quả, cà phê.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1) Các chủng vi sinh vật được dùng trong các công đoạn sản xuất chế phẩm phân hữu cơ vi sinh

a. Các chủng vi sinh vật phân giải chất hữu cơ (chủ yếu là xenlulôza) trong các nguồn nguyên liệu

Để phân lập và tuyển chọn các chủng VSV ưa nhiệt có khả năng sinh tổng hợp xenlulaza cao, chúng tôi chọn các chủng sinh trưởng và phát triển được trên môi trường có chứa bột xenluloza và bột CMC ở 500C, ở nhiệt độ này các chủng nấm mốc không phát triển được. Trong số 140 chủng có hoạt tính xenlulaza đã chọn được:

-8 chủng vi khuẩn (ký hiệu CD-1, CD-2, CD-3, CD-4, CD9, CD-14, CD-45 và C5) có hoạt tính xenlulaza (cả CI và Cx) mạnh để tiếp tục nghiên cứu. Sử dụng bộ Kit chuẩn và dựa vào khóa phân loại của Bergey đã định loại 7 chủng thuộc chi Bacillus còn 1 chủng thuộc Pseudomonas (C5)

-12 chủng xạ khuẩn (ký hiệu C1, C3, CD-30, CD-31, CD-6.2, CD-6.9, CD-6.10, N24, N43, CD-99, CD-108 và CD-5.12). Các chủng này thuộc chi Streptomyces.

Các chủng này đều là VSV ưa nhiệt (có thể sinh trưởng cho đến 600C)

Kết quả nghiên cứu các đặc điểm sinh lý sinh hóa cho thấy các chủng đều có hệ enzym amylaza, proteaza và xenlulaza phong phú. Như vậy các chủng này là những giống rất tốt trong việc sản xuất chế phẩm phân giải nhanh các nguồn nguyên liệu chứa chủ yếu các chất hữu cơ gồm xenlulo, protein, tinh bột.

b. Các chủng vi sinh vật có ích cho cây trồng

Từ hàng trăm chủng vi sinh vật hữu ích đối với cây trồng, đã lựa chọn một số chủng dùng sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh từ rác thải:

-Các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ cao, ký hiệu III e, 4g, AN11. Các chủng đã được định tên: *Enterobacter aerogenes* IIIe, *Enterobacter cloacae* 4g và *Azotobacter chroococcum* AN11.

-Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphat khó tan, ký hiệu RTL2.2, RTL7, ĐTL2.2. Đã xác định 2 chủng RTL7 và ĐTL2.2 thuộc chi *Achromobacter* và chủng RTL2.2 thuộc chi *Pseudomonas*.

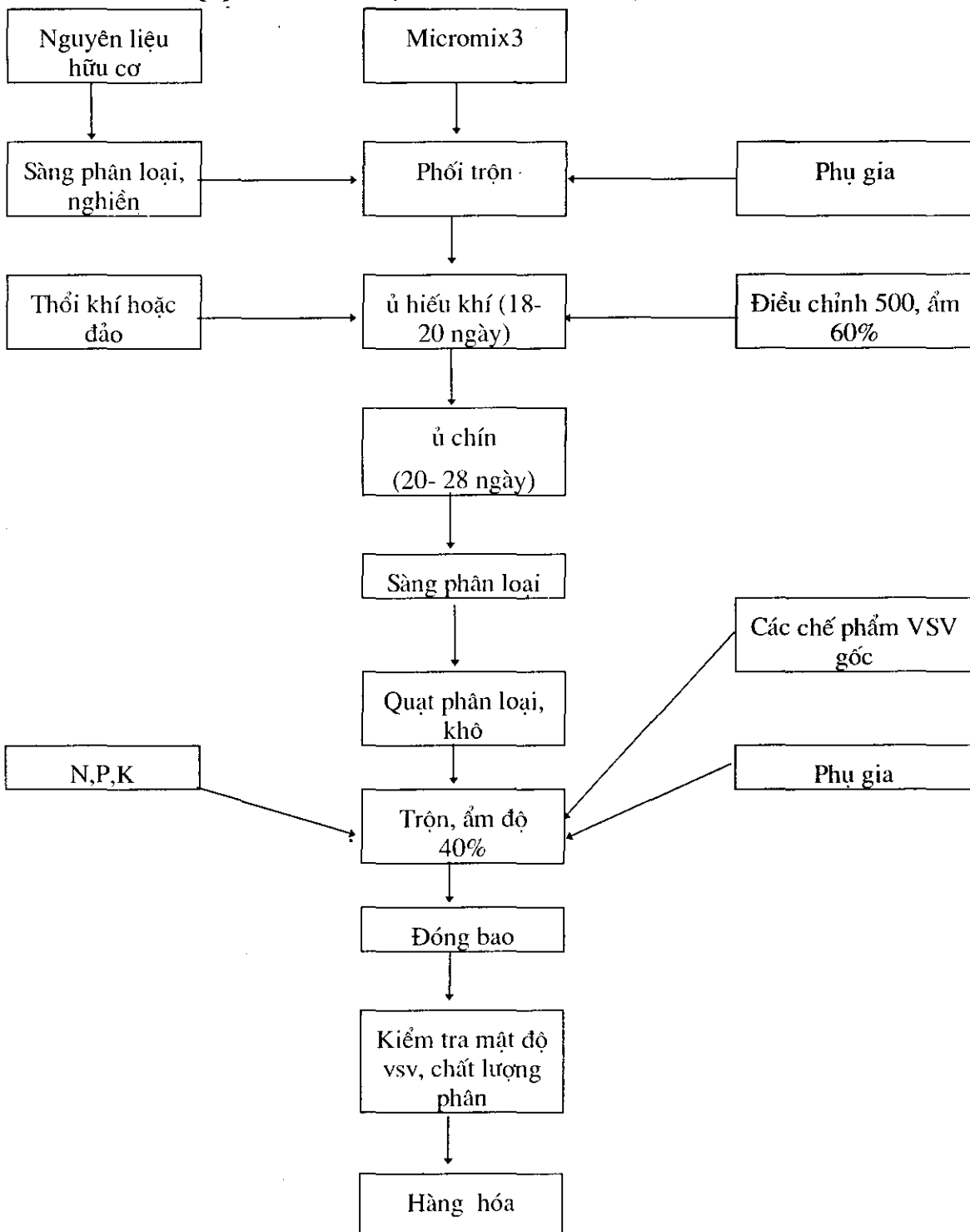
-Ba chủng IIIe, 4g và AN11 có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA thô (và các nhóm chất tương tự) mức độ cao.

Các chủng nói trên đều có khả năng sinh trưởng trong phổ pH rộng. Các chủng khác nhau có khả năng thể hiện hoạt tính cao nhất trong các nguồn cacbon, nitơ, photpho khác nhau, tạo thuận lợi cho việc cùng hoạt động trong một môi trường. Đó là một số trong những cơ sở khoa học cho việc tạo hỗn hợp chủng của chế phẩm.

Từ các chủng vi sinh vật đã tuyển chọn ở trên, đã sản xuất các chế phẩm giống vi sinh vật cho các công đoạn sản xuất phân bón hữu cơ- vi sinh

2) Quy trình sản xuất phân hữu cơ - vi sinh

Sơ đồ 1: Quy trình sản xuất phân hữu cơ- vi sinh từ rác thải



a. Quy trình sản xuất

Quá trình sản xuất phân hữu cơ- vi sinh được thực hiện nhờ công nghệ vi sinh vật qua hai giai đoạn chính:

- Giai đoạn đầu đưa chế phẩm chứa hỗn hợp các chủng vi sinh vật phân giải xenlulô phân

giải nhanh nguyên liệu hữu cơ (tên gọi: Micromix 3). Sản phẩm giai đoạn này có thể gọi là phân hữu cơ. Trong thực tế hiện nay, một số cơ sở sản xuất các loại “phân bón hữu cơ sinh học” là dạng chế phẩm từ than bùn hoặc phế thải hữu cơ và đến bước này thì trộn thêm một lượng N, P, K nào đó. Cho nên nếu đến giai đoạn này chưa thể gọi là phân hữu cơ vi sinh đúng nghĩa được.

-Giai đoạn tiếp theo, phối trộn các chế phẩm gốc của những vi sinh vật hữu ích cho cây trồng: vi sinh vật cố định nitơ, phân giải photphat khó tan, sinh chất kích thích sinh trưởng (tên gọi: đạm vi sinh 2, lân vi sinh 1, lân vi sinh 2)

Vấn đề mấu chốt ở đây là chọn lựa chủng và quy trình công nghệ đưa vào sao cho trong thành phẩm chứa số lượng lớn các vi sinh vật hữu ích. Đây là chế phẩm không thanh trùng nên các vi sinh vật hữu ích đưa vào phải có khả năng cạnh tranh với các vi sinh vật hoang dại để chiếm đa số trong chế phẩm. Sản phẩm cuối cùng là phân hữu cơ vi sinh, vừa có nguồn dinh dưỡng hữu cơ cho cây trồng, vừa cung cấp cho đất và cây hàng triệu nhà máy tí hon (vi sinh vật) đều đặn cung cấp nitơ, photpho, chất kích thích sinh trưởng.

sinh trưởng, vitamin.. cho cây trồng. Tổng thể quy trình sản xuất phân hữu cơ- vi sinh từ rác trình bày trong sơ đồ 1.

b. Chất lượng sản phẩm :Các chế phẩm vi sinh vật dùng trong các công đoạn để sản xuất phân bón hữu cơ-vi sinh từ than bùn hoặc rác thải đã được thử nghiệm nhiều lần qua các mô hình bình lên men trong phòng thí nghiệm, bể ủ 1,2 m³, bể ủ rác (dung tích 150 m³) tại xí nghiệp chế biến rác Cầu Diễn (Hà Nội) và xí nghiệp chế biến rác Việt Trì (Phú Thọ). Chế phẩm Micromix 3 đã rút ngắn thời gian chuyển hoá rác tới dạng phân hữu cơ được 14 ngày so với phương pháp hiện hành của các xí nghiệp rác.

Với 150 m³ rác ủ, bể đối chứng chỉ thu được bình quân 45 m³ mùn, trong đó bể thí nghiệm thu được 55,50 m³ mùn, tăng từ 20- 25%.

Bảng 1: So sánh thành phần mùn rác khi sử dụng chế phẩm vi sinh vật giống

Bể ủ	Mùn %	Σ C %	Σ N %	N để tiêu %	Σ P %	Σ K %	Axit humic %	pH
ĐC1	30,72	2,52	0,08	0,01	0,52	0,95	0,47	7,62
TN1	37,64	3,78	0,09	0,12	0,67	1,05	0,52	7,75
TN/ĐC %	122,52	150	112,5	120	128,85	110,53	110,64	

• ĐC: mẫu đối chứng, TN: mẫu thí nghiệm

Các chỉ tiêu phân tích chất lượng mùn rác của bể rác thải sinh hoạt sau khi ủ (bảng 1) trong bể thí nghiệm đều cao hơn bể đối chứng trên 10%, trong đó lượng mùn cao hơn 22,52%, hàm lượng nitơ để tiêu tăng 20%.

Mật độ các chủng vi sinh vật hữu ích trong thời gian bảo quản được trình bày trong bảng 2 và 3.

Bảng 2: Biến động mật độ các chủng vsv có khả năng cố định nitơ & sinh chất kích thích sinh trưởng trong phân HC-VS

(đơn vị: CFU/g)

Thời gian	Mật độ 4g	Mật độ IIIe	Mật độ AN11
1 tháng	$1,4 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$
2 tháng	$1,4 \cdot 10^7$	$6,3 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$
3 tháng	$3,0 \cdot 10^6$	$7,1 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^6$
4,5 tháng	$1,4 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$
6 tháng	$3,5 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^5$

Bảng 3: Biến động mật độ vi sinh vật phân giải photphat trong phân HC-VS từ rác thải

(đơn vị: CFU/g)

Thời gian	Mật độ RTL2.2	Mật độ ĐTL2.2	Mật độ RTL7	Mật độ MN1
1 tháng	$5,0 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^5$
2 tháng	$8,2 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^7$	$6,7 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^5$
3 tháng	$2,5 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	kxd	$2,0 \cdot 10^4$
3,5 tháng	kxd	kxd	$6,8 \cdot 10^6$	kxd
4,5 tháng	$1,7 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	kxd	$2,0 \cdot 10^4$
6 tháng	$2,1 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	kxd	$1,1 \cdot 10^3$

Theo số liệu trình bày trong bảng 2 và 3, mật độ các chủng vi sinh vật hữu ích trong chế phẩm phân hữu cơ vi sinh từ rác thải còn đạt 10^6 cfu/g sau 4 tháng bảo quản trong nhiệt độ trong phòng. Kết quả đạt tương tự trong tất cả các mẫu phân bón hữu cơ- vi sinh từ than bùn.

3) Tác dụng của phân hữu cơ- vi sinh đối với cây trồng

Đã tiến hành thử nghiệm ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh từ than bùn hoặc từ rác lên một số loại cây trồng từ quy mô chậu vại trong phòng thí nghiệm đến diện rộng vài sào hoặc vài héc ta tại một số địa phương Hà nội, Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Hải Dương, Đắc Lắc bao gồm lúa, ngô, cây ăn quả (nhãn, vải) ... Nông dân đều cho nhận xét bón loại phân hữu cơ- vi sinh này cây phát triển tốt, đỡ hẳn sâu bệnh, đất xốp và thấy tác dụng của phân bền lâu hơn hẳn so với bón phân hóa học hoặc NPK. Năng suất lúa, ngô, quả tăng và ngoại hình sản phẩm đẹp hơn.

Để minh họa cụ thể, có thể xem kết quả thử nghiệm tác dụng phân bón hữu cơ- vi sinh từ rác thải Cầu Diễn trong điều kiện chậu vại. Các chậu vại có kích thước 24cm x 24 cm, chứa đất phù sa sông Hồng. Mỗi mẫu lặp lại từ 5 đến 10 chậu trong mỗi đợt thử nghiệm, thí nghiệm lặp lại ít nhất 2 đợt.

-Thử nghiệm trên ngô (giống Bioseed)

Bảng 4: Tác dụng của phân HC-VS rác lên sinh khối ngô non

Mẫu thí nghiệm	Ngô vụ hè (18 ngày)		Ngô vụ đông (29 ngày)	
	Sinh khối TB (g/ cây)	Tăng so đối chứng (%)	Sinh khối TB (g/ cây)	Tăng so đối chứng (%)
Đối chứng	8,02		4,14	
ĐC rác	6,69	- 16,58	4,35	5,07
TN rác	10,11	26,06	4,74	14,49

Trong cả hai vụ, phân HC-VS từ rác Cầu Diễn đều làm tăng sinh khối cây ngô non rõ so với bón phân hữu cơ từ rác cũng như so với đất phù sa (Bảng 4).

Bảng 5: Tác dụng của phân HC-VS rác lên cây ngô

Mẫu thí nghiệm	Ngô vụ hè (2,5 tháng)		Ngô vụ đông (4 tháng)		
	Sinh khối TB (g/ cây)	Tăng so đối chứng (%)	Sinh khối thân TB (g/cây)	Tăng so đối chứng (%)	Trọng lượng rễ (g/cây)
Đối chứng	32,89		59,89		7,47
ĐC rác	41,65	26,63	68,87	14,99	7,55
TN rác	43,55	32,41	80,66	34,68	9,87

Phù hợp với kết quả thí nghiệm trên ngô non, qua thời gian sinh trưởng dài tới lúc ngô ra hoa và bắt đầu hình thành bắp, phân HCVS từ rác Cầu Diễn có hiệu quả hơn hẳn so với phân hữu cơ rác không vi sinh. Hiệu quả của phân vi sinh cũng được lâu. Kéo dài ngày sinh trưởng hiệu quả càng rõ chứng tỏ hoạt động đều đặn của các vi sinh vật trong đất.

-Thử nghiệm trên lúa (giống Q5), kết quả trong bảng 6 & 7

Bảng 6: Tác dụng của phân HCVS từ rác Cầu Diễn lên mạ lúa

Công thức thí nghiệm	Số cây mọc/300 h	Trọng lượng		Chiều cao	
		trung bình (g/cây)	% Tăng	trung bình (cm)	% Tăng
ĐCR	231	0,2426		23,00	
TNR	239	0,3477	43,32	24,67	7,26

Ngoại hình của cây mạ bón phân hữu cơ vi sinh đẹp hơn so với cây chỉ bón phân hữu cơ từ rác. Mạ xanh hơn, cứng cây, cao và mập hơn đối chứng (Bảng 6).

Bón phân HCVS cũng làm lúa tăng trọng toàn cây, tăng số lượng hạt trên khóm và quan trọng nhất là tăng năng suất hạt so với bón đối chứng phân rác hữu cơ không chứa vi sinh (Bảng 7).

Bảng 7: Tác dụng của phân HCVS từ rác Cầu Diễn lên sinh trưởng và năng suất lúa

Công thức	Trọng lượng cây(g/cây)	Số hạt chắc/ chấu	Số hạt lép/ chấu	Trọng lượng hạt khô/ch.	% tăng so ĐCR
ĐCR	82,82	1018	154	21,70 g	
TNR	97,78	1231	189	26,04 g	20,0

-Thử nghiệm trên cây cà chua (giống chịu nhiệt của Ba Lan)

Bảng 8: Tác dụng của phân HCVS từ rác Cầu Diễn lên cây cà chua

Công thức	Cà chua non (1 tháng tuổi)	
	Trọng lượng (g/cây)	% tăng so với ĐC
ĐC	1,16	
ĐCR	1,38	18,97
TNR	1,73	49,14

IV. KẾT LUẬN

Sử dụng những chủng vi sinh vật có tuyến chọn định hướng để sản xuất phân hữu cơ- vi sinh vừa làm rút ngắn thời gian chuyển hóa chất hữu cơ sang dạng mùn lại vừa nâng cao chất lượng và hiệu quả phân bón. Ủ rác với chế phẩm Micromix3 đã rút ngắn 14 ngày so với ủ rác thông thường, chất lượng mùn trong sản phẩm tăng. Tiếp theo bổ sung các chế phẩm giống vi

sinh vật hữu ích cho cây trồng để tạo nên chế phẩm phân hữu cơ- vi sinh chứa 106 cfu/g từng loại vi sinh vật hữu ích cho cây trồng (cố định nitơ, phân giải photphat, sinh chất kích thích sinh trưởng). Loại phân bón này có tác dụng tăng năng suất cây trồng, giảm lượng phân bón hóa học, tiết kiệm đầu tư sản xuất và giảm ô nhiễm môi trường đất, nước và thực phẩm

Tài liệu tham khảo

1. Babenko Ya. S., Tyrygina G.I., Grigoryv E. F., Dolgikh L.M., Bonxova T.L. (1984). Hoạt tính sinh học và đặc tính sinh lý sinh hoá của vi khuẩn chuyển hoá photphat (tiếng Nga). *Microbiol.* (4), 533-539.
2. David A. Zubeirer (1987). Collection, isolation, cultivation and maintenance of Associative Nitrogen fixing Bacteria. *Symbiotic Nitrogen fixation technology*. New York - Bael. 95-123.
3. Gaur A. C (1988). Biotechnology for the production of organics and biofertilizers by small rural industries. *Production of organics and biofertilizers*. 158-165.
4. Granhall Ulf. (1994). Biological fertilization. *Biomass and Bioenergy*. 6 (1/2), 81-91.
5. Kapoor K. K. (1996). Phosphate mobilization through soil micro - organisms plant Microbe Interaction in Sustainable Agriculture. CCS HAU. Hisar & M. M. B, New Delhi. 46-61.
6. Marcos A. de Brito Alvarez, Sergegagné & Hani Antoun (1995). Effect of Compost on Rhizosphere Microflora of the Tomato and on the Incidence of Plant Growth - Promoting Rhizobacteria. *App. Envirol. Microbiol.* 61, 194-199.
7. Premono M.E., Moaward A.M. and Vlek P.L. G. (1996). Effect of phosphate - solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian J. of Crop Sci.* 11 (1), 13-23.
8. Lý Kim Bảng, Lê Gia Hy, Tăng Thị Chính Phan Tuyết Minh, Lê Thanh Xuân, Trần Quang Huy, Đào Ngọc Quang, Phạm Thị Cúc(1999) . Sử dụng vi sinh vật cố hoạt tính phân giải xenluloza cao để nâng cao chất lượng phân huỷ rác thải sinh hoạt và nông nghiệp. — Báo cáo Khoa học, Tuyển tập HN. Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, 9- 10 tháng 12 năm 1999, Tr. 546
9. Nguyễn Thị Phương Chi, Lý Kim Bảng (1989). Sản xuất Rhizoda - chế phẩm vi sinh vật cố định đạm cho đậu tương trên môi trường than bùn. *Tạp chí sinh học*. 11(3), 26-28.
10. Nguyễn Thị Phương Chi và cộng sự (1994). ảnh hưởng của chế phẩm phân vi sinh vật cố định Nitơ lên sinh trưởng và năng suất lúa. *Tạp chí Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm*. (384), 215-218.
11. Nguyễn Thị Phương Chi và cộng sự (1996). Tác dụng của các chủng *Enterobacter* lên sinh trưởng của cây ngô non và mạ lúa. *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học 1995*. 92-98.
12. Nguyễn Thị Phương Chi, Hà Hồng Thanh, Phạm Thanh Hà (1997). Nâng cao chất lượng phân rác bằng *Azotobacter chroococcum* Q1 và *Aspergillus awamori* MN1. *Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học 1996*. 131-137.

Summary

Use of microbiotechnology to produce microbiofertilizer

Nguyen Thi Phuong Chi, Ly Kim Bang, Tang Thi Chinh, Le Gia Hy, Pham Thanh Ha, Ho Kim Anh, Phan Tuyet Minh, Le Thanh Xuan, Nguyen Thi Quynh Mai

Institute of Biotechnology- NCST

The high bioactivity microbial strains have been selected to manufacture the inoculants, which were used in producing microbiofertilizer. The inoculant named Micromix 3 contains complex of thermophilic, high cellulose decomposing activity actynomyces and bacteria.

Adding Micromix3 to organic wastes the degradation time has been reduced about 14 days in comparision with the control. The quality of organic compound is also increased, for example the humus content increased over 22,52%, the assimilable nitrogen content- 20%.

After that, the complex of useful microorganisms, which has high nitrogen fixing activity, phosphate solubilizing ability or plant growth promoting activity, have been added into the organic compound. This microbiofertilizer have the useful microbial density of about 10⁶ CFU / g.

The effects of microbiofertilizer on plants were determined under pot and field conditions. Showing increasing yield of rice, maize, tomato, some kind of fruit- bearing plants. Using this microbiofertilizer reduces the chemical manure requirement, save agricultural investment and diminishes the soil, water and food pollution.

LỰA CHỌN MÔI TRƯỜNG NHÂN NUÔI VÀ TẠO CHẾ PHẨM DIỆT MỐI TỪ *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

TẠ KIM CHÍNH, HÀ THỊ QUYẾN, HOA THỊ MINH TÚ

Viện Công nghệ Sinh học

Để mở rộng sản xuất chế phẩm vi nấm diệt mối với các nguồn nguyên liệu sẵn có ở Việt Nam lại có hiệu lực, chúng tôi tiến hành lựa chọn môi trường phù hợp cho việc nhân giống và sản xuất chế phẩm từ đó có thể tiến hành sản xuất đại trà.

Trong công trình này, chúng tôi đã thu được một số kết quả sau: Chọn được môi trường nhân giống cho các chủng *M. anisopliae* là môi trường Sabouraud có bổ xung vỏ châu chấu và môi trường để sản xuất chế phẩm diệt mối là môi trường hỗn hợp giữa cám gạo, cám ngô và bột đậu tương. Khảo nghiệm chế phẩm trên để phòng trừ mối *Coptotermes formosanus* đạt kết quả tốt.

I. MỞ ĐẦU

Từ những năm 80 của thế kỷ 20, trên thế giới, nhiều nhà Khoa học đã nghiên cứu và ứng dụng các chế phẩm sinh học từ vi nấm *Metarhizium anisopliae* mang tên thương mại *Metaquino* để phòng trừ muỗi sốt rét tên *Lubilosa*, phòng trừ châu chấu (*Schistocerca gregaria*). Ngoài ra *M. anisopliae* còn được sử dụng như là tác nhân phòng trừ các loài mối *Coptotermes formosanus*, *Nasutitermes exitiosus*, *C. acinaciormes*; *C. frenchi* [3].

Để mở rộng sản xuất chế phẩm vi nấm diệt mối vừa có hiệu lực lại vừa phù hợp với các nguồn nguyên liệu sẵn có ở Việt nam; Trong công trình này, chúng tôi tiến hành lựa chọn môi trường phù hợp nhân giống và sản xuất chế phẩm, từ đó tiến hành sản xuất đại trà.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu:

-Hai chủng *Metarhizium anisopliae* (kí hiệu Ma3C và Ma4C) nhận từ bộ sưu tập Vi nấm diệt côn trùng của Phòng Các chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật - Viện Công nghệ Sinh học.

- Côn trùng kiểm định: Mối *Coptotermes formosanus*

2.1. Phương pháp:

- Sử dụng một số phương pháp trong nghiên cứu vi sinh vật như: Lên men vi sinh vật, xác định hoạt tính các enzym bằng phương pháp khuếch tán trên thạch,...; Phương pháp thử hiệu lực diệt mối [3]

I. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhằm mục đích lựa chọn môi trường thích hợp để nhân nuôi vi nấm *M. anisopliae*, góp phần hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm diệt mối, chúng tôi quan tâm đến một số tiêu chuẩn sau: -Môi trường tốt để vi nấm có khả năng sinh trưởng, sinh enzym ngoại bào (chitinase, protease,...) tốt

-Môi trường để vi nấm có khả năng sinh bào tử trần (BTT) tốt

Những tiêu chuẩn trên đã được chứng minh là có ảnh hưởng lớn đến chất lượng của chế phẩm và ảnh hưởng lớn đến khả năng diệt côn trùng của *M. anisopliae* [3].

Trong bài báo này, chúng tôi chỉ khảo sát sự ảnh hưởng của một số nguồn nitơ và cacbon từ các nguyên liệu thô như casein, vỏ châu chấu và kitin thô từ vỏ cua, vì các nguồn này được xác

định có ảnh hưởng tới sinh trưởng, khả năng sinh enzym ngoại bào, khả năng sinh BTT của *M. anisopliae* [2].

1. ảnh hưởng của các nguồn nitơ và cacbon lên sinh trưởng của *M. anisopliae*

Kết quả ảnh hưởng của các nguồn nitơ và cacbon đến sinh trưởng của *M. anisopliae* được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ lên sinh trưởng của các chủng *M. anisopliae*
Đường kính khuẩn lạc (mm)

Chủng	Ma3C				Ma4C				
	Ngày	3	5	7	9	3	5	7	9
Môi trường									
S		5,2	10,2	14,3	21,5	6,5	11,5	14,7	22,0
SC		7,8	13,2	19,0	24,6	8,1	15,4	20,5	25,3
SCT		7,2	12,7	18,1	23,4	7,5	13,5	18,6	23,5
SK		5,3	10,0	13,8	21,7	6,7	12,0	14,6	22,3

Chú thích: S: Môi trường Sabouraud; SC: môi trường Sabouraud+cazein

SCT: Môi trường Sabouraud+vỏ châu chấu; SK: môi trường Sabouraud+kitin thô từ vỏ cua

Từ bảng 1 cho thấy, chủng *M. anisopliae* vẫn phát triển tốt ở môi trường S có nguồn cacbon và nitơ từ glucose và pepton thì hai. nhưng khi bổ xung thêm cazein và vỏ châu chấu thì hai chủng này sinh trưởng tốt hơn, còn sự sinh trưởng trên môi trường S và môi trường có bổ xung chitin từ vỏ cua là tương đương nhau. Giữa vỏ châu chấu và kitin từ vỏ cua thì *M. anisopliae* đồng hoá vỏ châu chấu tốt hơn, có thể vì đây là lớp cutin của côn trùng (châu chấu nằm trong phổ tác dụng của *M. anisopliae*). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Miao [3],

2. Khả năng sinh một số enzym ngoại bào của *M. anisopliae* trên các môi trường khác nhau

Việc sản sinh nhanh các enzym ngoại bào sẽ có lợi rất lớn trong quá trình gây bệnh bởi vì nấm có thể bắt đầu quá trình phân huỷ chitin côn trùng trước khi sức đề kháng của côn trùng trở nên có hiệu quả và mặt khác còn kịp thời cung cấp chất dinh dưỡng cho nấm phát triển từ các sản phẩm phân huỷ. Vì vậy chúng tôi tiến hành xác định khả năng sinh chitinase và protease trên các môi trường khác nhau để lựa chọn môi trường thích hợp cho việc sản sinh các enzym này. Kết quả được trình bày ở bảng 2 và 3.

Bảng 2. Khả năng sinh protease ngoại bào của các chủng *M. anisopliae* trên các môi trường khác nhau

Môi trường	Đường kính vòng phân giải (mm)							
	S		SC		SCT		SK	
	Ma3C	Ma4C	Ma3C	Ma4C	Ma3C	Ma4C	Ma3C	Ma4C
Chủng Ngày								
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	3,2	4,9	3,2	5,0	7,1	9,7	1,9	2,1
3	5,9	7,7	5,3	7,5	9,3	12,0	2,8	3,5
4	10,3	13,5	9,9	13,8	11,7	14,6	5,5	6,1
5	12,7	14,7	12,6	15,1	17,6	20,2	6,5	7,0
6	14,5	17,0	14,7	17,4	19,9	23,3	7,8	8,0

Bảng 3. Khả năng sinh chitinase của các chủng *M. anisoplia*

Đường kính vòng phân giải (mm)								
Môi trường	S		SC		SCT		SK	
Chủng Ngày	Ma3C	Ma4C	Ma3C	Ma4C	Ma3C	Ma4C	Ma3C	Ma4C
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	1,6	2,1	1,7	2,4	5,5	6,2	4,4	5,1
3	8,1	11,7	9,6	11,8	14,3	18,2	12,9	13,6
4	14,1	17,2	14,5	18,1	20,9	24,5	16,3	20,2
5	16,4	19,3	17,3	20,0	23,7	26,2	18,1	22,1
6	18,4	21,7	18,9	21,7	27,0	28,5	19,6	24,0

Từ bảng 2 và 3 cho thấy khi các chủng *M. anisopliae* sinh trưởng trong môi trường chứa vỏ châu chấu thì khả năng sinh chitinase và protease lớn hơn so với môi trường S, SC và SK. Trong hai chủng Ma3C và Ma4C thì chủng Ma4C có khả năng sinh enzym ngoại bào mạnh hơn.

3. Khả năng sinh BTT của *M. anisopliae* trên các môi trường khác nhau

Để lựa chọn chủng giống cũng như môi trường nhằm mục đích cho việc sản xuất chế phẩm, chúng tôi không chỉ quan tâm đến khả năng sinh enzym ngoại bào mà còn quan tâm đến khả năng sinh BTT vì đây cũng là một chỉ tiêu ảnh hưởng tới chất lượng của chế phẩm. Kết quả được nêu ở bảng 4.

Bảng 4. Khả năng sinh BTT của các chủng *M. anisopliae* trên các môi trường khác nhau.

Số lượng BTT (.106 CFU/g)		
Môi trường	Chủng	Ma4C
S	Ma3C	6,10
SC	Ma3C	5,25
SCT	Ma3C	7,24
SK	Ma3C	6,25
	Ma4C	6,84
	Ma4C	6,22
	Ma4C	10,30
	Ma4C	9,35

Kết quả ở bảng 4 cho thấy trên bốn môi trường thì ở môi trường SCT, hai chủng Ma4C & Ma3C cho lượng BTT lớn, trong đó chủng Ma4C cho lượng BTT lớn nhất.

Dựa vào tiêu chuẩn đã đề ra, chúng tôi thấy khi hai chủng *M. anisopliae* được nuôi trên môi trường SCT đều cho khả năng sinh protease, chitinase và BTT mạnh nhất mặc dù sự sinh trưởng của chúng trên môi trường này không phải là mạnh nhất (kém môi trường SC).

Từ các kết quả trên, chúng tôi đã chọn môi trường SCT làm môi trường nhân giống, sau đó cấy vào môi trường xốp và theo dõi khả năng sinh BTT của chúng

4. Lựa chọn môi trường nuôi cấy bề mặt để tạo chế phẩm diệt mối từ *M. anisopliae*

Nhằm giảm giá thành sản phẩm và dựa trên nguồn nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền, chúng tôi đã chọn một số môi trường xốp để nuôi cấy *M. anisopliae* tạo chế phẩm. Trên cơ sở đó hoàn thiện dần quy trình sản xuất chế phẩm diệt mối. ở thí nghiệm này chúng tôi xác định khả năng sinh BTT của hai chủng thí nghiệm khi nuôi cấy trên 4 loại môi trường khác nhau, các loại môi trường này đều bổ xung 30% trấu để môi trường có độ xốp. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Số lượng BTT của các chủng *M. anisopliae* trong 1gam chế phẩm sau 10 ngày nuôi cấy

Số lượng BTT trong 1gam chế phẩm (.10 ⁶ CFU/g)		
Môi trường	Chủng	
		Ma3C
		Ma4C
Cám gạo		5,7
Cám ngô		5,4
Đậu tương		6,1
Hỗn hợp		5,9
		6,4
		6,1

Số lượng BTT ở cả 4 môi trường là tương đương nhau, tuy nhiên ở môi trường bột đậu tương cho lượng BTT là lớn nhất, nhưng ở môi trường hỗn hợp khả năng sinh BTT cũng không thua kém nhiều so với môi trường đậu tương, mặt khác nguyên liệu ở môi trường hỗn hợp lại rẻ tiền hơn, vì vậy để sản xuất chế phẩm vừa đảm bảo chất lượng, số lượng BTT sinh ra cao mà lại vừa tận dụng được nguồn nguyên liệu rẻ tiền, sẵn có, chúng tôi đã lựa chọn môi trường hỗn hợp để sản xuất chế phẩm diệt mối từ *M. anisopliae*.

5. Khả năng diệt mối của các chủng *M. anisopliae*

Chúng tôi sử dụng BTT thu được sau khi nuôi trên môi trường hỗn hợp để thử hiệu lực diệt mối nhằm mục đích kiểm tra chất lượng chế phẩm. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Khả năng diệt mối *Coptotermes formosanus* của các chủng *M. anisopliae*

Tỉ lệ mối chết (%)sau thí nghiệm					
Ngày Chủng	1	2	3	4	5
Ma3C	8,1	27,6	32,5	49,3	66,3
Ma4C	11,8	29,6	37,3	51,5	70,3

Qua thí nghiệm thử khả năng diệt mối của chế phẩm chúng tôi có nhận xét: với phương thức nhân giống bằng môi trường có bổ xung vỏ châu chấu, sau đó nuôi trên môi trường xốp hỗn hợp của cám gạo, cám ngô và bột đậu tương thì hiệu lực diệt mối của các chủng *M. anisopliae* khá cao, sau 5 ngày tỉ lệ chết 66,6-70%. Đây là một khâu quan trọng góp phần hoàn thiện quy trình sản xuất và ứng dụng chế phẩm diệt mối từ *M. anisopliae*.

I. KẾT LUẬN

Từ kết quả thí nghiệm, chúng tôi có một số kết luận sau:

-Đã chọn được môi trường nhân giống cho các chủng *M. anisopliae* là môi trường Sabouraud có bổ xung vỏ châu chấu

-Chọn được môi trường tạo chế phẩm diệt mối từ *M. anisopliae* là môi trường hỗn hợp cám gạo, cám ngô và bột đậu tương

-Đã khảo nghiệm chế phẩm để phòng và trừ mối *Coptotermes formosanus* cho một số loại cây trồng đạt kết quả khá tốt 66,3-70,3% sau 5 ngày thí nghiệm.

Tài liệu tham khảo

1. Ahmad Said Sajap T.J, 1990. Pathogenicity of two entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the termite, *Coptotermes curvignathus*. Forest pest control. Work shop in Thailand
2. Chamley A.K., Leger R.J, 1997. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In the fungal spore and disease initiation in plant and animals. Plenum Press:267-286
3. Tạ Kim Chính, 1996. Luận án Phó Tiến sĩ Sinh học
4. Hanel H, 1982. Selection of a fungus species suitable for the biological control of the termite. Sonder ruckaua Bd, 94: 237-245

Abstract

**SELECTING MEDIUM FOR REARING AND MULTIPLICATING
METARHIZUM ANISOPLIAE FUNGUS FOR CONTROLLING TERMITE
COPTOTERMES FORMOSANUS**

Tạ Kim Chính, Hà Thị Quyên, Hoa Thị Minh Tú
institute of Biotechnology

To multiplying *Metarhizium anisopliae* fungus, we carried selection suitable medium for rearing and producing the biomass.

In this report, we obtained the results:

Medium Sabouraud mixing skin of the locusts was selected for rearing *M. anisopliae*. Medium containing rice-bran, corn-powder and Soy bean powder was selected to produce *M. anisopliae* biomass.

M. anisopliae fungus have been experimented on termite (*Coptotermes formosanus*). Results showed that: About 66,3%-70,3% termite was died by *M. a* fungus after 5 day of treatment.

NGHIÊN CỨU NHÂN NUÔI SÂU ĐỤC THÂN NGÔ *OSTRINIA NUBINALIS* HUBN (LEP.PYRALIDAE) BẰNG THỨC ĂN NHÂN TẠO

VŨ THỊ CHỈ, MAI PHÚ QUÝ, PHẠM THỊ LẠI

Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Trung tâm KHTN&CNQG

Ở Việt Nam việc nghiên cứu sâu hại ngô được bắt đầu từ những năm 1970, trong đó đã xác định sâu đục thân ngô là loài hại nguy hiểm nhất (Nguyễn Quý Hùng và nnk., 1978; Bùi Tuấn Việt và nnk., 1995). Ở vùng ngô Đức Trọng, Lâm Đồng sâu đục thân ngô gây hại từ 20% - 40% thân ngô, 10% - 30% cho bắp ngô và làm giảm năng suất ngô từ 5% - 30% (Lưu Tham Mưu và nnk., 1995).

Trong công trình này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu ban đầu về các đặc trưng sinh học của sâu đục thân ngô được nuôi bằng thức ăn nhân tạo, một vấn đề được nghiên cứu khá đầy đủ ở Ấn Độ (Navarajan Paul, 1991)

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Sâu đục thân ngô được thu thập từ ngoài ruộng ngô về nuôi trong phòng thí nghiệm bằng bắp ngô non (thức ăn tự nhiên) để lấy bươm và trứng. Bướm sâu đục thân ngô được nuôi trong các lọ nhựa bịt vải với số lượng 3- 4 cặp bướm mỗi lọ. Thức ăn của bướm là dung dịch mật ong 10%. Khi sâu nở sẽ được tách nuôi trong các lọ penixilin có dây nút bông.

2. Môi trường thức ăn nhân tạo: Thức ăn nhân tạo nuôi sâu đục thân ngô có thành phần sau đây :

A - acid ascorbic, acid sorbic, hydroxyl methyl benzoat, formol, yeast powder, hydrosol, streptomycine, peniciline.

B. Bột ngô, bột đậu

C. Agar agar

D. Nước cất

* *Trình tự làm môi trường được tiến hành như sau :*

- Các chất thuộc nhóm A + nước cất đun tan. Riêng formol, Hydrosol, streptomycine và peniciline để lại cho vào sau cùng.

- Agar agar + nước cất đun tan rồi cho các chất nhóm B vào đun chín

- Để cả 2 nhóm chất A,B,C vào đun lẫn cho vào máy khuấy, vừa khuấy vừa bổ sung các chất còn lại của nhóm A.

- Đổ môi trường ra đĩa petri đã vô trùng. Để môi trường đã nguội vào túi polyethylene và bảo quản ở 4°C.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Sâu đục thân ngô nuôi bằng thức ăn nhân tạo trải qua 6 lần lột xác với kích thước các tuổi sâu được trình bày trong bảng 1. Ấu trùng sâu đục thân ngô có tập tính ăn luôn xác lột, chỉ để lại mảnh đầu. Riêng lần lột xác thứ 6 khi sâu vào làm nhộng là để lại cả mảnh đầu và xác lột. Kích

thước các mảnh đầu của sâu cùng tuổi rất đồng đều trong khi đó chiều dài cơ thể sâu biến thiên rất lớn. Ấu trùng tuổi 5 đạt kích thước tối đa $22,4 \pm 2,3$ mm bắt đầu co ngắn lại $16,8 \pm 1,8$ mm. Trên thực tế có thể coi tuổi 6 là giai đoạn tiền nhộng vì vào thời kỳ này ấu trùng hầu như không ăn nữa. Trong điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm tháng 7 - 9 ở Hà Nội thời gian phát triển của các pha như sau :

- Pha trứng 3 ngày
- Pha ấu trùng 24 ± 5 ngày
- Pha nhộng $7 \pm 1,5$ ngày
- Pha trưởng thành 2 - 3 ngày

Như vậy vòng đời của sâu đục thân ngô kéo dài 37 - 41 ngày. Sâu đục thân ngô nuôi ở điều kiện nhiệt độ $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ có các pha phát triển dài ngày hơn (Đặng Đức Khương và nkk., 1993)

Bảng 1. Kích thước ấu trùng sâu đục thân ngô

Tuổi sâu	Số cá thể (n)	Dài thân (mm)	Rộng đầu (mm)
T ₁	20	$3,0 \pm 0,3$	$0,45 \pm 0,02$
T ₂	20	$4,6 \pm 0,7$	$0,60 \pm 0,03$
T ₃	20	$15,0 \pm 2,1$	$0,88 \pm 0,03$
T ₄	20	$18,8 \pm 1,6$	$1,30 \pm 0,$
T ₅	20	$22,4 \pm 2,3$	$1,7 \pm 0,1$
T ₆	20	$16,8 \pm 1,8$	$2,10 \pm 0,1$

Qua thí nghiệm, chúng tôi đã xác định được một số chỉ tiêu sinh học của sâu đục thân ngô như trọng lượng nhộng, tỉ lệ vũ hóa và tỉ lệ giới tính, tuổi thọ cũng như khả năng đẻ trứng của bướm (bảng 2). Trọng lượng trung bình của nhộng $56,3$ mg/nhộng, tỉ lệ vũ hóa của sâu đục thân ngô đạt 52%, tuổi thọ của con trưởng thành không khác biệt nhiều lắm theo giới tính. Bướm đực sống $4,6 \pm 1$ ngày, bướm cái sống $5,3 \pm 1,6$ ngày. Bướm cái được giao phối có thể đẻ tới 120 trứng. Những con không giao phối vẫn có thể đẻ từ 30 đến 80 trứng, tuy nhiên không có quả nào trong số trứng này nở cả. Sau khi đẻ trứng và chết, số lượng trứng còn lại trong buồng trứng của bướm cái vẫn còn tương đối lớn, khoảng trên 200 quả/1cái. Tỷ lệ nở của trứng sâu đục thân ngô đạt 42,8%, trong khi đó ngoài tự nhiên, nếu không bị ký sinh tỉ lệ nở của trứng sâu đạt 100%.

Bảng 2. Một số chỉ tiêu sinh học của sâu đục thân ngô nuôi bằng thức ăn nhân tạo

Chỉ tiêu sinh học	Số cá thể	Trung bình
Trọng lượng nhộng (mg/nhộng)	36	$56,3 \pm 10$
Tỉ lệ vũ hóa (%)	36	52,3
Tuổi thọ bướm (ngày)	20	$4,6 \pm 1,0$
		$5,3 \pm 1,6$
Khả năng đẻ trứng (quả/1cái)	6 cặp	120
Tỉ lệ nở của trứng (%)	725	42

Để so sánh sức sống của sâu đục thân ngô chúng tôi đã kiểm tra trọng lượng nhộng, tỉ lệ vũ hóa của nhộng thu ngoài tự nhiên và nhộng được nuôi bằng thức ăn nhân tạo (bảng 3).

Bảng 3. Trọng lượng và tỷ lệ vũ hoá của sâu đục thân ngô ngoài tự nhiên và trong phòng thí nghiệm

Nguồn gốc của nhộng	Số cá thể	Trọng lượng nhộng (mg/nhộng)	Tỷ lệ vũ hoá (%)
Nhộng thu ngoài tự nhiên	40	100 ± 34,7	83,3
Ấu trùng thu ngoài tự nhiên	40	84,8 ± 25,5	75,7
Ấu trùng thế hệ 1	40	64,7 ± 15,1	60,2
Ấu trùng thế hệ 2	40	56,3 ± 10,1	52,3

Nhộng thu ngoài tự nhiên có trọng lượng trung bình cao nhất đạt 100mg/nhộng và tỉ lệ vũ hóa tới 83,3%. Nhộng phát triển từ các ấu trùng thu ngoài tự nhiên về nuôi tiếp trong phòng bằng thức ăn nhân tạo có trọng lượng trung bình thấp hơn một chút 84,8 ± 25,5 mg/nhộng, tỷ lệ vũ hoá 75,7%. Ấu trùng nở từ trứng thu ngoài tự nhiên (thế hệ 1) nuôi hoàn toàn bằng thức ăn nhân tạo có trọng lượng trung bình 64,7 ± 15 mg/1nhộng và tỷ lệ vũ hoá 60,2%. Trọng lượng nhộng và tỷ lệ vũ hóa thấp nhất thuộc về nhộng của thế hệ thứ 2 nuôi bằng thức ăn nhân tạo: 53,6 ± 1,0 mg/nhộng và 52,3%. Ngoài ra, bướm thuộc thế hệ 2 hoàn toàn không có khả năng đẻ trứng. Như vậy sức sống của sâu đục thân ngô giảm nhanh khi đưa từ ngoài môi trường tự nhiên vào điều kiện trong phòng thí nghiệm.

Khi so sánh một số chỉ tiêu sinh học giữa 2 nhóm sâu đục thân ngô nuôi bằng 2 loại thức ăn khác nhau: thức ăn tự nhiên (ngô non) và thức ăn nhân tạo, chúng tôi nhận thấy, sâu đục thân ngô nuôi bằng thức ăn nhân tạo cho tỷ lệ hoá nhộng 85,1% cao hơn so với sâu nuôi bằng thức ăn tự nhiên -22,2%. Tuy vậy tỷ lệ vũ hoá của nhộng nuôi bằng thức ăn tự nhiên thường cao hơn so với nhộng nuôi bằng thức ăn nhân tạo (bảng 4).

Bảng 4. So sánh một số chỉ tiêu sinh học của sâu đục thân ngô nuôi bằng thức ăn tự nhiên và thức ăn nhân tạo

Loại thức ăn	Số cá thể	Trọng lượng nhộng (mg/nhộng)	Tỷ lệ vũ hoá (%)
Thức ăn tự nhiên	9	22,2	100
Thức ăn nhân tạo	47	85,1	92,5

III. KẾT LUẬN

Sâu đục thân ngô nuôi bằng thức ăn nhân tạo có trọng lượng nhộng 56 ± 10mg/1nhộng, tỷ lệ vũ hoá 52%, tỷ lệ bướm cái 50%, độ hữu thụ 120 quả trứng/ 1 con cái, tỉ lệ nở của trứng 42%. Vòng đời của sâu đục thân ngô trong điều kiện tháng 7 - tháng 9 ở trong phòng thí nghiệm kéo dài 37-41 ngày. Trong đó trứng 3 ngày, ấu trùng 24 ± 5 ngày, nhộng 7 ± 1,5 ngày, bướm 2 - 3 ngày. Khả năng sống của sâu đục thân ngô giảm dần khi chuyển từ ngoài tự nhiên vào nuôi trong phòng thí nghiệm. Trọng lượng nhộng giảm dần từ 100mg/con (nhộng thu ngoài tự nhiên) xuống 56,3mg (nhộng thế hệ 2). Tỷ lệ vũ hoá cũng giảm dần từ 83,3% (nhộng thu ngoài tự nhiên) xuống 52,3% (nhộng thế hệ 2). Sâu đục ngô nuôi bằng thức ăn nhân tạo có khả năng sống sót (tỷ lệ vào nhộng) cao hơn sâu nuôi bằng thức ăn tự nhiên. Tuy nhiên, nhộng của nhóm nuôi bằng thức ăn tự nhiên lại cho tỷ lệ vũ hoá cao hơn nhộng nuôi bằng thức ăn nhân tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Quý Hùng và mk., 1978. Kết quả nghiên cứu sâu hại ngô từ năm 1972 - 1975. Trong sách "Kết quả nghiên cứu khoa học bảo vệ thực vật 1971 - 1976". Nxb Nông thôn. tr. 126 - 142.
2. Đặng Đức Khương, Lưu Tham Mưu, Hoàng Vũ Trụ, 1995. Dẫn liệu về sinh học sinh thái và thí nghiệm phòng trừ sâu đục thân ngô *Pyrausta nubilalis* Hubn. và sâu xanh *Heliothis armigera* Hubn. Ở Đức Trọng, Lâm Đồng trong các năm 1984 - 1988. Tuyển tập các công trình nghiên cứu sinh thái và tài nguyên sinh vật. tr. 367 - 375. Nxb KHKT.
3. Lưu Tham Mưu, Đặng Đức Khương, Hoàng Vũ Trụ, 1995. Các loài sâu hại ngô và thiên địch của chúng ở Đức Trọng, Lâm Đồng. Tuyển tập các công trình nghiên cứu sinh thái và tài nguyên sinh vật. Tr. 441 - 445, Nxb KHKT.
4. Bùi Tuấn Việt, Mai Phú Quý, Phạm Thị Lai, Vũ Thị Chử, Nguyễn Thị Thuý, 1995. Kết quả sử dụng ong mắt đỏ (*Trichogramma chilonis* Ishii) phòng trừ sâu đục thân ngô (*Pyrausta nubilalis* Hubn.). Tuyển tập các công trình nghiên cứu sinh thái và tài nguyên sinh vật. Tr. 586 - 589. Nxb KHKT.
5. Navarajan A.V. Paul, 1991. Mass - rearing of Lepidopterous hosts used in biological control. Training course on biological methods of plant protection. Entomology Division . IARI, New Dehli, India.

SUMMARY

THE STUDY ON REARING MAIZE STEMBORER *OSTRINIA NUBINALIS* HUBN (LEP., PYRALIDAE) WITH ARTIFICIAL DIET

VU THI CHI, MAI PHU QUY, PHAM THI LAI

Institute of Ecology and Biological Resources

Maize stem borer *Ostrinia nubilalis* feeded on artificial diet could finish their life - cycle and give generations. They had the average pupal weight of 56 ± 10 mg per each pupae , emergence rate of 52%, sex - ratio of 50%, fecundity of 120 eggs per each female, egg hatched rate of 42%. The life cycle of maize stem borer in the laboratory condition from July to September in Hanoi lasted 37 - 41 days, phage of egg - 3 days, phage of larvae 24 ± 5 days, pupal stage $7 \pm 1,5$ days, adult duration 2 - 3 days. Living possibility of maize stem borer decreased when they were brought from the field into the laboratory. The pupal weight decreased gradually from 100mg/ an individual (natural pupal) onto 56.3 mg (pupae of the second generation). The rate of emergence also decreased from 83,3% (from the field) onto 52.3% (pupae of the 2nd generation). The maize stem bore feeded on artificial diet had living possibility (the rate of pupating) that was higher than ones feeded on natural diet. Though, the pupae of the group feeded on natural diet gave higher rate of emergence in comparison with the ones feeded on artificial diet.

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM NÔNG SINH HỌC CỦA MỘT SỐ GIỐNG CÀ CHUA TRỒNG TRONG VỤ ĐÔNG XUÂN VÀ XUÂN HÈ TẠI BÌNH ĐỊNH

ĐẶNG THỊ CHIẾN

Trường Đại học Sư phạm Quy Nhơn

I. MỞ ĐẦU

Rau là cây thực phẩm rất quan trọng không những cung cấp dinh dưỡng cho con người mà còn là thành phần không thể thiếu được trong bữa ăn hàng ngày.

Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy, ở nhiều nước lượng rau chiếm tỷ lệ 30-40% trong bữa ăn. Xã hội càng phát triển việc dùng rau trong bữa ăn ngày càng tăng.

Ở Việt Nam nhu cầu rau hàng ngày cho mỗi người dân vào khoảng 200-300g/ngày, trong khi đó theo thống kê thì bình quân đầu người hiện nay mỗi người chỉ sử dụng được 60g/ngày [2].

Rau không chỉ cần thiết cho bữa ăn hàng ngày mà còn là mặt hàng xuất khẩu có giá trị và là nguồn nguyên liệu của ngành công nghiệp thực phẩm [3,4].

Ngoài ra, rau còn là nguồn thức ăn cho gia súc. Trong các loại rau, cà chua là loại cây thực phẩm có giá trị dinh dưỡng, kinh tế, y học cao, được nhiều người ưa thích và được mệnh danh là “Hoàng hậu của Vitamin”. Vì vậy, từ lâu cây cà chua đã thu hút sự chú ý của các nhà di truyền chọn giống [1,2,3,4,5].

Xuất phát từ tình hình thực tế của Việt Nam nói chung và miền Trung nói riêng, chúng tôi tiến hành khảo sát một số giống cà chua gieo trồng trong vụ Đông - Xuân và Xuân — Hè tại Bình Định.

II. ĐỐI TƯỢNG, NHIỆM VỤ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu: Là 4 giống, dòng cà chua sau đây:

- Giống cà chua chịu nhiệt của Pháp (ký hiệu F).
- Giống cà chua bom của địa phương (ký hiệu 3₂).
- Giống cà chua Bungari BC2 (ký hiệu số 6).
- Dòng cà chua lai (số 6x3₂) (ký hiệu CH₁).

2. Xuất phát từ yêu cầu sản xuất của địa phương và các điều kiện cho phép chúng tôi ra nhiệm vụ cụ thể:

- Khảo sát một số tính trạng chủ yếu của các giống, dòng cà chua nói trên.
- Thông qua nghiên cứu để khẳng định khả năng thích hợp của giống, dòng đối với địa phương về năng suất và phẩm chất trong hai vụ Đông — Xuân và Xuân — Hè.

3. Phương pháp nghiên cứu: Bố trí thí nghiệm theo phương pháp của Fihser (phương pháp hàng khối, tuần tự, lặp lại 3 lần: mỗi lô 30 cây giống):

- Các chỉ tiêu nông sinh học chủ yếu được áp dụng theo phương pháp thông dụng, phổ biến và chính xác.
- Xử lý số liệu theo phương pháp Thống kê sinh học [6].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Khảo sát trong vụ Đông - Xuân

1.1. Một số đặc điểm về sinh trưởng và phát triển

Bảng 1. Một số đặc điểm sinh trưởng và phát triển của 3 giống cà chua khảo sát tại Qui Nhơn vụ Đông - Xuân

Các chỉ tiêu nghiên cứu	Giống số 6	Giống số 3 ₂	Dòng CH ₁
	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$
Thời gian sinh trưởng (ngày)	97	102	100
Chiều cao cây (cm)	43,5 ± 1,0	80,5 ± 2,1	74,9 ± 0,7
Số lá từ gốc đến chùm hoa đầu tiên	7,0 ± 0,1	7,5 ± 0,3	6,9 ± 0,4
Khoảng cách lá giữa chùm hoa (cm)			
1 và 2	1,25 ± 0,14	2,06 ± 0,07	1,68 ± 0,13
2 và 3	1,20 ± 0,09	1,30 ± 0,19	1,43 ± 0,45
3 và 4	1,17 ± 0,06	1,35 ± 0,11	1,53 ± 0,47
Khoảng cách lá trung bình giữa các chùm	1,20	1,57	1,54

Từ bảng 1 số liệu ta thấy:

- Thời gian sinh trưởng ở giống, dòng có dao động: Giống 3₂ có thời gian sinh trưởng dài hơn giống số 6 và dòng CH₁.

- Giống 3₂ và dòng CH₁ thuộc loại cây cao trung bình, giống số 6 thấp cây.

1.2. Các yếu tố cấu thành năng suất và mức độ nhiễm bệnh của quả

Bảng 2. Các yếu tố cấu thành năng suất và mức độ nhiễm bệnh của quả cà chua ghi nhận được ở vườn thí nghiệm Trường ĐHSP Qui Nhơn trong vụ Đông □ Xuân

Các chỉ tiêu nghiên cứu	Giống số 6	Giống số 3 ₂	Dòng CH ₁
	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$
Tổng số chùm hoa/cây	11,8 ± 0,9	12,0 ± 0,3	12,9 ± 0,4
Số quả/cây	13,5 ± 0,5	19,8 ± 0,8	21,9 ± 0,8
Trọng lượng trung bình một quả (g)	61,5 ± 1,2	63,2 ± 0,1	68,5 ± 0,7
Trọng lượng quả/ cây	830,3 ± 7,4	1248,0 ± 8,3	1479,6 ± 9,0
Năng suất lý thuyết (tấn/ha)	29,88	44,92	53,91
Tỷ lệ đậu quả chùm 1(%)	42,28	60,97	66,57
Tỷ lệ đậu quả chùm 2(%)	44,54	50,09	57,43
Tỷ lệ đậu quả chùm 3(%)	40,94	45,68	48,86
Tỷ lệ đậu quả TB 3 chùm (%)	42,58	52,24	57,62
Mức độ nhiễm bệnh (%)	6,10	5,32	4,55

Kết quả các số liệu từ bảng 2 cho thấy: Dòng cà chua CH₁ đã thể hiện về năng suất cao hơn 2 bố mẹ (số 6 và số 3), bị nhiễm bệnh ít hơn.

1.3. Hàm lượng các chất trong quả

Bảng 3. Hàm lượng các chất trong quả cà chua trồng tại Qui Nhơn trong vụ Đông -Xuân

Các chỉ tiêu nghiên cứu	Giống số 6	Giống số 3 ₂	Dòng CH ₁
	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$
Hàm lượng chất khô (%)	7,48 ± 0,03	5,50 ± 0,07	7,28 ± 0,04
Hàm lượng Vitamin C (%)	44,11 ± 0,73	35,01 ± 0,62	44,15 ± 0,71
Đường tổng số (%)	4,10 ± 0,02	3,04 ± 0,51	4,25 ± 0,02

Từ bảng 3 cho phép rút ra nhận xét:

- Dòng CH₁ có hàm lượng chất khô cao hơn giống địa phương 3₂ và tương đương với giống bố (số 6).

- Cả giống số 6 và dòng CH₁ đều có hàm lượng Vitamin và hàm lượng đường tổng số cao hơn giống địa phương (3₂).

2. Khảo sát trong vụ Xuân - Hè

2.1. Một số đặc điểm về sinh trưởng và phát triển

Trong vụ này chúng tôi sử dụng giống chịu nhiệt của Pháp (F) là giống được trồng phổ biến trên Thế giới đặc biệt ở các nước châu Phi.

Bảng 4. Một số đặc điểm sinh trưởng và phát triển của 3 giống cà chua khảo sát tại Qui Nhơn trong vụ Xuân □ Hè

Chỉ tiêu nghiên cứu	Giống số 6	Giống số F	Dòng CH ₁
	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$
Thời gian sinh trưởng (ngày)	85	109	92
Chiều cao cây (cm)	42,1 ± 0,1	47,1 ± 1,0	70,5 ± 2,8
Số lá từ gốc đến chùm hoa đầu tiên	4,5 ± 0,3	6,6 ± 0,3	6,5 ± 0,4
Khoảng cách lá giữa chùm hoa (cm)			
1 và 2	1,06 ± 0,19	1,21 ± 0,05	1,80 ± 0,48
2 và 3	1,15 ± 0,12	1,53 ± 0,16	1,33 ± 0,12
3 và 4	1,09 ± 0,07	1,33 ± 0,22	1,46 ± 0,13
Khoảng cách lá TB giữa các chùm	1,15	1,30	1,53

Kết quả từ bảng 4 cho phép rút ra nhận xét:

- Về thời gian sinh trưởng giống F dài nhất, tiếp đến là dòng CH₁, ngắn ngày nhất là giống số 6.

- Các chỉ tiêu còn lại cho thấy: dòng CH₁ thuộc loại cây cao trung bình, giống số 6 và F thấp cây. Điều đó chứng tỏ dòng CH₁ đã tiếp thu đặc tính của giống mẹ (3₂).

Qua khảo sát về chỉ tiêu khoảng cách lá trung bình giữa các chùm hoa trong hai vụ Đông - Xuân và Xuân - Hè ta nhận thấy sự sai khác không đáng kể. Điều đó chứng tỏ rằng chỉ tiêu này tương đối ổn định, ít chịu ảnh hưởng của ngoại cảnh.

2.2. Các yếu tố cấu thành năng suất và nhiễm bệnh của quả

Bảng 5. Các yếu tố cấu thành năng suất và mức độ nhiễm sâu bệnh của 3 giống cà chua khảo sát tại Qui Nhơn

Các chỉ tiêu nghiên cứu	Giống số 6	Giống số 3 ₂	Dòng CH ₁
	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$
Tổng số chùm hoa/cây	12,9 ± 0,9	12,1 ± 0,4	11,4 ± 0,7
Số quả/cây	12,1 ± 0,7	13,3 ± 0,8	12,3 ± 0,1
Trọng lượng trung bình một quả (g)	60,2 ± 0,4	65,8 ± 0,2	63,1 ± 0,5
Trọng lượng quả/ cây	725,0 ± 0,4	871 ± 0,2	819,7 ± 0,4
Năng suất lý thuyết (tấn/ha)	26,1	31,4	29,5
Tỷ lệ đậu quả chùm 1(%)	48,8	65,3	63,7
Tỷ lệ đậu quả chùm 2(%)	39,7	54,8	50,1
Tỷ lệ đậu quả chùm 3(%)	35,2	43,7	44,7
Tỷ lệ đậu quả TB 3 chùm (%)	41,2	54,6	52,8
Mức độ nhiễm bệnh (%)	5,7	4,0	4,5

Từ các số liệu ở bảng 5 ta thấy:

- Về năng suất dòng CH₁ cao hơn giống số 6 và F.
 - Về mức độ nhiễm bệnh: dòng CH₁ ít nhất, tiếp đến giống F và cuối cùng giống số 6.
- Do khả năng chịu bệnh tốt nên dòng CH₁ đã cho năng suất cao.

2.3. Hàm lượng các chất dinh dưỡng

Bảng 6. Hàm lượng các chất trong quả cà chua trồng ở Qui Nhơn

Các chỉ tiêu nghiên cứu	Giống số 6	Giống số 3 ₂	Dòng CH ₁
	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$
Hàm lượng chất khô (%)	7,18 ± 0,7	7,61 ± 0,01	7,50 ± 0,03
Hàm lượng Vitamin C (%)	44,13 ± 0,32	46,28 ± 0,09	44,12 ± 0,35
Đường tổng số (%)	4,15 ± 0,21	3,48 ± 0,04	4,35 ± 0,2

Từ kết quả nghiên cứu chúng tôi có nhận xét như sau:

- Về hàm lượng đường tổng số trong quả, dòng CH₁ được tiếp thu từ bố và tương đối ổn định. Giống F (3,48%) có hàm lượng đường thấp nhất, kém hơn giống số 6 và CH₁.

III. KẾT LUẬN

1. Giống số 6, F là giống thấp cây; Giống địa phương (3₂) và dòng CH₁ có chiều cao trung bình. Tất cả các giống, dòng nghiên cứu thuộc loại hình sinh trưởng hữu hạn.

2. Trong hai vụ Đông — Xuân và Xuân — Hè thì vụ Đông — Xuân cho năng suất cao hơn hẳn so với vụ Xuân — Hè trong điều kiện khí hậu Bình Định.

3. Qua hai vụ chúng tôi nhận thấy dòng CH₁ thích hợp nhất với điều kiện khí hậu Bình Định, cho năng suất cao, khả năng chống chịu tốt (cao hơn giống số 6, giống 3₂ và F vốn là giống chịu nhiệt cao).

4. Hàm lượng chất khô, vitamin C và đường tổng số các giống nghiên cứu đều tương đối cao, cao hơn cả là dòng CH₁.

5. Giống số 6, giống F, dòng CH₁ có phẩm chất tốt, thích nghi với điều kiện khí hậu Bình Định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Mai Thị Phương Anh và cộng sự.** Báo cáo tổng kết công tác chọn giống rau giai đoạn 1986 □ 1996 của Trung tâm giống cây trồng Việt - Xô, 1990.
2. **Mai Thị Phương Anh,** Rau và trồng rau. NXB Nông nghiệp, 1996.
3. **Tạ Thị Thu Cúc,** Giáo trình trồng rau. NXB Nông nghiệp, 1998.
4. **Tạ Thị Thu Cúc, Nguyễn Thành Quỳnh.** Kỹ thuật trồng cà chua Xuân □ Hè. NXB Nông nghiệp (tái bản), 1983.
5. **Trần Khắc Thi.** Tình hình sản xuất, tiêu thụ rau ở nước ta và triển vọng ứng dụng ưu thế lai trong ngành trồng rau. Tạp chí Di truyền học và ứng dụng, 3/1991.
6. **Nguyễn Giao Vân, Trần Thái Minh.** Lý thuyết xác suất và thống kê toán học, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 1975.

PUBLIC ACCEPTANCE OF CROP BIOTECHNOLOGY

CLIVE J PEGG

*Public and Government Affairs (Indian sub-continent
and South East Asia), Aventis CropScience*

I. INTRODUCTION

I would like to thank the organisers, of this conference, for the opportunity to present a short paper on what is probably the most important aspect surrounding crop biotechnology today in many countries of the world; the matter of public acceptance of this technology. The ultimate fate of crop biotechnology, as to whether it is adopted on a widespread basis or not, is really in the hands of the general public.

II. OUTLINE

I intend to address three principal areas; firstly, the public perception of crop biotechnology in three major regions, namely Europe, North America (USA) and some of the countries in South East Asia and look at how these perceptions differ.

Secondly, the reasons which are behind the concerns amongst a significant proportion of the European population.

Lastly, the way forward. What can we learn from our experiences so far and how can we win public acceptance for this new technology that promises so much for so many?

III. CONSUMER RESEARCH IN EUROPE

The series of data that I will present on Europe was collected in a poll, conducted by Eurobarometer¹ about 18 months ago, in 15 EU countries and involving over 16,000 people. I believe that there has been no significant change, in public opinion, since then.

As background, please remember that although a number of crops have received regulatory clearance in the EU, it is mainly field trials that have been conducted so far and little has been grown commercially. In the last two years or more, there has been a de facto moratorium on new regulatory approvals due to negative public sentiment.

Results show clearly that those expecting an improvement in their lives, from advances in biotechnology, declined substantially from 1997 to 2000.

Furthermore, interviewees were questioned on a typical input trait (insect resistance) and an output trait (improved food quality).

In terms of insect resistance, the trend in the perception amongst consumers was that this was less useful, less acceptable morally and fewer people believed it should be encouraged when compared to consumer perception data obtained previously. This is probably understandable because there is no clear benefit, from this trait, to consumers.

However, in the case of improved food, there was surprisingly a similar trend; again, less believed it was useful and morally acceptable and more believed that it increased risks.

Other results, from the same survey, indicated a significant increase in consumer resistance to genetically modified food in Europe.

One major factor, behind such resistance, is believed to be the very low level of understanding on what crop biotechnology really means! Over 80% in the Eurobarometer survey considered that they were not adequately informed with only 11% claiming that they were.

¹ European Commission's Director-General for Research. Poll conducted from November 1st to December 15th, 1999 and published March 15th 2000. Sample size, 16082 people in total of 15 countries. Previous studies in Autumn 1991, Spring 1993 and Autumn 1996.

One encouraging result, however, was the strong indication that over 70% of the population would take the time to read articles or watch television programmes on the advantages and disadvantages of crop biotechnology.

Personally, I would be surprised if this really happened to such a high degree but it does show a general willingness, on the part of the consumer, to learn about the topic.

Other research, into consumer perceptions, has shown that there is a clear link between the reluctance of the consumer to accept biotechnology and the serious lack of (balanced) information on the subject.

The next important consideration is which information sources would Europeans trust?

Data illustrates that it would **not** be religious organizations, public authorities, the media or members of the academe.

Overall, the most trusted sources are members of the medical profession and consumer protection associations.

Environmental groups, most of which are vehemently opposed to biotechnology, are also relatively well trusted although on a declining trend. This is also the case for farmer associations.

IV. CONSUMER RESEARCH IN THE USA

I would like to turn now to the USA and a telephone survey conducted in the middle of last year² and compare the results obtained in 3 previous years. The sample size was 1000 consumers.

Although there has been some decline, 60% of Americans believe that biotechnology will provide them with benefits in the next 5 years (compares to 40% of Europeans).

Looking at quality traits (food products which taste better or fresher) and input trait (insect resistance), over 50% of Americans would go for products which tasted better or were fresher and nearly 70% for products protected against insect damage.

These results show positive responses that are roughly twice the level, to similar questions, seen in the EU.

The high degree of support for insect protected crops is probably due to the fact that many Americans would associate this with a reduced level of use of insecticides and lower levels of residues.

We established earlier that the Europeans are poorly informed on biotechnology. Consumer data indicates that we see a trend that is strongly upwards in terms of how well Americans are informed on biotechnology increasing from 27% in early 1999 to 39% 15 months later. This is against a background of a major public information campaign currently underway in the US.

The study demonstrates that, in the US, professional bodies and government agencies are widely trusted. There is, however, less trust placed in manufacturers, food processors and the grocery retailers.

Although biotechnology companies are less well trusted than government agencies, they have much more credibility with the American public than in Europe.

V. CONSUMER RESEARCH IN ASIA

Turning now to Asia, I would like to show some results from a presentation prepared by AFIC. AFIC is the Asian Food Information Council and it is widely regarded as a reliable and informative association dealing with issues related to the food industry.

Media coverage of biotechnology has, in recent times, expanded significantly. Between the end of 1998 and the beginning of the year 2000, there was a three-fold increase in coverage.

Results of a survey completed for the Far Eastern Economic Review, conducted amongst a sample of Asian Executives, showed relatively high levels of concern on biotechnology. Only Australia, Hong Kong and Singapore showed levels that were significantly below those of other countries.

Data from numerous sources illustrates that, as expected, there are relatively high levels of concern about the general safety of the food supply in Japan and Europe. These concerns relate to

² Wirthlin Group Quorum Surveys published in June 2000. Survey conducted in the period May 5th to May 9th, 2000 using 1000 telephone interviews. Previous studies carried out March 1997, February 1999 and October 1999.

genetic modification, additives, irradiation of food, antibiotic and hormone use in livestock, pesticides and microbial contamination.

However, on these issues there are comparatively low levels of concern in a number of Asian countries excluding Japan.

Various surveys show a low level of awareness of food (crop) biotechnology in Thailand, the Philippines, Malaysia and Indonesia. The relatively low levels of concern in South East Asia, about genetically modified food, is probably strongly tied to the fact that awareness of biotechnology is also low. In other words, most consumers have simply never heard anything about GM food so far!

The same research also indicates the challenge that lies ahead, for all of us, if we are to win acceptance of this technology. For instance, when asked if the statement that "yeast for bread making contains living organisms" the large majority of consumers gave the correct response.

However, there was a significant reduction, in the number of correct responses, when asked to comment on the veracity of the statement that "ordinary soybeans don't contain genes but GM soybeans do".

Most alarmingly, the majority of people surveyed believed that "by eating a GM fruit, a person's genes could be changed". In other words, most of the population, polled in this Asian survey, considers that their genotypes will be changed by consumption of genetically modified food!

However, this is not just an Asian issue as these results are typical of answers obtained to similar questions put to consumers in Europe!

Imagine the possibilities for groups of activists opposed to GM food with this sort of level of misunderstanding.

In summary, the attitude to GM food and, therefore, crop biotechnology is generally positive in North America although there are indications that there has been a slight weakening of this position based upon the survey quoted above.

In most countries in Europe, there is widespread concern-even fear- of the technology amongst consumers although recent results, from a survey in the UK, indicate a small improvement.

In Asia, GM food is still not a major issue for most people but this is changing as levels of public awareness are rising due to media coverage.

We could spend all day discussing the reasons why Europeans have difficulty in accepting GM food. I have listed some of the main ones:

- The technology is not really understood and people tend to fear things they don't understand.
- Europeans have had a series of "food scares" including mad cow disease (BSE) and the contamination of food products.
- Europeans are rather concerned about the natural environment.
- There has been strong activist lobbying (Greenpeace etc) against biotechnology in agriculture.
- There is widespread mistrust of government departments in general and politicians in particular.
- Strong regulations have made people think that this technology is something to be feared and, in addition, there are real concerns about the ethics of genetic engineering.

VI. LABELLING

One of the hottest issues, at the moment, is that of labelling of food derived from GM crops. This is strongly proposed by many consumer organisations (on the grounds of consumer choice) and activist groups (believing that many consumers will reject GM food if so labelled).

There are three basic options: to mandate the labelling of everything that is derived from GM crops; to allow voluntary labelling in the case of GMO free products and products which are nutritionally improved; to require no labelling at all.

On the issue of labelling, the devil lies in the detail. For example, in the case of mandatory labelling, there is the possibility to define many different requirements. For instance, do you label all food products or only some; do you label all ingredients or only the most important? Do you set threshold (tolerance) levels for adventitious (unintentional) presence and, if so, at what level? Do you label livestock feeds or products from livestock fed on GM feedstuffs.

The regulations can be very complex and add substantially to the cost of food production. Compliance needs to be considered; no point having laws if they cannot be enforced!

Currently the Codex Commission is considering the possibilities and has formed a specific task force for this purpose.

A number of countries have already decided that they could not wait for international standards to be drawn up and have prepared labelling regulations.

The USA, the biggest producer of GM crops, has a "no label" policy providing there is no substantial difference between the GM food and the original, in terms of composition, nutritional value and intended use and also on condition that no known allergens have been introduced.

Many other countries have some form of mandatory labelling including the EU, Japan, Korea, Australia and New Zealand plus some S E Asian countries including Indonesia and Thailand. Malaysia is also likely to introduce some form of labelling requirement.

VII. BUILDING PUBLIC ACCEPTANCE

I have listed six points which I believe are key to building public acceptance, some of which may be of relevance in Vietnam:

- * Seek, from the outset, public input into policies and decisions that will directly affect farmers and consumers and listen to their concerns. Transparency, in this process, is vital.

- * An understanding of the principles of the technology will help considerably but the debate is not really about science; it is often about other concerns such as inaccurate perceptions of risk, mistrust, resistance to change.

- * We all have a role to play in advocating biotechnology and it's benefits but investment in people, who are particularly skilled in communication, will be well worthwhile.

- * Balanced, reliable information needs to be readily available; it should be kept simple and tailored to the needs of the audience to which it is addressed.

- * An effective biosafety system, appropriate to the technology, will raise public confidence.

- * Last and not least, we should develop products which show benefits for the consumer (public).

VIII. CONCLUSION

Ladies and gentlemen, the ultimate fate of crop biotechnology will depend on whether or not we can persuade the public to accept this technology.

We need to recognise that mistakes have been made in Europe and lessons should be learnt from this.

Public acceptance should not be taken for granted; a communication strategy needs to be prepared and implemented and all stakeholders, such as government, scientists, academe, technology providers -including industry- and consumer associations, should be part of this.

Last and not least, we should recognise that Asia is in a strong position to influence where the debate goes, in the future, on crop biotechnology.

SUMMARY

Widespread adoption of crop biotechnology is dependent upon public acceptance. Consumer research indicates that public perception is generally positive in the USA but negative in the European Union. In a number of S E Asian countries opinions have yet to form. Labelling, of food products derived from GM crops, remains a hotly debated issue. In order to ensure an open and informed public debate within Asia, on the benefits of this technology, lessons need to be learned from the European experience.

+

NGHIÊN CỨU HỆ IZOZYM ESTERAZA

LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG THUỐC TRỪ SÂU LÂN HỮU CƠ Ở SÂU TƠ (*PLUTELLA XYLOSTELLA*)

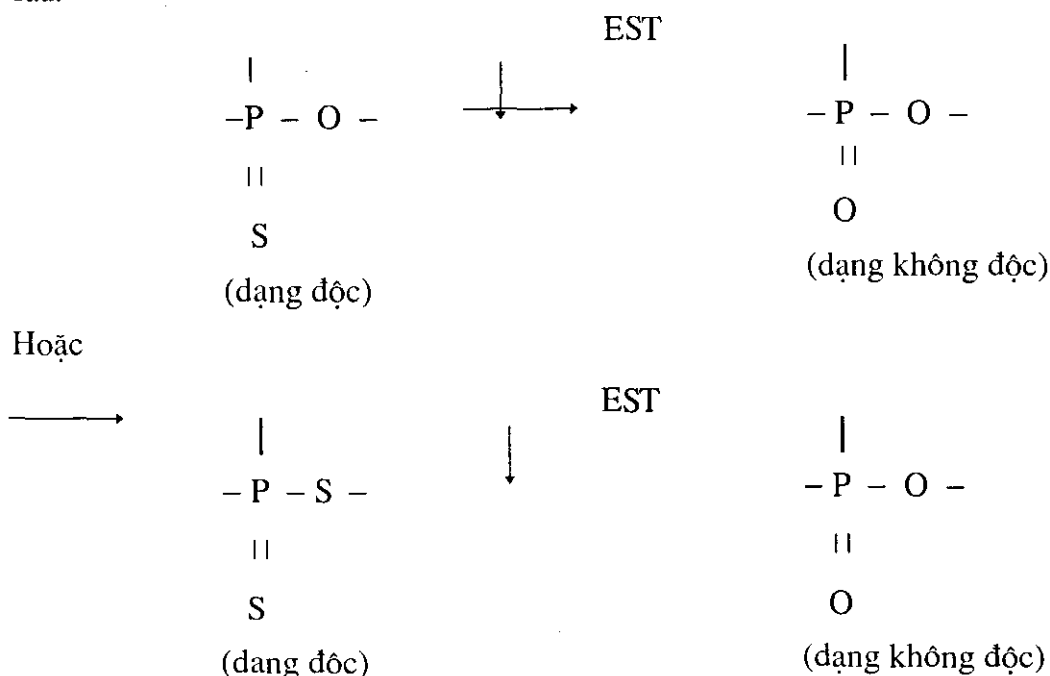
TRINH ĐÌNH ĐẠT, ĐỖ QUỲNH HOA, NGUYỄN THỊ MINH NGUYỆT

Trường Đại học KHTN

Sâu tơ (*Plutella xylostella*) là loài sâu phá hoại chủ yếu các giống rau như xu hào, rau cải, bắp cải, xúp lơ.v.v... Phương pháp phòng chống chủ yếu đối với loài sâu hại này là phun thuốc trừ sâu. Nhóm thuốc trừ sâu lân hữu cơ thường được dùng để phun cho nhiều loài rau đạt hiệu quả nhanh. Kết quả của việc phòng chống bằng hoá học này làm xuất hiện một số nhóm sâu có khả năng kháng thuốc và tái phát sinh với số lượng lớn hơn, sức chống chịu cao hơn nhiều so với trước đó.

Cơ chế kháng thuốc trừ sâu lân hữu cơ ở côn trùng nói chung và của sâu tơ nói riêng là do các allozyme có hoạt tính cao bất thường của izozym Esteraza quyết định. Theo Sawicki, R (1979) trong một quần thể tự nhiên tỷ lệ cá thể mang gen kháng thuốc là 1/10000, nếu phun thuốc trừ sâu liên tục 15 thế hệ thì tỷ lệ có thể tăng tới 1/30 và sau 7 thế hệ nữa thì tỷ lệ có thể tới 1/1.

Theo nhiều tác giả thì cơ chế chuyển hoá thuốc trừ sâu lân hữu cơ do izozym Esteraza như sau:



Như vậy dưới tác động của izozym Esteraza đã oxy hoá các loại thuốc trừ sâu lân hữu cơ biến từ dạng độc đối với sâu thành dạng không độc đối với chúng.

Nhằm mục đích tìm hiểu sự biểu hiện của enzym Esteraza chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số quần thể sâu tơ theo các chỉ tiêu sau:

- Thử nghiệm phương pháp xác định Esteraza trên giấy sắc ký.
- Xác định hàm lượng izozym Esteraza tổng số của nhóm sâu nghiên cứu.
- Xác định tần số alen, số locut của hệ izozym Esteraza

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

1. **Đối tượng:** sâu tơ *Plutella xylostella* tuổi 4 được thu thập tại các địa điểm khác nhau:

Xã Song Phương, Huyện Hoài Đức, Hà Tây; Xã Ngọc Sơn, Huyện Chương Mỹ, Hà Tây; Xã Đặng Xá, Gia Lâm, Hà Nội; Xã Long Biên, Gia Lâm, Hà Nội; Xã Văn Nội, Đông Anh, Hà Nội.

Mẫu được thu trực tiếp ngoài ruộng rau từ tháng 12 năm trước đến hết tháng 3 năm sau trong những năm từ 1998 đến năm 2001. Mỗi cá thể sâu tơ chỉ lấy phân đầu ngực để nghiên cứu.

2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định izozym Esteraza trên giấy sắc ký sử dụng theo phương pháp của Pasteur, N và Georghiou, G. P, 1981.

- Xác định hàm lượng Esteraza tổng số theo phương pháp của Peiris, H. T. R và Hemingway, J. (1990).

- Phân tích điện di izozym Esteraza trên gel polyacrylamide 7,5% với hệ đệm EBT theo Steiner, W. W.M.; Joslyn, D. J. (1979) và của Green, C. A. (1990) cùng với cải tiến của Bộ môn Di truyền, Trường Đại học KHTN, ĐHQG Hà Nội.

Phân tích số liệu theo phương pháp thống kê sinh học.

I.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả nghiên cứu hoạt độ Esteraza trên giấy sắc ký

Phương pháp xác định hoạt độ Esteraza trên giấy cho phép phát hiện Esteraza nhờ mức độ biểu hiện màu, độ đậm nhạt màu do phản ứng giữa izozym esteraza với cơ chất đặc hiệu.

Chúng tôi thấy rằng đa số các cá thể sâu tơ thu từ các địa phương khác nhau đều biểu hiện vết tròn đậm màu trên giấy sắc ký. Tuy nhiên ở các quần thể khác nhau mức độ biểu hiện số lượng cá thể có màu đậm có thể khác nhau. Quần thể sâu tơ ở Ngọc Sơn cho tỷ lệ cá thể đậm màu nhiều nhất còn quần thể Đặng Xá có tỷ lệ thấp nhất (H. 2)

Qua phân tích cho thấy có thể sử dụng phương pháp này để phát hiện sơ bộ và đánh giá nhanh tỷ lệ cá thể kháng thuốc trừ sâu của từng vùng.

2. Kết quả xác định hàm lượng esteraza tổng số

Sử dụng phương pháp xác định hàm lượng esteraza tổng số theo Peiris, H. T. R. và Hemingway. J (1990) bằng cách đo chênh lệch mật độ quang học (OD) giữa dung dịch mẫu có phản ứng với mẫu đối chứng không có dịch mẫu nghiền trên máy so màu quang điện ERMA bước sóng $\lambda = 470\text{nm}$. Kết quả thu được ở bảng 1.

Bảng 1. Mật độ quang học OD của esteraza sâu tơ ở các quần thể địa phương khác nhau

Quần thể Chỉ số	Ngọc Sơn	Song Phương	Văn Nội	Long Biên	Đặng Xá
N	50	50	50	50	50
OD	0,520	0,474	0,468	0,409	0,385
S	0,007	0,013	0,009	0,012	0,010

Qua bảng 1 cho thấy một độ quang học trung bình đo được ở các sâu tơ thu tại các địa phương khác nhau là khác nhau. Sự sai khác giữa các quần thể khác nhau ứng với mức độ tin cậy là 95%. Riêng cặp quần thể Song Phương và Vân Nội sự sai khác là không đáng kể.

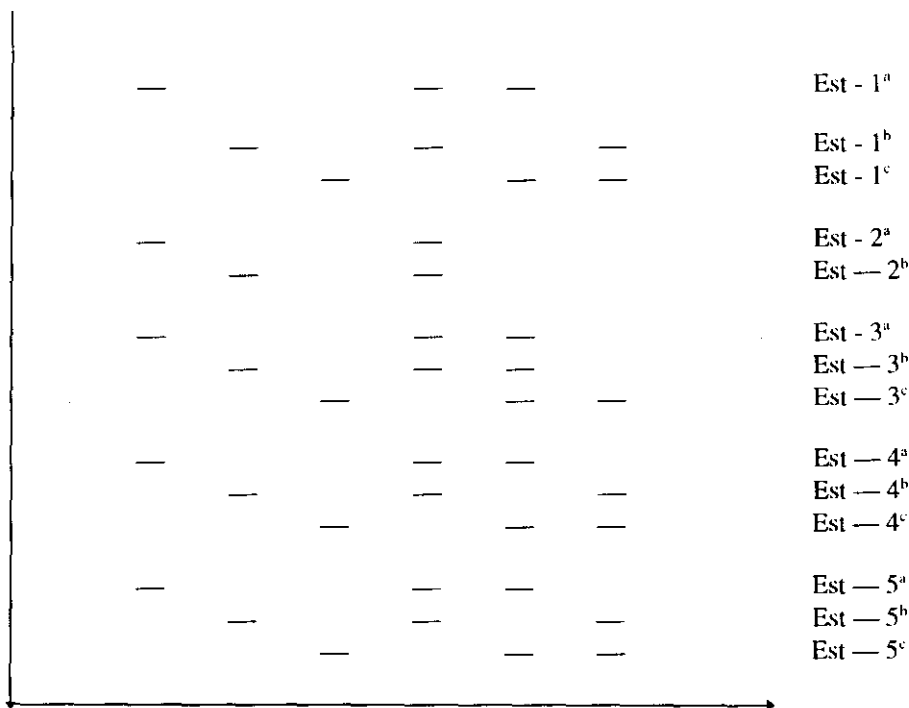
Quần thể Ngọc Sơn có mật độ quang học là cao nhất ($OD = 0,520$) và thấp nhất là quần thể Đặng Xá ($OD = 0,385$). Điều đó chứng tỏ rằng quần thể Ngọc Sơn có khả năng kháng với thuốc trừ sâu cao nhất, thấp nhất là quần thể Đặng Xá.

3. Kết quả điện di izozym esteraza trên gel polyacrylamide

Bản gel sau khi điện di ủ với cơ chất α, β -Naphthyl acetate và được nhuộm với Fast garnet GBC salt kết quả được phổ điện di phức tạp với nhiều cấu tử khác nhau (Hình 3). Theo quy ước quốc tế chúng tôi chia phổ điện di theo các vùng hoạt tính khác nhau và đặt tên cho mỗi vùng.

Từ enzyme đồ có thể chia phổ điện di esteraza làm 5 vùng tương ứng với 5 locut kiểm soát tương ứng tính từ vùng chạy nhanh đến chậm là Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, và Est-5.

Locut Est-1, Est-3, Est-4, Est-5 đều có 3 alen a, b, c tương ứng ở mỗi locut có 3 dạng đồng hợp tử và 3 dạng dị hợp tử. Locut Est-2 có 2 alen với 2 dạng đồng hợp tử. Sơ đồ các cấu tử điện di izozym esteraza ở sâu tơ được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ các cấu tử điện di izozym esteraza ở sâu tơ

Sau khi phân tích tất cả cấu tử điện di chúng tôi tiến hành tính tần số alen mỗi locut của các quần thể khác nhau. Kết quả tính tần số alen thu được ở bảng 2.

Bảng 2. Tần số alen của các *Locut esterase* ở sáu cơ

Tên loại	Quần thể	Ngọc Sơn	Song Phương	Vân Nội	Long Biên	Đặng xá
	Alen					
Est - 1	N	32	31	32	33	30
	a	0,50	0,42	0,42	0,50	0,50
	b	0,27	0,47	0,55	0,47	0,25
	c	0,23	0,11	0,13	0,13	0,25
Est - 2	N	42	52	41	32	30
	a	0,15	0,24	0,15	0,17	0,13
	b	0,85	0,76	0,85	0,83	0,77
Est - 3	N	32	33	41	53	30
	a	0,39	0,42	0,37	0,40	-
	b	0,47	0,48	0,57	0,60	-
	c	0,14	0,10	0,16	0,00	-
Est - 4	N	42	54	41	39	40
	a	0,18	0,09	0,21	0,20	0,20
	b	0,16	0,19	0,11	0,31	0,30
	c	0,56	0,72	0,68	0,49	0,50
Est - 5	N	41	49	31	36	30
	a	0,60	0,59	0,61	0,60	-
	b	0,21	0,28	0,29	0,24	-
	c	0,19	0,23	0,10	0,16	-

Kiểm tra phân bố tần số alen thấy tuân theo quy luật Hardy-weiberg với mức tin cậy $P < 0,01$.

Qua bảng tần số alen có thể thấy tần số alen Est-2^b đều cao ở tất cả các quần thể. Quần thể Đặng Xá chỉ phát hiện thấy có 3 locut Est-1, Est-2, Est-4 hoạt động. Điều này tương ứng sự giảm số cá thể nhuộm màu đậm trên giấy và hàm lượng esteraza tổng số của quần thể Đặng Xá so với các quần thể khác.

III. KẾT LUẬN

Trên cơ sở phân tích hệ izozym esteraza sâu tơ tuổi 4 thu ở các địa phương khác nhau chúng tôi có 1 số nhận xét sau:

- Có thể sử dụng phương pháp xác định izozym esteraza trên giấy sắc ký để đánh giá sơ bộ tỷ lệ cá thể kháng thuốc trừ sâu.

- Hàm lượng esteraza tổng số của sâu tơ ở các địa phương là khác nhau, trong đó quần thể Ngọc Sơn có hàm lượng cao nhất, quần thể Đặng Xá là kém nhất.

- Có 5 locut gen kiểm soát hệ izozym esteraza của sâu tơ. Các locut đều là đa hình. Quần thể Đặng Xá chỉ có 3 locut esteraza hoạt động tương ứng với quần thể có hàm lượng thấp nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Green C. A. 1990 - Population genetic evidence for two species *Anopheles minimus* in Thailand.

J. Tran. Vet. Ent. 4: 25-34.

2. Pasteus. N and Georghiou, G. P., 1981- Filter paper test for rapid determination of genotype with high esterase activity in Organophosphate resistance mosquitoes.

J. Mosq. News IV (1): 181-183.

3. Peiris. H. T. R. and Hemingway, J. 1990- Temefos resistance and associated cross - resistance spectrum in strain *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from periyagod Srilanka. J. Bull. Ent. Res. 80: 49-57.

4. Steiner, W. W. M. and Joslyn, D. J., 1979- Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes.

Mosq. News 39: 18-54.

SUMMARY

STUDY ON ESTERASE ISOZYME IN ORGANOPHOSPHATE RESISTANCE *PLUTELLA XYLOSTELLA* WORM

TRINH DINH DAT, DO QUYNH HOA, NGUYEN THI MINH NGUYET

Hanoi University of Science

Filter paper test for rapid determination of genotype with high esterase activity, content of esterase and electrophoretic techniques for the genetic study of 5 *Plutella xylostella* population were analysed. The result showed that:

- Filter paper test can be used for rapid determination of genotype with high esterase activity of *Plutella xylostella* worm.

- Content of from different the populations was different. Ngọc Sơn population was highest.

- By electrophoresis on polyacrylamide gel, 5 loci isozyme esterase have been found. These loci are marked as Est-1, Est-3, Est-4, Est-5 have 3 alleles. Locus Est-2 has 2 alleles. Đặng Xá population has 3 loci and is most susceptible to insecticide.

NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT VÀ CỐ ĐỊNH PENICILLIN ACYLASE

LÊ THỊ THUỶ DƯƠNG, LÝ THỊ BÍCH THUỶ, NGUYỄN THỊ NGỌC DAO

Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thị trường thuốc kháng sinh hiện nay thì kháng sinh bán tổng hợp nhóm β - lactam chiếm phần lớn, do loại thuốc kháng sinh này có một số ưu điểm nổi bật như có phổ kháng khuẩn rộng, mạnh, đồng thời bền vững với nhóm vi khuẩn phá huỷ vòng β -lactam. Mỗi năm, nhu cầu tiêu dùng nhóm kháng sinh này tăng tới 7%. Để sản xuất được thuốc kháng sinh bán tổng hợp thì nguyên liệu cần thiết đầu tiên là “nhân” penicillin, 6-amino penicillinanic axit (6-APA). Khi gắn phần nhân này với các mạch bên thích hợp, chúng ta sẽ thu được kháng sinh bán tổng hợp. Do vậy, vấn đề đặt ra là làm như thế nào để thu được 6-APA? Chính là nhờ enzym penicillin acylase thủy phân mối liên kết acyl trong phân tử PG (penicillin G). Qua nghiên cứu và tìm hiểu một số tài liệu chúng tôi thấy rằng penicillin acylase sinh tổng hợp từ *E.coli* có nhiều ưu điểm hơn cả.

Để sản xuất 6-APA, có thể sử dụng tế bào đã được cố định như một nguồn enzym ổn định hoặc sử dụng trực tiếp enzym đã được tách chiết. Trong phần nghiên cứu này chúng tôi tiến hành tách chiết enzym penicillin acylase đồng thời nghiên cứu quá trình cố định enzym này trên chất mang để có thể sử dụng nhiều lần

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

- Chủng *E. coli* PA₂ do phòng Di truyền vi sinh vật - Viện CNSH cung cấp.
- Polyethylen glycol 600; DEAE-cellulose D23 của hãng Beckman CHLB Đức; Penicillin G; Amonium sulphate.
- Các hoá chất tinh khiết khác.

2. Phương pháp

2.1. Phương pháp tách chiết và tinh sạch enzym

Thu nhận tế bào vi sinh vật từ môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm 14000 rpm, ở 4°C, thời gian 10 phút. Rửa sạch tế bào bằng nước cất hai lần. Tiến hành phá màng tế bào trong đệm phosphat 0.01M, pH=7 theo phương pháp siêu âm. Ly tâm, phần dịch trong đem rửa bằng (NH₄)₂SO₄ 60% bão hoà. Sau đó rửa phần đoạn bằng polyethylen glycol 10- 20%. Hoà tan rửa trong đệm phosphat 0.01M, pH=8 rồi thẩm tích. Bước tiếp theo, cho qua cột DEAE-cellulose và thu các phân đoạn.

- Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry.
- Hoạt tính penicillin acylase được xác định theo phương pháp Batchelor (1962).
- Xác định thành phần protein bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 12%.

2.2 Cố định enzym trên chất mang DEAE- Cellulose

Dịch penicillin acylase dùng để cố định, có nồng độ 10mg protein/ ml và hoạt độ riêng: 0:45 UI/mgPr.

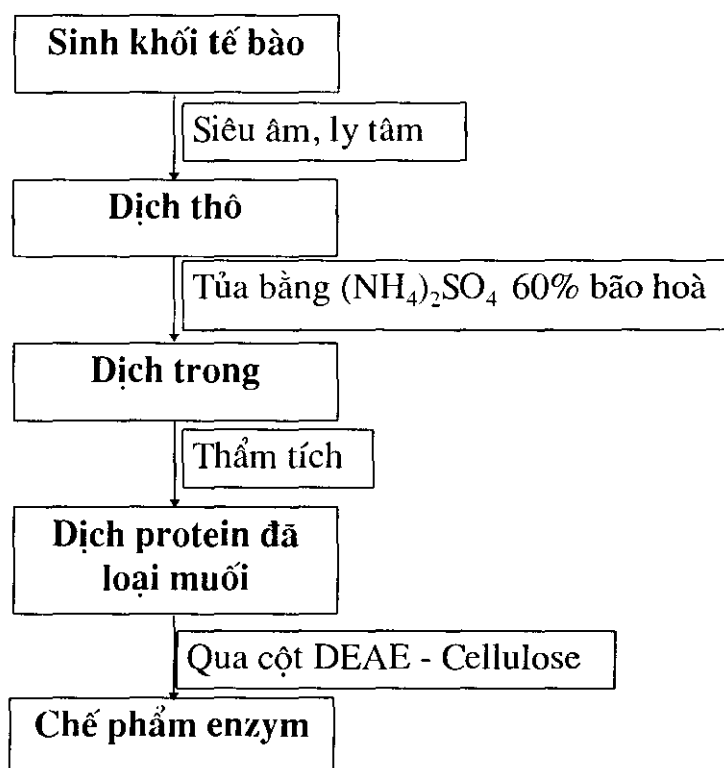
Gel DEAE-cellulose sau khi hoạt hoá, được nhồi lên cột và cho dịch penicillin acylase vào ở nhiệt độ 7-8°C. Sau đó thu lấy phân dịch không hấp phụ và rửa gel bằng nước khử ion. Bảo quản gel có gắn enzym trong cùng điều kiện nhiệt độ.

Khả năng gắn của penicillin acylase trên gel DEAE-cellulose được xác định dựa trên hàm lượng protein được gắn trong gel sau khi đã loại bỏ phân dịch trên và rửa nước khử ion, hoặc xác định hoạt độ còn lại trong dịch rửa và dịch không hấp phụ.

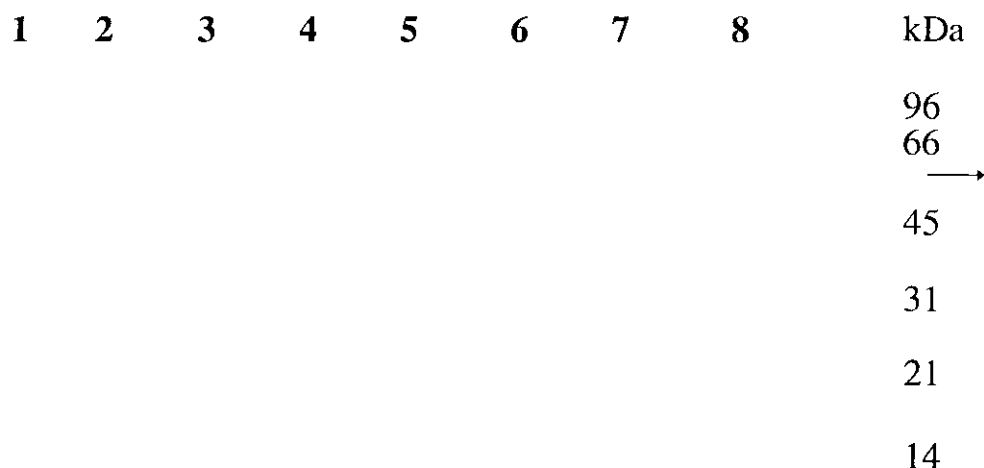
Xác định hoạt tính thủy phân penicillin của enzym cố định: Cho một lượng dung dịch chứa penicillin G vào gel có gắn enzym, ở 37°C. Sau 1h lấy dịch ra và xác định lượng 6-APA tạo thành sau phản ứng.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi tiến hành tinh sạch penicillin acylase theo sơ đồ sau:



Trong quá trình tách chiết, chúng tôi đã sử dụng cột sắc ký trao đổi ion DEAE - Cellulose (D₂₃). Cột sắc ký được cân bằng với đệm phosphat 0,01M pH = 8. Quá trình đẩy acylase bằng gradien nồng độ NaCl (0,0 - 0,5M). Mỗi phân đoạn thu 0,5ml, tốc độ dòng chảy 15ml/giờ. Sau đó chúng tôi tiến hành xác định hoạt tính ở các phân đoạn. Ở những phân đoạn từ 16 - 25 chúng tôi thấy có hoạt tính acylase khoảng 0,2 UI/mgPr. Đồng thời khi tiến hành quá trình đẩy acylase bằng gradien nồng độ NaCl (0,0 - 1,0M), mỗi phân đoạn cũng thu, 5ml và tốc độ dòng chảy 15ml/giờ. Sau đó xác định hoạt tính acylase ở các phân đoạn, thấy các phân đoạn từ 80 - 90 cũng có hoạt tính acylase. Khi tiến hành chạy điện di protein gel polyacrylamit 12%. Các phân đoạn 16 - 25 có hai băng protein và một băng hoạt tính acylase (hình 2). So sánh với phổ điện di protein chuẩn thì băng enzym acylase có phân tử lượng khoảng 30 kDa. ở các phân đoạn 80 - 90, có một băng rất đậm có phân tử lượng khoảng 60 kDa (hình 1). Khi thử hoạt tính acylase của các phân đoạn này thì hoạt tính acylase khoảng 0.4 UI/mgPr.



Hình 1. Phổ điện di protein các bước tinh sạch

1: rửa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2: Dịch chiết thô; 3: Sau khi rửa bằng PG; 4: Dịch không hấp phụ; 5,6, 7: tương ứng với các phân đoạn 80 85, 86; 8: Marker.



Hình 2. Phổ điện di protein của các bước tinh sạch

1: Marker; 2: Dịch enzym sau rửa PG; 3-7: Các phân đoạn tương ứng 16-25

Sau khi cho 2ml dịch penicillin acylase (có nồng độ 10mg protein/ml) vào 1g gel DEAE-cellulose đã được hoạt hoá và ủ khoảng 2giờ, rồi rửa gel bằng nước khử ion. Lấy phần dịch không hấp phụ và nước rửa để xác định hàm lượng protein. Chúng tôi thấy hàm lượng protein trong đó bằng 46% hàm lượng protein ban đầu, chứng tỏ lượng protein gắn trên gel là 54%.

- Hoạt tính thủy phân cơ chất của enzym acylase gắn trên gel có độ ổn định tương đối cao khi cho phản ứng nhiều lần với dung dịch penicillin.

Bảng 1. Tóm tắt quá trình thu nhận Penicillin acylase từ chủng *E.coli* PA₂

Các bước tinh sạch	Hàm lượng Protein tổng số mg/9,2gTB	Hoạt độ tổng số UI/9,2g TB	Hoạt độ riêng UI/mgPr	Độ tinh sạch
Dịch chiết thô	400.16	6.02	0.11	1
Sau khi rửa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	105.03	3.58	0.42	3.81
Sau khi rửa PG	85.32	2.73	0.58	5.27
Qua DEAE Cellulose	9,00	3.65	0.72	6.36

IV. KẾT LUẬN

- Quá trình nghiên cứu phương pháp tách chiết enzym Penicillin acylase từ chủng *E.coli* PA₂ đã thu được chế phẩm enzym có hoạt tính riêng tăng khoảng 6 lần so với hoạt tính enzym trong dịch chiết thô.

- Cố định enzym Penicillin acylase bằng phương pháp hấp phụ trên chất mang DEAE-Cellulose, hiệu suất đạt được 54%. Chế phẩm có độ bền về hoạt tính cao sau khi cho phản ứng nhiều lần với cơ chất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. K. Balasingham, *et al*, 1972. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E.coli*. *Biochim Biophys. Acta*, 276: 250- 256.
2. Fonseca, J. P. Cardoso and J. M. S. Cabral, 1993. Immobilization studies of an industrial penicillin acylase preparation on a silica carrier. *J.Chem.Technol.Biotechnol.* 27- 37.
3. Liang-Tzung Hsiau, Wen Chien Lee and Feng- Seng Wang. Immobilization of Whole-cell Penicillin G acylase by entrapping within polymethacrylamide beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997, 62: 303- 315.
4. Ana. M. Azevedo, Luis. P. Fonseca and Duarte. M. F. Prazeres. Stability and stabilisation of Penicillin acylase. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 1999, 74: 1157- 1116.
5. Dilek Kazan and Altan Erarslan. 1999. Effect of dextran polymers on the stability of soluble *Escherichia coli* penicillin G acylase. *J. Chem.Technol.Biotechnol*, 1999, 74: 1157- 1164.
6. Erarslan A., Terzi. I., Guray A, and Bernek.E. Purification and kinetics of Penicillin G acylase from a mutant strain of *E. coli* ATCC 11105. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 1991, 51:27- 40.
7. Alvaro G, Lafuente RF, Blanco RM and Guisan JM, Immobilization- stabilization of penicillin acylase from *E.coli* *Appl biochem biotechnol*, 1990, 26:181-195.
8. Erarslan A and Ertan H, Thermostabilization of penicillin G acylase obtained from a mutant of *E.coli* ATCC 11105 by bisimidoesters as homolifunctional crosslinking agen. *Enzym Microb Technol*, 1995,17: 629-635.
9. Andersson E and Hahn-Hagerdal B, Penicillin acylase activity and stability in PEG solutions. *Annals New York Acad Sci*, 1987, 501: 85-87.
10. Andersson E and Hahn-Hagerdal B, I. Stability of penicillin acylase in poly (ethylene glycol) and potassium phosphate solutions in relation to the water activity. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 912: 317-324.
11. Hanspal J *et al* , *Anal. Biochem.* 1983, 132: 288- 292.
12. Phạm Thị Thuý, Lê Gia Hy, Nguyễn Thị Hiền. nghiên cứu sản xuất 6- aminopenicillin acylase từ *E.coli* PA₂. Đồ án tốt nghiệp. Hà Nội, 2000.

SUMMARY

**PURIFICATION AND IMMOBILIZATION STUDIES OF PENICILLIN
ACYLASE FROM ESCHERICHIA COLI**

LE THI THUY DUONG, LY THI BICH THUY, NGUYEN THI NGOC DAO.
Institute of Biotechnology, (N.C.S.T.).

The isolation of penicillin acylase from E.coli PA₂, received enzym with very high special activity compare crude extraction.

These studies shown that the immobilization of penicillin acylase on DEAE — cellulose carrier can be valid alternative to support in the production of 6- aminopenicillinanic acid.

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA TỪ TRƯỜNG - DUNG DỊCH NUÔI CẤY, TƯỚI BÓN NHIỄM TỪ LÊN HIỆU QUẢ NUÔI CẤY BAO PHẦN MỘT SỐ GIỐNG NGÔ TRONG HỆ THỐNG NUÔI CẤY IN VITRO VÀ ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT NÔNG NGHIỆP

TRINH NGOC DIEU, NGUYEN NGUYEN HY*

LE HUY HAM, HOANG THUY DUONG, DO NANG VINH**

**The Institute of Applied Physics and Scientific Instruments*

***The Institute of Agricultural Genetics*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ:

Cũng như điện trường, trọng trường, ảnh hưởng của từ trường đến con người, các động vật, thực vật và các phản ứng hoá đã được quan tâm từ thời cổ xưa. Ngày nay đã xuất hiện và phát triển các hướng khoa học như: từ trị liệu, hoá từ, sinh học từ v.v....

Trong sinh học, tác động của từ trường lên nước bao hàm hai khía cạnh:

- Tác động lên các hệ sinh học chứa phần lớn là nước.

- Tiếp xúc của các đối tượng sinh học với nước (dung dịch) đã được làm nhiễm từ trước đó.

Các hệ sinh học được xử lý từ thường cho các hiệu ứng lạ lùng. ở quá trình nước (dung dịch) được nhiễm từ làm thay đổi các hoạt tính sinh học của mình lại có giá trị thực tế riêng biệt. Thực chất cả hai khía cạnh này là hai mặt của một vấn đề chúng có mối liên hệ hữu cơ với nhau.

Xuất phát từ mục đích nghiên cứu công nghệ gắn liền với ứng dụng, trong phạm vi nghiên cứu này đi sâu vào các hiện tượng, hiệu ứng có được do tác động của từ trường đối với hệ sinh học: phôi - cây tái sinh - nước - dung dịch nuôi cấy, tưới bón, để tìm ra quy trình công nghệ thích hợp sử dụng từ trường trong công nghệ nuôi cấy In vitro cũng như cây trồng nhằm đóng góp thêm một biện pháp cải tiến và làm tăng hiệu quả quy trình nuôi cấy và năng suất cây trồng, đồng thời khẳng định được hoạt tính sinh học của nước - dung dịch nuôi cấy, dung dịch tưới bón được nhiễm từ cũng như vai trò của từ trường đối với phát triển cây trồng.

Nội dung nghiên cứu gồm 2 phần chính:

1. Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường - dung dịch nuôi cấy nhiễm từ lên hiệu quả nuôi cấy bao phần của một số giống ngô trong hệ thống nuôi cấy In vitro

2. Nghiên cứu tính chất từ của nước - dung dịch nuôi cấy, dung dịch tưới bón nhiễm từ liên quan đến hiệu quả nuôi cấy bao phần của một số giống ngô trong hệ thống nuôi cấy In vitro và sự tăng trưởng, năng suất cây trồng

II. PHÂN NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM.

2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường - dung dịch nuôi cấy nhiễm từ lên hiệu quả nuôi cấy bao phần ngô đối với hệ thống nuôi cấy In vitro.

Dòng hợp tử đóng vai trò rất quan trọng trong công tác chọn tạo giống. Ưu thế của phương pháp nuôi cấy bao phần là tạo dòng thuần chỉ sau một thế hệ, nhưng phương pháp này còn một số

hạn chế nhất định như: tỷ lệ tạo phôi và tái sinh cây thấp, tỷ lệ tự lưỡng bội thấp. Hàng loạt các biện pháp nhằm cải tạo hiệu quả nuôi cấy đã được nghiên cứu áp dụng như: sốc nhiệt (nóng hoặc lạnh), sốc sinh dưỡng, sốc hóa học. Các biện pháp này trong những điều kiện nhất

định cũng làm tăng đáng kể hiệu quả nuôi cấy. “Sốc từ” cũng có thể là một trong những biện pháp gây ra những tác động lý thú mà ta có thể trông đợi.

a. Vật liệu:

* Sử dụng từ trường tĩnh tạo trên đĩa Petri nuôi cấy với H không đổi, có cường độ từ trường $H_{tb} = 1280$ Gauss. Dùng các viên nam châm vĩnh cửu kích thước $80 \times 70 \times 15$.

* Dung dịch tạo cấu trúc phôi cơ bản (Induction medium ký hiệu IM) có các khoáng đa lượng, vi lượng theo công thức của dung dịch Yu-pei (ký hiệu Yp, Ku và CS 1978), được cải tiến bằng việc bổ xung thành phần các chất hữu cơ theo dung dịch tạo cấu trúc phôi của Genovesi và Collins (1982).

* Dung dịch tái sinh cây (Regeneration medium - RM) bao gồm: Thành phần chủ yếu như dung dịch IM, nhưng hàm lượng thay đổi và bổ xung thêm chất điều hoà sinh trưởng.

b. Đối tượng và phương pháp tiến hành:

- Đối tượng nghiên cứu là bao phấn của các giống ngô F18; CM24; CM82; CM8V.

Các nhánh hoa đực sau khi được kiểm tra chọn lọc và xử lý khử trùng bề mặt trong dung dịch Hypochlorite, các bao phấn được tách ra và cấy lên dung dịch tạo cấu trúc phôi trong đĩa petri (PD) và đặt tiếp xúc với vùng từ trường trực tiếp của cực nam châm. Nhiệt độ là $12 \div 150C$ trong tối, thời gian $20 \div 23$ ngày. Các bao phấn được phân bố đều trên các đĩa PD với mật độ là 30 bao phấn/PD.

+ Công thức 1: Đối chứng (không có từ trường và dung dịch nuôi cấy không được nhiễm từ)

+ Công thức 2 : Có tác động của từ trường (cực bắc), dung dịch nuôi cấy đồng thời được làm nhiễm từ.

+ Công thức 3 : Có tác động của từ trường (cực nam), dung dịch nuôi cấy đồng thời được làm nhiễm từ.

c. Kết quả thu được về tỷ lệ tạo phôi và tái sinh cây đối với các giống ngô F18, CM24, CM82, CM8V chỉ ra trên bảng 1, 2, 3, 4.

Bảng 1: Kết quả thu được với giống ngô F18

H_{tb} (1280 Gauss)	Số bao phấn cây	Phôi		Cây	
		Số phôi	%	Số cây	%
(Nam)	390	98	25,1	3	0,77
(Bắc)	330	56	16,9	1	0,3
Đối chứng	170	30	17,6	0	0

Bảng 2: Kết quả thu được với giống ngô CM24

H_{tb} (1280 Gauss)	Số bao phấn cây	Phôi		Cây	
		Số phôi	%	Số cây	%
(Nam)	330	100	30,3	5	1,51
(Bắc)	330	74	22,4	2	0,66
Đối chứng	300	35	11,6	1	0,33

Bảng 3: Kết quả thu được với giống ngô CM82

H_{tb} (1280 Gauss)	Số bao phấn cây	Phôi		Cây	
		Số phôi	%	Số cây	%
(Nam)	390	612	157	21	5,4
(Bắc)	330	307	93	11	3,3
Đối chứng	300	240	80	6	2

- Sau 3 thí nghiệm mang tính lặp lại về tác động có tính tích cực của từ trường - dung

dịch nuôi cấy nhằm từ lên tần số tạo phôi và tái sinh cây, đã tiến hành thí nghiệm nghiên cứu này với chế độ cường độ từ trường khác nhau, nhằm xác định từ trường hiệu dụng (thích hợp) cho quy trình công nghệ.

- Điều kiện, phương pháp, cách thức tiến hành giống hệt như 3 thí nghiệm trên, nhưng cường độ từ trường được chọn là 500, 1280, 1550 Gauss (và sử dụng từ trường cực nam. Vì với các kết quả thí nghiệm trên ta đã khẳng định được từ trường cực nam có ảnh hưởng hiệu quả trội hơn từ trường cực bắc) để làm nhiễm từ dung dịch nuôi cấy. Kết quả thu được chỉ ra trên bảng 4.

Bảng 4: Kết quả thu được với giống ngô CM8V, với cường độ từ trường (H) khác nhau.

Cường độ từ (Gauss) và số cực (N)	Số bao phấn cây	Phôi		Cây	
		Số phôi	%	Số cây	%
0	270	48	17,7	2	0,74
500	240	43	17,9	2	0,83
1280	300	64	21,3	5	1,66
1550	270	105	38,8	8	2,96

Kết quả bảng 4 khẳng định tính lặp lại tác động có lợi của từ trường - dung dịch nuôi cấy nhiễm từ lên tần số tạo phôi và tái sinh cây, tỷ lệ này tăng dần với sự tăng cường độ từ trường (H) và vượt trội hơn hẳn so với đối chứng ở dung dịch nuôi được nhiễm từ tại cường độ từ trường là 1550 Gauss

c. Thảo luận (1)

* Phương pháp nuôi cấy bao phấn với các giống ngô khác nhau F18, CM8V, CM24, CM82 trong môi trường dung dịch nuôi cấy được làm nhiễm từ với từ trường tĩnh liên tục trong thời gian nuôi cấy, đã tác động tích cực tới hiệu quả nuôi cấy bao phấn, cụ thể là: tỷ lệ tạo phôi và tái sinh cây như kết quả chỉ ra ở bảng 1; 2; 3, 4 và biểu đồ 1 và 2. Tỷ lệ tạo phôi và tái sinh cây tăng bình quân gấp 2 lần (phôi) trên 3 lần (cây) so với đối chứng.

Đặc biệt là ở giống ngô F18, khả năng tái sinh cây trong môi trường từ trường - dung dịch nuôi cấy nhiễm từ cho kết quả khả quan, còn ở đối chứng tỷ lệ này không cho kết quả (mặc dù với số lượng 300 bao phấn được nuôi cấy).

- Thí nghiệm với các giống ngô khác nhau và nhiều lượt thí nghiệm đều cho kết quả tỷ lệ (%) về tần số tạo phôi và tái sinh cây vượt trội so với đối chứng (ở điều kiện bình thường). Điều này có thể khẳng định tính lặp lại cao của phương pháp nuôi cấy trong môi trường tác động của từ trường - dung dịch nuôi cấy được nhiễm từ.

- Kết quả này rất có ý nghĩa nhằm cải tạo trong phương pháp nuôi cấy bao phấn để tạo ra dòng thuần chỉ sau một thế hệ, đặc biệt đối với giống cho năng suất cao khó tạo bằng những phương pháp hiện có đang áp dụng.

* Phản ứng của bao phấn tạo cấu trúc phôi cũng như tái sinh cây tăng có hệ thống theo với sự tăng cường độ từ trường tĩnh (H) để làm nhiễm từ dung dịch nuôi cấy.

- Tỷ lệ phôi và tái sinh cây tăng cao nhất là 2,2 và 4 lần tại dung dịch nuôi cấy được làm nhiễm từ với cường độ từ trường là 1550 Gauss so với đối chứng. Kết quả được chỉ ra ở hình H1 và H2.

- Trên hình 3 chỉ ra vùng từ trường làm việc được phân bố trong đĩa PD để từ hóa nước - dung dịch cũng như tác động trực tiếp đến quá trình tạo cấu trúc phôi - tái sinh cây.

2.2. Nghiên cứu tính chất từ của nước - dung dịch nuôi cấy, dung dịch tưới bón nhiễm từ liên quan đến hiệu quả nuôi cấy bao phấn In vitro của một số giống ngô và sự tăng trưởng, năng suất cây trồng.

a. Một vài đặc trưng từ của vật liệu

Các vật liệu khi đặt trong từ trường thể hiện tính chất từ khác nhau tùy thuộc vào cấu trúc từ của chúng. Một trong những thông số đặc trưng cho từ tính của vật liệu là độ cảm từ (susceptibility) χ

$$\chi = I/H$$

Trong đó I là mô men từ của vật liệu tính trên một đơn vị thể tích hay độ từ hóa, đơn vị là Tesla (hệ SI) hay Gauss (hệ CGS).

H là từ trường có đơn vị là A/m² (hệ SI) hay Oesterd (hệ CGS).

χ có đơn vị là H/m (hệ SI) hay không có thứ nguyên trong hệ CGS.

Ngoài ra trong hệ SI người ta còn sử dụng độ cảm từ tương đối (không thứ nguyên):

$$\bar{\chi} = \chi / \mu_0$$

Trong đó $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7}$ H/m là độ từ thẩm của chân không.

Tùy theo giá trị của χ ta có thể phân loại vật liệu theo cấu trúc từ như sau:

Các vật liệu nghịch từ (diamagnetic) có χ âm và độ lớn $\sim 10^{-5}$. Nguồn gốc tính nghịch từ là chuyển động quỹ đạo của điện tử quanh hạt nhân bị cảm ứng bởi từ trường ngoài.

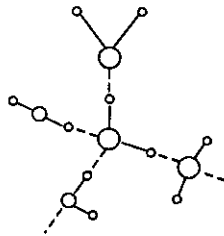
Các vật liệu thuận từ (paramagnetic) có χ dương và độ lớn $\sim 10^{-3}$ đến 10^{-5} . Vật liệu thuận từ gồm những nguyên tử hay ion mà mô men từ cô lập, định hướng hỗn loạn do tác dụng nhiệt.

Các vật liệu sắt từ (ferromagnetic) có χ dương rất lớn cỡ 10^6 do tương tác trao đổi giữa các mô men từ, các mô men này sắp xếp có trật tự tự phát, song song với nhau.

Ngoài ra trong các vật liệu có trật tự về cấu trúc từ còn có các vật liệu phản sắt từ, feri từ...

b. Các tính chất của nước

Nước mang nhiều đặc tính lý hóa dị thường. Liên kết của các phân tử để tạo nên cấu trúc đặc thù của nước dựa trên khả năng tương tác của chúng với nhau bằng liên kết hydro. Liên kết này là yếu, dễ dàng bị phá vỡ cũng như khôi phục lại làm cho cấu trúc của nước trở nên rất biến dị.



O : Oxy

o : hydro

_ : Liên kết hoá học

--- : Liên kết nước

Nước còn mang nhiều tính chất dị thường như hằng số điện môi lớn, khối lượng riêng, nhiệt dung lớn, khả năng hoà tan cao.... Những đặc tính dị thường này được qui định chủ yếu bởi cấu trúc của nước. Do đó việc điều khiển định hướng đặc trưng cấu trúc của nước thực sự có ý nghĩa lớn trong thực tiễn.

Khi chúng ta đưa các thành phần nuôi cấy (tạp), hoà tan trong nước để tạo dung dịch nuôi cấy (hoặc tưới bón), thì lúc này trong nước - dung dịch tồn tại những cấu trúc khác nhau. Với tương tác khác nhau của các phân tử có trong nước - dung dịch, các phân tử tạp đi vào các lỗ trống làm phá vỡ cấu trúc của nước. Do các liên kết này mà trong các thể tích vi mô riêng biệt của nước-dung dịch thường xuyên xuất hiện các kết tụ đặc thù của các đám vi phân tử là các nguyên tố cấu trúc của nước - dung dịch.

Về mặt tính chất từ, nước là vật liệu nghịch từ yếu (χ_{H_2O} ở 20°C ~ 7.10^{-7}). Điều này dẫn đến sự khó khăn cho việc xác định hệ số từ hoá của nước vì phép phân tích này đòi hỏi thiết bị có độ nhạy cao.

c. Kết quả phân tích tính chất nhiễm từ của nước-dung dịch nuôi cấy, tưới bón.

Các phép đo hệ số từ hóa của các mẫu nước được tiến hành tại trung tâm quốc tế đào tạo về khoa học vật liệu (ITIMS) trên thiết bị từ kế mẫu rung (sản phẩm của DMS.Isznc USA Model 1660). Độ nhạy của từ kế là 6.10^{-5} emu và cường độ từ trường cực đại là 1.3 Tesla.

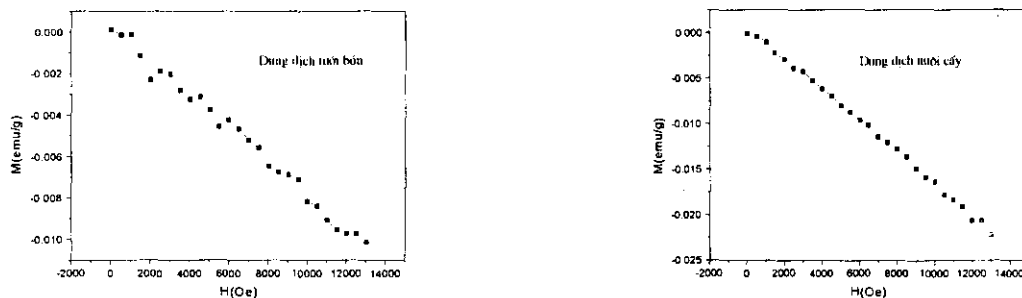
Các mẫu đo có khối lượng cỡ 0.032 gram được đưa vào curvet bằng thủy tinh và đưa vào giá đỡ mẫu của từ kế. Từ trường đo được quét từ 0 đến 1.3 Tesla. Với mỗi mẫu nước phải thực hiện 2 phép đo: có mẫu và không mẫu để khử đóng góp từ của curvet.

Từ cơ sở giá trị thực nghiệm $M(H)$ của các mẫu nước (xem hình vẽ) giá trị χ được xác định bằng quá trình làm khớp (fit) hồi qui tuyến tính.

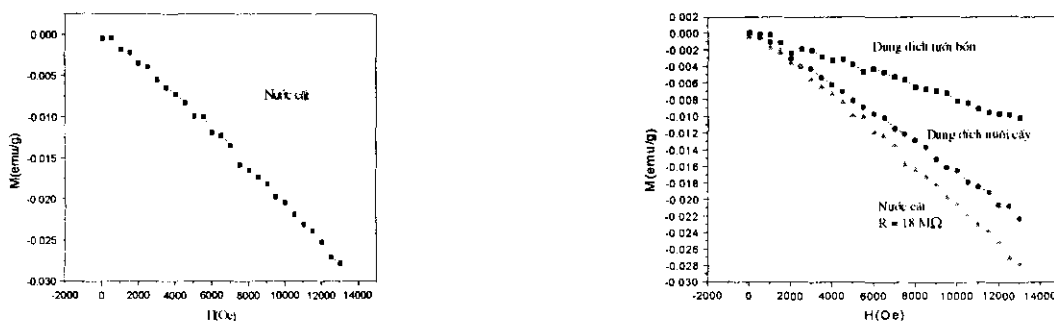
Bảng 5 : Kết quả xác định hệ số từ hóa của các mẫu nước dung dịch nuôi cấy, dung dịch tưới bón.

Mẫu nước	Hệ số từ hóa (χ) x 10^{-7}
Nước khử ion	-21.68
Dung dịch nuôi cấy	-17.2
Dung dịch tưới bón	-8.106

Hình 4, 5 là mối quan hệ độ từ hoá dung dịch nuôi cấy, dung dịch tưới bón, nước khử ion với từ trường từ hoá.



Hình 4. Đường cong từ hóa của các mẫu dung dịch tưới bón và nuôi cấy



Hình 5. Đường cong từ hóa của mẫu nước cất và của cả 3 đường cong

d. Bàn luận (II)

Từ các kết quả đo chỉ ra trên bảng 5 và hình 4, 5 có một số nhận xét sau:

- Các kết quả trên cho thấy các mẫu đều có tính chất nghịch từ. Tính chất này tăng có hệ thống từ dung dịch tưới bón, dung dịch nuôi cấy đến nước khử ion được đặc trưng bởi độ cảm từ χ .

- Nước khử ion của Trung tâm ITIMS có độ sạch cao ($R = 18M\Omega$), nên có độ cảm từ (âm) χ rất lớn. Các dung dịch nuôi cấy, dung dịch tưới bón có χ thấp hơn là do bởi :

+ Dung dịch nuôi cấy được pha trong môi trường nước cất, dung dịch tưới bón pha trong môi trường nước thường nên bản thân chúng đã có nhiều tạp lạ hơn nước khử ion. Bên cạnh đó, dung dịch còn một số ion thuận từ được đưa vào (thành phần vi lượng) chúng tạo thành vi phân tử nhạy từ trong nước-dung dịch, nên làm giảm tính nghịch từ của dung dịch. Khi chúng được nhiễm từ sẽ đóng vai trò yếu tố chính “vận tải” dẫn tới hoạt tính sinh hoá dung dịch thay đổi: độ linh động, độ nhớt, độ pH, độ dẫn điện... Vì thế chúng đóng góp ảnh hưởng chức năng đặc biệt quá trình chuyển hoá, tăng khả năng hấp thụ của phôi, cây.

+ Ngoài ra dưới tác động đồng thời của từ trường tạo ra hiệu ứng sinh học từ, góp phần điều hoà từ trường nội sinh và quá trình phân bào, tạo phôi, tái sinh cây.

III. KẾT LUẬN

Nghiên cứu tác động của từ trường- dung dịch nuôi cấy nhiễm từ lên nuôi cấy bao phấn ngô là một nghiên cứu mới nhằm đóng góp thêm một phương pháp sử dụng từ trường làm tăng hiệu quả nuôi cấy và khẳng định vai trò tích cực của từ trường đối với sự sống sinh vật.

Đây là những nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam cũng như trên thế giới về ảnh hưởng của từ trường đối với hệ thống nuôi cấy In vitro

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. V.I.Klassen - Nước và nam châm. NXB Khoa học - Maxcova, 1973

2. Klep C. ; Balanaru V. ; Cipaianu G.

Preliminary results on the irrigation of argriulturral crops with magneticcally treated water Productia -...- Technice. 1986

3, Magmuson M Magnetic treatment of the nutrument solution for tomatoes and the influence of a magnetic fild on water and pland

Rápport -...- Lantbruskuni vestied. 1984

4, Tì n W.X. ; Kuang Y.L. ; Mei Z.P.

I ffect of magnetic water on seed germination, seedling growth and grain yield of rice.

5, Tì nh Ngoc Dieu, Le Huy Ham, Dinh Hai Lam

Some changes in the growing indices of Cavendish seedling banana under the effect of magnetic water and magnetic processed products

Centre for Applied physisc & Scientific Instruments - Annual report 1997

ABSTRACT

THE IMPACT OF MAGNETIC FIELD ON MAIZE AND ROGENESIS

TRINH NGOC DIEU, NGUYEN NGUYEN HY*

LE HUY HAM, HOANG THUY DUONG, DO NANG VINH**

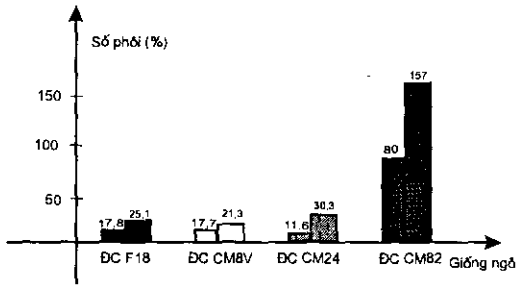
**The Institute of Applied Physics and Scientific Instruments*

***The Institute of Agricultural Genetics*

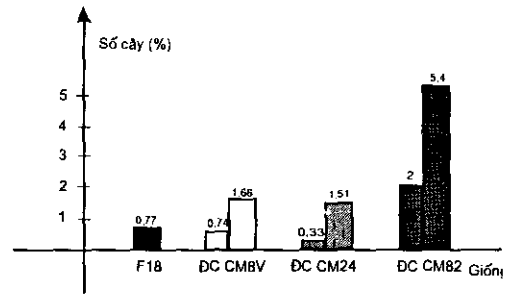
Since the last fifteen year the impact of magnetic field on living organisms and living systems has been studied intensively. It has been resulted in a wide range of application of magnetic field in agriculture and medicine.

In present study the impact of magnetic field on maize in vitro androgenesis has been studied. It was revealed that the field of permanent magnets when applied to Petry dishes with maize anthers in the duration for 21 days in standart culture conditions

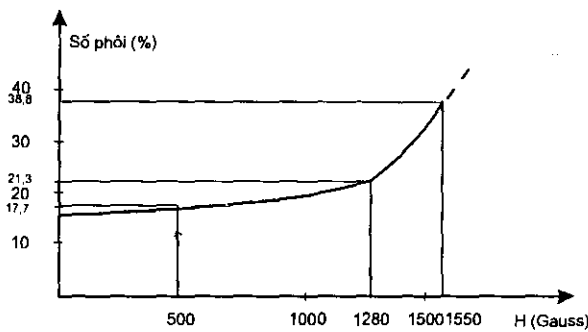
Has positive influence on embryo production and plant regeneration. The South pole increased these figures almost three folds in comparison with control, while the effect of North pole seemed to be less. Intensity of magnetic field also has significance. Investigation within intensities from 500 gauss to 1500 gauss showed that the increasing strength of magnetic field increased embryo production and plant regeneration. Measurement of magnetic susceptibility showed that this parameter of induction medium was higher then that in pure water. It means that soluble in induction medium nutrient compounds has increased magnetic susceptibility of the induction medium, this may be one of the reasons for the seen effect.



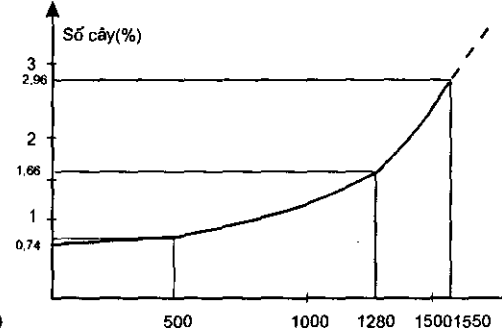
Biểu đồ 1: Mô tả tỷ lệ số phôi được tạo thành (%) giữa đối chứng và tác động của từ trường - dd nuôi cấy nhiễm từ với các giống ngô F18 ; CM8V ; CM24 ; CM82



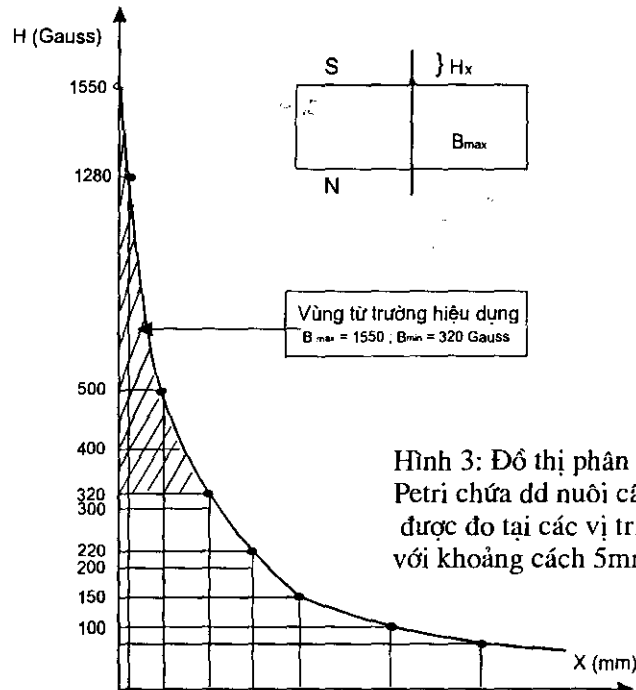
Biểu đồ 2: Mô tả tỷ lệ số cây được tạo thành (%) giữa đối chứng và tác động của từ trường - dd nuôi cấy nhiễm từ với các giống ngô F18 ; CM8V ; CM24 ; CM82



Hình 1: Mối quan hệ tác động từ trường - dd nuôi cấy nhiễm từ lên tần số tạo phôi từ bao phần giống ngô CM8V



Hình 2: Mối quan hệ tác động từ trường nuôi cấy nhiễm từ lên tần số tái sinh cây phôi giống ngô CM8V



Hình 3: Đồ thị phân bố vùng từ trường trong c Petri chứa dd nuôi cấy và bao phần (các giá tr được đo tại các vị trí song song với trục từ hoá với khoảng cách 5mm)

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ NUÔI TRỒNG NẤM ĂN VÀ NẤM DƯỢC LIỆU TRÊN BÃ MÍA

NGUYỄN HỮU ĐỒNG, ĐINH XUÂN LINH, NGÔ XUÂN NGHIÊN, LÊ HỒNG VINH, NGUYỄN THỊ SƠN, THÂN ĐỨC NHÃ, NGUYỄN THỊ BÍCH THUY

Trung tâm công nghệ sinh học thực vật, viện di truyền nông nghiệp

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, việc nuôi trồng nấm ăn và nấm dược liệu ở các tỉnh phía Bắc nói riêng và cả nước nói chung phát triển mạnh mẽ. Tổng sản lượng các loại nấm ăn trong năm 2000 ước tính đạt khoảng 100.000 tấn; (Riêng các tỉnh phía Bắc đạt khoảng 10.000 tấn). Nghề trồng nấm đã góp phần giải quyết công ăn việc làm, tăng thu nhập cho hàng vạn hộ nông dân.

Nguồn nguyên liệu chính để trồng nấm từ trước đến nay là: rơm rạ, mùn cưa, cây gỗ, bông phế thải.... Hiện nay ngành công nghiệp sản xuất mía đường đang phát triển mạnh mẽ, mỗi năm đạt khoảng 1 triệu tấn đường tương ứng có khoảng 2,5 triệu tấn bã mía. Lượng bã này được sử dụng một phần nhỏ làm nhiên liệu, các sản phẩm sợi (giấy, chất lọc).... Lượng lớn bã còn lại được thải ra tự nhiên, điều này rất lãng phí và gây ô nhiễm môi trường. Sau khi phân tích các thành phần cơ bản trong bã mía, xen-lu-lo (cellulose) chiếm tỉ lệ rất cao, nó có thể nuôi trồng được: nấm rơm, nấm sò, mộc nhĩ, nấm mỡ, nấm hương và nấm linh chi. Điều quan trọng là nguyên liệu này lại tập trung ở khoảng 40 nhà máy mía đường lớn trong cả nước giúp cho việc sản xuất nấm theo mô hình trang trại, thuận lợi cho việc thu gom sản phẩm để chế biến xuất khẩu. Thấy được tầm quan trọng mang tính chiến lược này, Trung tâm CNSH Thực vật - Viện Di truyền Nông nghiệp đã đi sâu vào nghiên cứu để hoàn thiện quy trình nuôi trồng các loại nấm ăn và nấm dược liệu trên bã mía. Địa điểm làm thí nghiệm tại Trung tâm CNSH Thực vật - Viện Di truyền Nông nghiệp. Điểm triển khai trên diện rộng đã được tiến hành tại Công ty Cổ phần Mía đường Lam Sơn (Thanh Hoá).

II. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Hoàn thiện quy trình công nghệ nuôi trồng các loại nấm trên nguyên liệu bã mía.
- Xác định cụ thể về năng suất của từng loại nấm trên nguyên liệu bã mía.
- Hạch toán về mặt kinh tế khi nuôi trồng mỗi loại nấm bằng nguyên liệu bã mía.

III. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Vật liệu

- Bã mía còn hàm lượng đường < 0,3%, đã lưu giữ tại nhà máy Mía đường Lam Sơn 1 năm, 2 năm, 3 năm.
- Rơm rạ được mua tại Cổ Nhuế, Từ Liêm, Hà Nội.
- Mùn cưa cao su được mua tại Nghệ An, các nguyên liệu này được phơi khô, bảo quản, để không bị mốc.

3.2. Giống:

Sử dụng bộ giống (nấm rơm, nấm sò, mộc nhĩ, nấm mỡ, linh chi) đã được tuyển chọn thuần chủng, ổn định về năng suất, chất lượng và có tính chống chịu tốt.

3.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu, thực nghiệm qua các công đoạn sau:

Xử lý nguyên liệu → Cây giống → Chăm sóc → Thu hái → Đánh giá năng suất và chất lượng sản phẩm.

3.4. Địa điểm và thời gian triển khai

- Từ 15/4/1999- 15/4/2000 (tại Trung tâm CNSH Thực vật - Viện Di truyền Nông nghiệp)
- Từ 15/4/2000- 15/4/2001 (tại Công ty Cổ phần Mía đường Lam Sơn- Thanh Hoá).

Tổng số nguyên liệu đã được nuôi trồng là 381,5 tấn, được phân bổ theo bảng sau:

Bảng 1: Số lượng nguyên liệu và chủng loại các loại nấm ăn và nấm dược liệu được nuôi trồng trên bã mía trong các năm 1999 và 2000.

Phân bổ từng năm Đơn vị tính : tấn	1999	2000	
		TT CNSHTV	Mía đường Lam Sơn
Loại nấm			
Nấm rơm	0,3	2	30
Nấm sò	0,6	1	5
Mộc nhĩ	0,5	2	30
Nấm mỡ	0,5	2	300
Linh chi	0,6	2	5
Tổng cộng	2,5	379,0	

3.5. Nội dung thực hiện

3.5.1. Phân bố thời gian, lượng nguyên liệu, số lần nuôi trồng cho mỗi loại nấm (xem bảng 2, bảng 3).

Bảng 2: Thời gian, lượng nguyên liệu, số lần nuôi trồng cho nấm rơm, nấm sò, nấm mỡ

	Nấm rơm			Nấm sò			Nấm mỡ		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3
Thời gian	15/6- 15/7/99	15/6- 15/7/00	15/7- 15/8/00	15/8- 15/12/99	16/10/99- 15/1/00	16/1- 16/4/00	15/10/99- 15/4/00	20/10/99- 15/4/00	1/11/99- 15/4/00
Lượng rơm khô(kg)	300	900	1100	600	300	700	500	1500	500
Lượng bã mía khô (kg)	300	900	1100	600	300	700	500	1500	500

Bảng 3: Thời gian, lượng nguyên liệu, số lần nuôi trồng cho nấm mộc nhĩ, linh chi

Lần nuôi trồng	Nấm mộc nhĩ			Nấm linh chi		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3
Thời gian	15/8/- 15/12/99	15/9/99- 15/1/00	15/2- 15/6/00	15/2- 15/6/99	15/8/- 15/12/99	1/9- 30/12/99
Lượng mùn cưa khô(kg)	500	1000	1000	600	1500	500
Lượng bã mía khô (kg)	500	1000	1000	600	1500	500

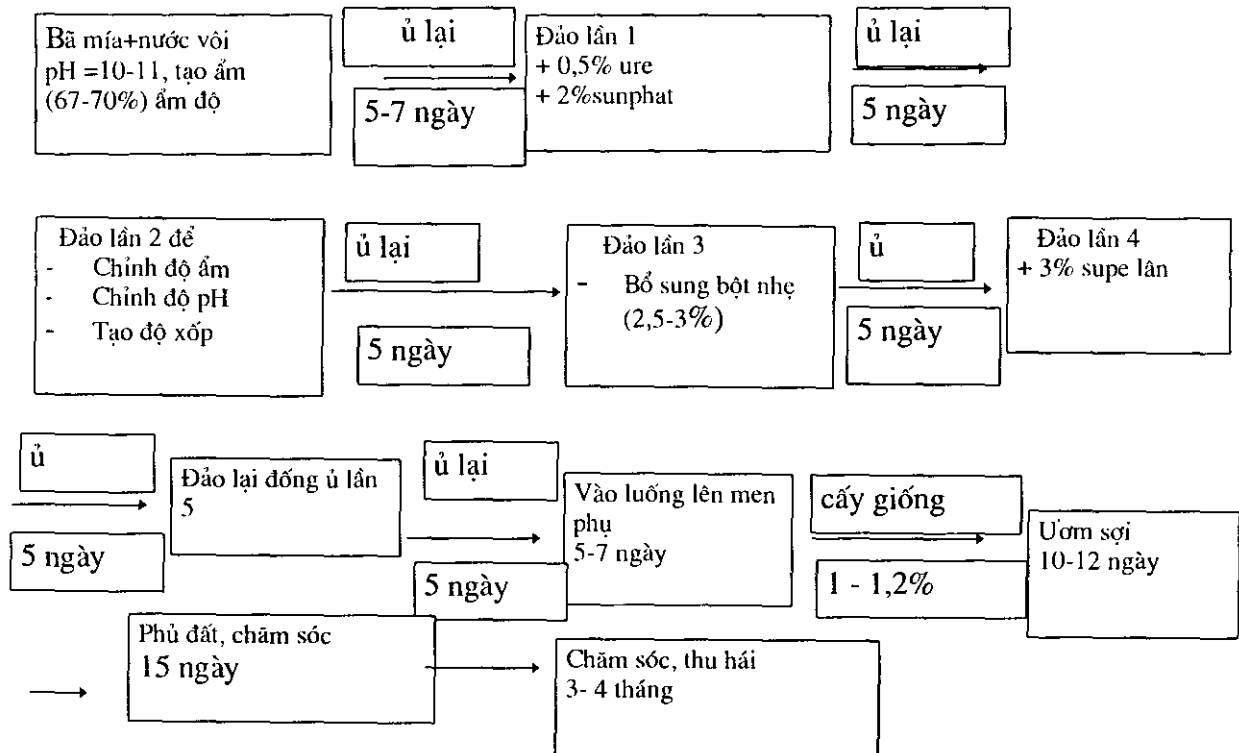
3.5.2. Thành phần hoá học cơ bản của bã mía khô và vụn (đã qua sàng) (theo Gohl):

Bảng 4: Thành phần hoá học cơ bản của bã mía khô và vụn (đã qua sàng)

Thành phần	Tính theo chất khô (%)	Tính theo chất tươi (%)
Độ ẩm		6,9
Protein thô	4	3,7
Chất béo	1,3	1,2
Xơ thô	37,0	34,5
Tro	3,9	3,6
Ni-tơ tự do chiết xuất được	53,8	50,1

3.5.3. Sơ đồ nuôi trồng cho mỗi loại nấm trên bã mía:

Sơ đồ nuôi trồng nấm mỡ:



4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Qua các lần thí nghiệm, căn cứ vào các kết quả thu được dựa trên các số liệu thống kê chúng tôi đi tới các nhận xét:

Bảng 5: Đánh giá năng suất của nấm rơm trên bã mía

Nguyên liệu \ Lần nuôi trồng	Sản phẩm tươi/nguyên liệu khô (%)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
Rơm rạ khô	10,06	14,2	13,54	12,6
Bã mía khô	11,2	13,6	11,44	12,08

Năng suất trung bình của nấm rơm trên bã mía đạt 12,08%. Ta còn thấy năng suất nấm rơm trên bã mía và năng suất của nấm rơm trên rơm không có sự chênh lệch đáng kể.

Bảng 6: Đánh giá năng suất của nấm mỡ trên bã mía:

Nguyên liệu \ Lần nuôi trồng	Sản phẩm tươi/nguyên liệu khô(%)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
Rơm rạ khô	22,58	30,08	25,94	26,2
Bã mía khô	23,1	26,47	20,03	23,2

Năng suất trung bình của nấm mỡ trên bã mía đạt 23,2 %. Qua bảng 6 còn cho ta có thêm một số nhận xét:

- + Năng suất của nấm mỡ trên bã mía thấp hơn nấm mỡ trồng trên rơm rạ khoảng 3%.
- + Thời điểm phù hợp nhất để xử lý nguyên liệu trồng nấm mỡ ở một số tỉnh phía Bắc vào cuối tháng 10 dương lịch.

Bảng 7: Đánh giá năng suất của linh chi trên bã mía

Nguyên liệu \ Lần nuôi trồng	Sản phẩm tươi/nguyên liệu khô(%)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
Mùn cưa cao su khô	11,5	8,76	8,3	9,52
Bã mía khô	14,57	11,6	7,88	11,35

Năng suất trung bình của nấm linh chi trồng trên nguyên liệu bã mía đạt 11,35%. Qua bảng 7, ta có thêm một số nhận xét:

- + Năng suất của linh chi trồng trên bã mía cao hơn năng suất của linh chi trồng trên mùn cưa cao su 1,8%.
- + Thời điểm phù hợp nhất để trồng nấm linh chi cho năng suất cao ở một số tỉnh phía Bắc vào khoảng tháng 2 dương lịch (xem bảng 3 và bảng 7).

Bảng 8: Đánh giá năng suất của nấm sò trên bã mía

Nguyên liệu \ Lần nuôi trồng	Sản phẩm tươi/nguyên liệu khô(%)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
Rơm rạ khô	65,72	72,92	95,72	78,12
Bã mía khô	72,1	67,88	100,02	80

- + Năng suất trung bình của nấm sò trên bã mía đạt 80%
- + Năng suất trung bình của nấm sò trồng trên bã mía cao hơn năng suất của nấm sò trồng trên rơm rạ là 1,88%.
- + Kết quả nuôi trồng ở các lần khác nhau có sự chênh lệch khá lớn, đặc biệt lần nuôi trồng thứ ba cho năng suất đạt tới 100,02%. Điều này có nghĩa năng suất của nấm sò có mức độ phản ứng rộng, môi trường ngoại cảnh có ảnh hưởng rất lớn đến năng suất của nấm sò.
- + Thời vụ phù hợp nhất để trồng nấm sò ở một số tỉnh phía Bắc từ tháng 1 đến tháng 4 dương lịch hàng năm.

Bảng 9: Đánh giá năng suất của mộc nhĩ trên bã mía

Nguyên liệu \ Lần nuôi trồng	Sản phẩm tươi/nguyên liệu khô(%)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
Mùn cưa khô	98,7	73,86	109,2	93,92
Bã mía khô	103,5	74,92	106,7	95,04

- + Năng suất trung bình của mộc nhĩ trồng trên bã mía đạt 95,04%. Bảng 9 cho thấy năng suất của mộc nhĩ có mức phản ứng rộng. Môi trường ngoài có ảnh hưởng rất lớn đến năng suất của nấm mộc nhĩ.
- + Thời vụ thích hợp nhất để trồng mộc nhĩ ở một số tỉnh phía Bắc từ 15/2 đến 15/6 hàng năm.

5. KẾT LUẬN, ĐỀ NGHỊ:

5.1. Kết luận:

Bã mía là loại nguyên liệu có thành phần xen-lu-lô cao, dễ thủy phân ở nhiệt độ cao hoặc dưới tác động của enzym xen-lu-la-za. Nó là nguyên liệu phù hợp để nuôi trồng một số loại nấm ăn và nấm dược liệu cho năng suất cao (nấm rơm, nấm sò, nấm mỡ, mộc nhĩ, linh chi).

Nước ta mỗi năm sản xuất ra khoảng 1.000.000 tấn đường, có nghĩa là ta có khoảng 2.500.000 tấn bã mía. Sản lượng này tập trung chủ yếu vào khoảng 40 nhà máy lớn trong cả nước. Mục đích của đề tài này giải quyết được một số vấn đề cơ bản sau.

- Giải quyết được khoảng 300.000 - 500.000 lao động chính từ nghề trồng nấm với mức thu nhập > 15.000 đồng/người/công lao động.
- Bảo vệ môi trường trong sạch do ô nhiễm từ bã phế thải gây ra.
- Tạo ra lượng sản phẩm có giá trị khoảng 250.000.000 USD trong một năm.
- + Về xã hội: Giải quyết được số lượng lớn lao động phổ thông thất nghiệp hiện nay.
- + Sau khi thu hoạch nấm, bằng các loại vi sinh vật hoại sinh, ta sẽ thu được một lượng lớn phân hữu cơ. Điều này mở ra cho ngành mía đường Việt Nam một hướng để sản xuất đường sạch từ việc sử dụng phân bón hữu cơ này.

5.2. Đề nghị:

Đề nghị Hội đồng Khoa học công nghệ- Viện Di truyền Nông nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận đây là tiến bộ kỹ thuật cấp nhà nước và cho phép triển khai công nghệ này trên phạm vi rộng nhằm giúp giải quyết công ăn việc làm, tăng thu nhập và tạo ra lượng sản phẩm lớn, các loại nấm ăn trên bã mía để góp phần thoả mãn nhu cầu nội địa và xuất khẩu.

TÓM TẮT

KẾT QUẢ NUÔI TRỒNG NẤM ĂN VÀ NẤM DƯỢC LIỆU TRÊN BÃ MÍA

Sau khi nghiên cứu một cách cụ thể đặc tính sinh học của 05 chủng loại nấm (nấm rơm, nấm sò, mộc nhĩ, nấm mỡ, nấm linh chi), tập thể đề tài đã tiến hành tuyển chọn, thuần chủng một số các giống mới có năng suất, chất lượng và có tính chống chịu tốt để phát triển sản xuất trên diện rộng. Mặt khác, chúng tôi đã phân tích một cách cụ thể thành phần hoá học cơ bản của bã mía khô và vụn đã qua sàng.

Từ đó, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thực nghiệm qua các công đoạn sau:

Xử lý nguyên liệu → Cấy giống → Chăm sóc → Thu hái
→ Đánh giá năng suất và chất lượng sản phẩm.

Các thí nghiệm được lập lại 3 lần và nuôi trồng ở các tiểu vùng khí hậu khác nhau (Hà Nội và Thanh Hoá). Qua 2 năm tiến hành nghiên cứu, các số liệu đã được xử lí bằng phương pháp thống kê sinh học, chúng tôi đã thu được một số kết quả sau:

1. Năng suất trung bình của nấm rơm trên bã mía đạt 12,08%
2. Năng suất trung bình của nấm mỡ trên bã mía đạt 23,2%
3. Năng suất trung bình của nấm sò trên bã mía đạt 80%
4. Năng suất trung bình của linh chi trên bã mía đạt 11,35%
5. Năng suất trung bình của mộc nhĩ trên bã mía đạt 95,04%.

Đề tài đã chứng minh được rằng:

Bã mía là đối tượng phù hợp để nuôi trồng một số loại nấm (nấm rơm, nấm sò, mộc nhĩ, nấm mỡ, nấm linh chi) không thua kém các nguyên liệu truyền thống như rơm rạ, mùn cưa, bông phế thải..... đã được sử dụng từ lâu.

Đặc biệt, linh chi, mộc nhĩ, nấm sò cho năng suất cao hơn các nguyên liệu truyền thống khác (kể cả mùn cưa cao su).

summary

Studied results of edible and medicinal mushroom cultivation technology on bagasse.

Nguyen Huu Song, Sinh xuan Linh, ngo xuan nghien, le hong vinh, nguyen thi son, than duc nha, nguyen thi bich thuy ET AL.

centre for plant biotechnology - Agricultural genetics institute

Experimental study showed that bagasse is a good material for mushroom cultivation (*Volvariella*, *Pleurotus*, *Agaricus*, *Auricularia*, *Ganoderma*). It is as good as usual materials such as: rice straw, sawdust, exhausted cotton... Especially *Ganoderma*, *Auricularia* cultivation on bagasse get higher output than on sawdust (even on rubber sawdust).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. PGS.TS Nguyễn Hữu Đống (Chủ biên), CN Đinh Xuân Linh, CN Nguyễn Thị Sơn, TS Jani, CN. Thân Đức Nhã, CN. Ngô Xuân Nghiênn, *Nấm ăn - Cơ sở khoa học và công nghệ nuôi trồng*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội- 2000
2. Trịnh Tam Kiệt, *Nấm lớn ở Việt Nam*, NXB Khoa học kỹ thuật, Hà Nội-1990.
3. Lê Duy Thắng, *Kỹ thuật nuôi trồng các loại nấm*, NXB Thành phố Hồ Chí Minh, 1997.
4. Heim, R., *Contribution ala Hore mycologique de la Thailand*, Rev. Myco.labor.(1 e partie),1992

MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN RAU CẢI CANH VÀ XÀ LÁCH

LÊ TIẾN DŨNG¹, NGUYỄN KIM VŨ¹, VŨ VĂN VỤ²

¹ Viện Công nghệ Sau thu hoạch

² Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên,

Đại học Quốc gia, Hà Nội

I. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Đối tượng cần bảo quản là rau sạch được trồng bằng biện pháp thủy canh nên các yếu tố sinh vật hại không còn là vấn đề đáng lo ngại lớn nữa. Vấn đề cần quan tâm trong bảo quản rau sạch chính là kim hàm sự hoá già của chúng và những tổn hao do hô hấp gây ra.

Xuất phát từ những điều kiện này chúng tôi đã chọn hướng bảo quản rau sạch sẽ theo phương pháp khí quyển điều biến. Đây là phương pháp đang được nghiên cứu và áp dụng trên thế giới trên các loại rau, quả nhiệt đới [2, 3, 5, 7].

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1- Đối tượng nghiên cứu

- Cây xà lách (*Lactuca sativa*).

- Cây rau cải canh (*Brassica juncea* L.).

Rau sau khi thu hoạch được cắt bỏ rễ, đưa vào bảo quản và làm thí nghiệm trong vòng 24 giờ, độ ẩm bề mặt của rau ở mức 9-10% (nước trên bề mặt lá).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1- Xác định hàm lượng sắc tố trong lá xanh theo Holden mô tả [1, 4]

2.2.2- Xử lý số liệu bằng phương pháp thống kê [6].

Toàn bộ số liệu được tính toán và xử lý bằng phần mềm EXCEL. 2.2.3- Xác định cường độ hô hấp của rau

Cường độ hô hấp được xác định theo phương pháp của Vnhiiz có cải tiến phần thiết bị cho phù hợp với việc đo cường độ hô hấp của rau. Cường độ hô hấp tính trên 100g rau tươi như sau:

$\text{mgCO}_2/100\text{g rau tươi/giờ} = [4,4 * (V_C - V_{\text{HCl}}) * 100] / (t * m)$ trong đó:

V_C là số ml HCl 0,1N dùng để trung hoà hết 20 ml Ba(OH)₂ ban đầu,

V_{HCl} là số ml HCl 0,1 N dùng để trung hoà hết 20 ml Ba(OH)₂ sau khi đã phản ứng với CO₂ trong không khí đi ra khỏi buồng hô hấp,

t là thời gian đo (giờ),

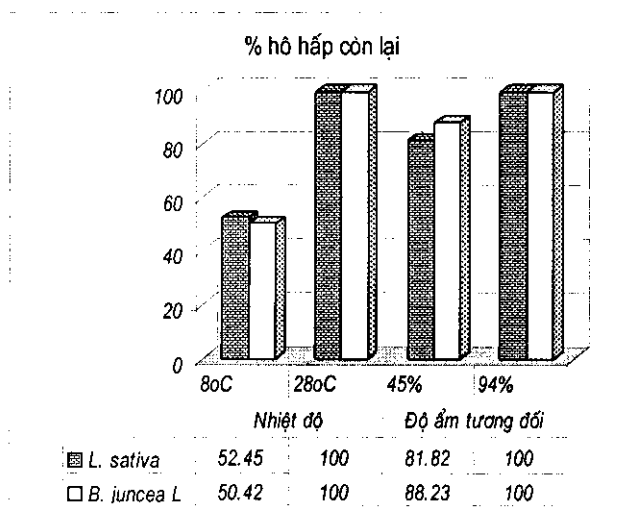
m khối lượng rau (gam).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1- Ảnh hưởng của nhiệt độ và độ ẩm tương đối lên hô hấp của rau

Chúng tôi đã tiến hành đo cường độ hô hấp của hai loại rau trên tại các nhiệt độ 8°C, 28°C và ở các độ ẩm tương đối 45%, 94%. Kết quả được trình bày trên hình 1. Kết quả này đã

cho thấy, trong hai yếu tố nghiên cứu thì yếu tố nhiệt độ có ảnh hưởng đến hô hấp của rau nhiều hơn so với độ ẩm tương đối.

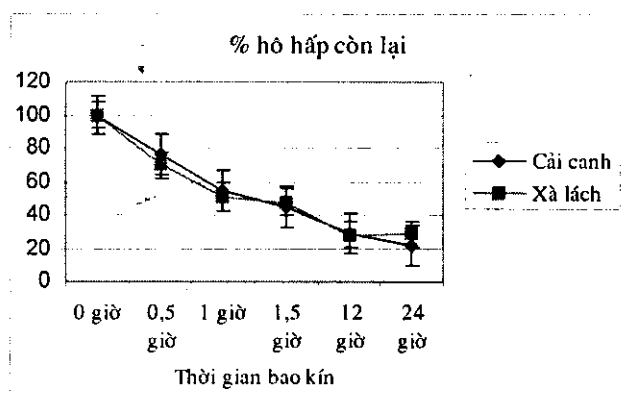


Hình 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ và độ ẩm tương đối lên hô hấp của rau

3.2.- Ảnh hưởng của thời gian bao kín

Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm bao kín (trong buồng hô hấp thủy tinh) một lượng rau không đổi trong một thể tích nhất định và xác định lượng CO₂ tạo thành tại các thời điểm 0, 0,5, 1, 1,5, 12, 24 giờ. Kết quả thu được trên hình 2 đã cho thấy hô hấp của cải canh và xà lách giảm theo thời gian bao kín, sau 24 giờ bao kín thì hô hấp còn lại tương ứng là 22% đối với cải canh và 28,5% đối với xà lách.

Sử dụng hàm CORREL của phần mềm EXCEL chúng tôi đã tính được mức tương quan giữa hai đại lượng này là -0,83 ở cải canh và -0.81 ở xà lách. Dấu trừ ở đây cho biết mối tương quan tỷ lệ nghịch.



Hình 2: Ảnh hưởng của thời gian bao kín lên hô hấp của rau

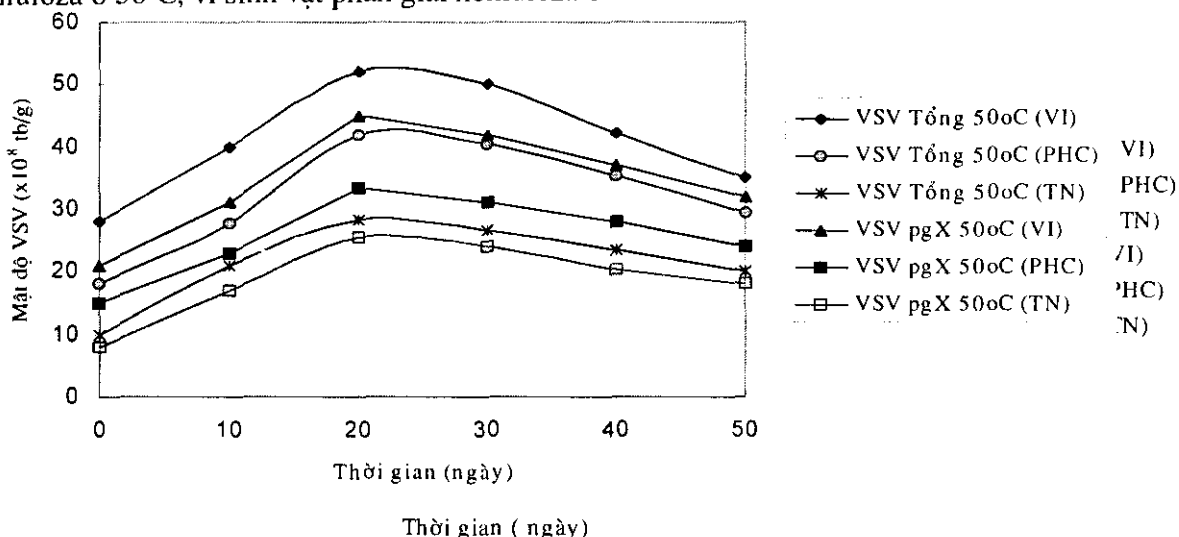
3.3- Ảnh hưởng của khối lượng rau bao kín.

Chúng tôi đã tiến hành xác định lượng CO₂ tạo thành trong cùng một thể tích bao gói khi bao kín (trong buồng hô hấp bằng thủy tinh) các khối lượng rau khác nhau (250, 500, 1000, 1500

(Tiếp theo trg 121
135, 136, 137)

Khi nghiên cứu sự biến động của vi sinh vật trong các đồng ủ, nhận thấy mật độ vi sinh vật trong đồng ủ có công thức VI cao hơn hai đồng ủ còn lại, mật độ vi sinh vật trong đồng ủ tự nhiên là thấp nhất trong 3 đồng ủ. Điều này khẳng định rằng, việc bổ sung vi sinh vật vào trong đồng ủ làm cho mật độ vi sinh vật tăng hơn hẳn so với để lên men tự nhiên. Trong 3 đồng ủ ta đều nhận thấy, ở ngày thứ 10 vi sinh vật tổng và vi sinh vật phân giải xenluloza ở 30°C đạt cực đại, giảm dần ở ngày 20 sau đó tương đối ổn định từ ngày 30 của quá trình ủ. Những ngày đầu, vi

Quá trình ủ tự nhiên luôn có sự biến đổi về hóa học cũng như sinh học trong đồng ủ. Đây là kết quả của những hoạt động kế tiếp nhau của nhiều nhóm vi sinh vật. Tùy từng thời kỳ khác nhau của đồng ủ mà từng nhóm vi sinh vật xuất hiện. Để nghiên cứu động học của đồng ủ chúng tôi trộn 1 kg lá mía (băm nhỏ với kích thước 100 x 20 mm) với 5 kg đất và xếp thành lớp chiều dày khoảng 5 cm. Chúng tôi tiến hành đồng thời 3 mẫu, mẫu 1 không bổ sung vi sinh vật vào (KC), mẫu 2 bổ sung 2% giống của công thức hỗn hợp VI: N1+N2+X2+V2 theo kết quả [3] (VI), mẫu 3 bổ sung 2% phân hữu cơ của xí nghiệp chế biến rác thải Cầu Diễn (PHC) và lên men rắn ở nhiệt độ 30°C. Cứ sau 10 ngày chúng tôi xác định lượng vi sinh vật tổng số ở 50°C, vi sinh vật tổng số ở 30°C, vi sinh vật phân giải xenluloza ở 50°C, vi sinh vật phân giải xenluloza ở



sinh vật ưa nhiệt (50°C) phát triển chậm hơn so với vi sinh vật ưa ấm (30°C), khi nhiệt độ tăng lên 38°C số lượng vi sinh vật ưa nhiệt đạt cực đại ở ngày thứ 20. Sau đó, nhiệt độ giảm dần xuống nhiệt độ môi trường, số lượng vi sinh vật ưa nhiệt cũng giảm. Quan sát số lượng vi sinh vật trong các đồng ủ đều thấy, số lượng vi sinh vật đạt cực đại ở 30°C bao giờ cũng lớn hơn ở 50°C. Như vậy ở 30°C thích hợp cho sự phát triển của nhiều loài vi sinh vật.

2. Thành phần hoá học của lá mía và sản phẩm sau khi ủ 1 tháng

Hoạt động của vi sinh vật đã dẫn đến những biến đổi về hoá học, lý học của nguyên liệu ban đầu. Các thông số như hàm lượng axit humic, tỷ lệ C/N, % chất hữu cơ,... là thước đo để đánh giá sự ổn định và chất lượng sản phẩm cũng như hiệu quả của quá trình ủ. Những biến đổi đó được thể hiện ở bảng 1:

Bảng 1. Một số thành phần hoá học của lá mía và sản phẩm sau khi ủ 1 tháng

Thành phần	Lá mía khô	Sản phẩm sau khi ủ 1 tháng		
		KC	VI	PHC
Axit humic (%)	0,28	0,30	0,40	0,34
Hàm lượng chất hữu cơ (%)	67,87	59,34	56,78	57,45
Tỷ lệ C/N	40	35	33	34

Sau 1 tháng ủ lá mía ta thấy hàm lượng axit humic trong đồng ủ đã tăng lên so với ban đầu đặc biệt mẫu có bổ sung chế phẩm VI hàm lượng axit humic tăng lên từ 0,28% lên tới 0,4% cao nhất so với các mẫu còn lại. Mặt khác, sau khi ủ, lá mía có màu nâu khác với nguyên liệu ban đầu là màu xanh chứng tỏ axit humic được tổng hợp trong quá trình ủ. Hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật đặc biệt là vi sinh vật phân giải hydratecarbon đã làm giảm khối lượng và kích thước của đồng ủ. Ở bảng 1 ta thấy ở mẫu có bổ sung chế phẩm VI hàm lượng chất hữu cơ giảm nhiều nhất từ 67,68% xuống 56,78%, còn ở mẫu kiểm chứng là 59,34%, mẫu có bổ sung phân hữu cơ là 57,45%. Một thông số quan trọng dùng để xác định độ ổn định của sản phẩm là tỷ lệ C/N. Trong thí nghiệm này tỷ lệ C/N đã giảm từ 40 xuống còn 33 ở mẫu có bổ sung công thức VI, còn 34 ở mẫu bổ sung phân hữu cơ và còn 35 ở mẫu không bổ sung vi sinh vật. Như vậy, tỷ lệ này không có sự khác biệt nhiều so các mẫu với nhau. Việc bổ sung các chủng vi sinh vật phân giải hợp chất ligno-xenluloza từ ngoài vào có ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm sau ủ. Do điều kiện về thời gian và kinh phí chúng tôi chỉ xác định sản phẩm của mẫu VI sau 3 tháng ủ.

3. Sản phẩm ủ sau 3 tháng

Chúng tôi đã tiến hành phân tích một số thành phần hoá học cơ bản của sản phẩm sau 3 tháng ủ khi sử dụng công thức VI như: hàm lượng nitơ tổng, hàm lượng phốt pho tổng, hàm lượng kali tổng, axit humic, hàm lượng cac bon hữu cơ và cấu trúc bề mặt bằng kính hiển vi điện tử quét. Kết quả thu được như sau:

Bảng 2. Một số thành phần hoá học của sản phẩm sau 3 tháng xử lý

STT	Chỉ tiêu phân tích (%)	Mẫu	
		Lá mía khô trước xử lý	Lá sau xử lý
1	Phot pho tổng số	0,231	0,730
2	Kali tổng số	1,296	0,400
3	Nitơ tổng số	0,990	0,980
4	Axit humic	0,280	0,654
5	Cacbon hữu cơ	39,37	23,51

Qua bảng 2, hàm lượng phốt pho tổng số ở mẫu lá sau xử lý có tăng so với mẫu trước xử lý, hàm lượng kali tổng số trong mẫu lá sau xử lý thấp rất nhiều so với mẫu trước xử lý, hàm lượng nitơ tổng số thay đổi không đáng kể.

Chất hữu cơ của sản phẩm càng ít chứng tỏ sự phân giải nguyên liệu ligno-xenluloza càng cao. Sau 3 tháng, cacbon hữu cơ giảm từ 39,37% xuống 23,51% tương đương chất hữu cơ giảm từ 67,87% xuống còn 40,53%. Nhiều nghiên cứu khác cũng cho rằng hàm lượng chất hữu cơ của nguyên liệu ban đầu thường từ 60 - 80%, sau thời gian 1- 3 tháng giảm xuống còn khoảng 40 - 60% [4]. Song song với quá trình phân giải chất hữu cơ trong quá trình ủ, có sự tổng hợp chất mùn, điển hình là tổng hợp axit humic. Kết quả ủ cho thấy, hàm lượng axit humic tăng từ 0,28% lên 0,654%.

Bên cạnh các phân tích hoá học, chúng tôi đã tiến hành chụp bề mặt cấu trúc của lá mía từng giai đoạn bằng kính hiển vi điện tử quét. Kết quả cho thấy rằng, ban đầu lá mía có cấu trúc các sợi đều đặn, chắc chắn và bề mặt phẳng đều, sau 1 tháng, 2 tháng, đặc biệt 3 tháng ta thấy có sự khác nhau rõ ràng, các liên kết ngang hầu như bị phá vỡ, là mía ròn dễ gãy vụn. Điều này khẳng định có sự phân huỷ lá mía theo những khoảng thời gian khác nhau.

Teg này của lui ở lý 134

IV. KẾT LUẬN

1. Lá mía khi ủ thành đống, mật độ vi sinh vật tổng cũng như vi sinh vật phân giải xenluloza ở 30°C lớn hơn 50°C. Đống ủ có bổ xung chế phẩm giống (công thức VI) có mật độ tế bào vi sinh vật cao hơn nhiều so với đống ủ bổ xung phân hữu cơ hay đống ủ lên men tự nhiên.

2. Sản phẩm sau khi ủ 1 tháng của mẫu có bổ xung chế phẩm VI có hàm lượng chất hữu cơ giảm nhiều nhất từ 67,68% xuống 56,78%, còn ở mẫu kiểm chứng là 59,34%, mẫu có bổ xung phân hữu cơ là 57,45%.

3. Sau 3 tháng ủ lá mía có sử dụng công thức VI, kết quả mẫu lá sau xử lý như sau: hàm lượng nitơ tổng số: 0,98%, hàm lượng photpho tổng số: 0,73%, hàm lượng kali tổng số: 0,4%, hàm lượng axit humic: 0,654%, tỷ lệ C/N: 24, hàm lượng chất hữu cơ giảm từ 67,87% xuống còn 40,53%.

RESULTS ON GROWTH, YIELD AND SEED QUALITY OF SOME PEANUT MUTANT VARIETIES IN CENTRAL VIET NAM

LE TIEN DUNG, *Hue University of Agric. and Forestry*, and

TRAN DINH LONG, *Vietnam Agricultural Science Institute*

I. BACKGROUND

Peanut is one of the highly economical value oil plants in Vietnam. Its importance is clearly determined in cropping patterns in agricultural systems in Central Vietnam. Recently, Vietnamese government imposed a policy for exporting peanut to many countries. For improving the productivity, the quality and the quantity of peanut, the breeding has to be set up.

Uses of nuclear techniques in mutation breeding are widespread in the world and in different regions. Number of varieties developed through induced mutation (by chemical/physical agents, or combining mutagen treatment with traditional breeding such as crossing, individual selection, line selection) rapidly increased, for example in 1960 there were only 7 varieties created by induced mutation, in 1980 was 500 and in 1990 the number reached to 1970 mutant varieties.

In order to form new peanut variety, the research on induced mutation by using radiation technique was carried out for many years. The promising mutant varieties were tested in some provinces in Central Vietnam. Through testing crops, the breeding work was focused on varieties with short growth duration (100 days), suitable to the requirements of structure 3 crops/ year. In addition, the agronomical characters: high yielding capacity, good nut quality of the selected varieties could meet the demand of consumers and export.

II. MATERIALS AND METHODS:

2.1. Materials:

- Two local peanut varieties: Sen (NgheAn) and Giay (Thua Thien Hue), and one imported variety: TQ (China).

2.2. Treatment Methods:

- Dried seeds
- Gamma ray Co^{60} with dose of 5, 10, 15, 20 krad in Hopital Danang city, Vietnam.
- Dose rate of 100 Rad/ minute

2.3. Implemented process:

- In Winter - Spring crop 1992 - 1993, dry seeds of Sen, Giay, TQ were irradiated and seeded directly in M1.
- In Summer - Autumn crop from 1993 to 1995, M2 - M5 individual plants were transplanted in lines.
- In Winter - Spring crop from 1995 - 1996 to 2001, promising varieties DT1, DT2, DL3, DL4, DL5, DL10, etc.... were planted comparison with control varieties.
- In 1999, results of research and development in mutant varieties were reported; two varieties: DT1, DT2 were certified as local by National Certified Variety Committee.

2.4. Study methods:

- M1- M3: selecting shorter days lines and higher yield
 - M4 - M5: research and assessment character of Mutant Varieties.
 - To M6: the best lines selected for yield trials and comparison with control varieties in provinces.
 - Morphological characteristics.
 - Factors determining yield capacity.
 - Determining nut quality: determining the total content of protein by Kjeldhal method and oil rate by Soclec.
 - Study DNA by Random Amplified Polymorphis DNA (RAPD) technique.
 - Others
- Data analysis by Biological Statistical method and computer analysis by Nguyen Dinh Hien.

III. RESULTS AND DISCUSSION:

3.1. Growth Duration:

The growth duration of peanut varieties was considered from sowing to harvesting. The variety nature decided growth duration. The results collected from some crop in several areas in Central provinces show in Table 1.

Table 1. Growth duration of varieties (days)

Varieties	Quang Tri		Thua Thien Hue		Quang Nam		
	W-S*	S- A**	W-S	S-A	W-S	S-S***	S-A
DT1	100	90	91	95	93	89	89
DT2	100	90	91	89	91	88	88
DL3	100	90	95	95	95	90	90
DL4	100	90	95	95	-	-	-
DL10	100	90	95	95	-	-	-
DL15	100	90	95	95	-	-	-
DL23	100	90	95	95	-	-	-
Con	100	90	105	100	101	83	90
Sen	115	110	120	110	102	100	-
TQ	-	-	130	-	-	-	-

* W-S: Winter-Spring crop; ** S-A: Summer-Autumn crop; *** S-S: Spring-Summer crop.

Data in Table 1 show that, growth duration of selected varieties (from 88 - 100 days) was shorter than the original variety (from 120 - 130 days) and similar to control varieties (from 83 - 105 days). Generally, the mutant varieties have earlier maturity, and are suitable for central and northern provincial conditions. These varieties can be cultivated 2 - 3 crops per year.

3.2. Some morphological characteristics of breeding varieties:

The external expressions such as biological and economical characteristics of varieties reflecting their genetic natures, were the traits which we could see, measure, weigh and count. These biological and economical characteristics show in Table 2.

Table 2. Some characteristics of varieties

Characteristics	DT1	DT2	DL3	DL23
One nut/pod (%)	11.0	8.0	4.4	9.5
Two nuts/pod(%)	89.0	92.0	32.4	34.3
Three nuts/pod (%)	0	0	63.2	56.2
Rate of nut/shell (%)	75 - 77	75 - 78	73 - 75	70 - 73
Pod figure	Normal	Normal	Chain	Broken
Pod waist	Lightly clear	Un clear	Un clear	Lightly clear
Pod nuance	Light	Light	Light	Light
Seed nuance	Lightly pink	Lightly pink	Lightly pink	Lightly pink
Seed figure	Peach seed-shaped	Peach seed-shaped	Peach seed-shaped	Peach seed-shaped
Leaf figure	Egg-shaped	Oval	Oval	Oval
Leaf color	Lightly green	Lightly green	Lightly green	Dark green
Stem form	Stolonial	Stolonial	Stolonial	Stolonial
Ramification	Dense	Dense	Dense	Dense
Stem size	Big, strong	Big, strong	Big, strong	Big, strong
Weight of 100 pods (gr)	129.2 - 135.4	122.5 - 137.4	149.2 - 172.4	144.2 - 155.8
Weight of 100 nuts (gr)	49,6 - 52.2	48,4 - 55.8	51.5 - 55.2	49.6 - 53.0
Number of leaves/main stem	19.2	20.5	19.7	20.1

The economical and morphological characteristics of breeding varieties are different; specially DL3, DL25 varieties have high three nuts/pod from 70 -75 % and weight of 100 pods:144.2-172.4 g;and weight 100 nuts:49.6-55.2 g.

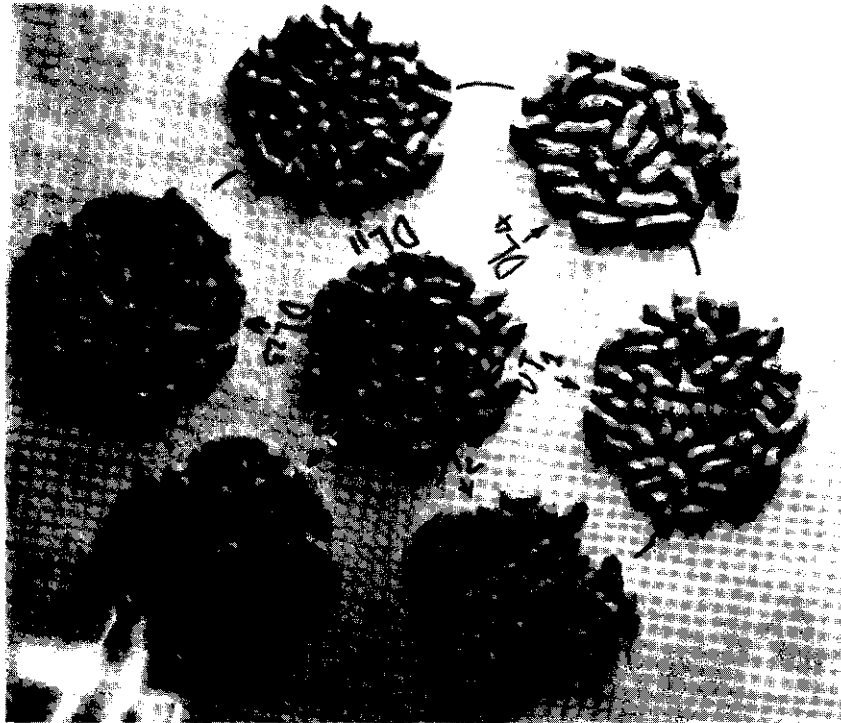


Fig 1. Some Pods type varieties

3.3. Pest and disease status in mutan varieties:

In breeding works, pest and disease potential is the one of the most considerate objects. It means that breeding works should interest to the tolerance, to the pest and disease of the selected variety.

In fact, pest and disease are able to effect to yield capacity, product quality. Chemical pesticides used in plant protection, can effect to product quality, lead to pollution, effecting directly to health of producers and consumers. Thus, we watched carefully for the pest - disease status in breeding varieties. Table 3.

Table 3. Pest and disease status in breeding varieties.

Varieties	Pest	Disease			
		Leaf spots (<i>Cercospora archidicola</i>)		Rust (<i>Puccinia arachidis</i>)	
		Frequency (%)	Level (%)	Frequency (%)	Level (%)
DT1	8.9	10.0	4.4	1.1	0.4
DT2	6.6	2.2	0.9	2.2	1.3
DL3	7.9	5.7	2.2	3.2	1.3
DL23	6.6	2.5	2.4	2.2	0.4
Control	5.5	7.9	2.2	4.4	2.2

The frequency of pest in almost varieties is low; highest in DT1 (8.9%) and lower in others (2.5 - 6.6 %).

The frequency of leaf spot in varieties DT1 is about 10 % and inconsiderable in others. The figure of ruts is inconsiderable in all studied varieties.

3.4. Uniformity level of some studied characters of breeding varieties.

The uniform level of some studied characters of breeding varieties was showed through Coefficient of variability (Cv%), Table 4.

Table 4. Coefficient of variability (Cv%) of some main studied characters

Characters Varieties	Plant height	No of pods/ plant	No of leaves/branch	No of primary braches	Length of basic internode
DT1	11.4	22.3	9.3	16.6	24.7
DT2	11.1	22.5	9.3	10.3	25.3
DL3	6.4	21.3	5.0	17.8	21.2
DL23	11.9	20.1	4.3	15.5	21.0
Contri	12.8	28.9	10.3	14.0	17.7

It showed that Cv % of characters of plant height, the amount of leaves/ branch, amount of primary branch is not much. But characters of the amount of pods/ plant, length of basic internode in all varieties are not uniform; they are change and can influence of the climate and environment on them.

3.5. Nut quality

Nut quality is the one of the most important object in breeding work of peanut, particularly oil and protein content. The results of the object were showed in Table 5.

Table 5. Nut quality of breeding varieties

Characters	DT1	DT2	DL3	DL23	Sen	Control
Oil (%)	46.4 - 50.1	46.2 - 50.5	47.5 - 52.5	46.2 - 52.6	47.8 - 49.95	46.1 - 50.7
Total Nitrogen (%)	4.2 - 4.4	4.3 - 4.7	4.3 - 4.8	4.2 - 4.7	3.8 - 4.2	3.1- 4.3
Protein (%)	26.3 - 27.5	26.9 - 29,4	24.5 - 27.	26.3 - 29.4	23.8 - 26.3	19.4 - 24.5

(The above figure was analyzed in Measuring quality Department of Quang Nam - DaNang province and laboratory of Department of Physiology and Biotechnisity, Hue Universty of Agriculture and Forestry)

The results Table 5 showed that oil and protein content of breeding varieties were higher than those of control. Mutat varieties have oil from 46.2 % to 52.6 %; protein from 26.3 % to 29.4 % while control is oil from 46.1 % to 50.7 %; protein from 19.4 % to 24.5 % and original (Sen) is oil from 47.8 % to 49.9 %; protein from 23.8 % to 26.3 % .

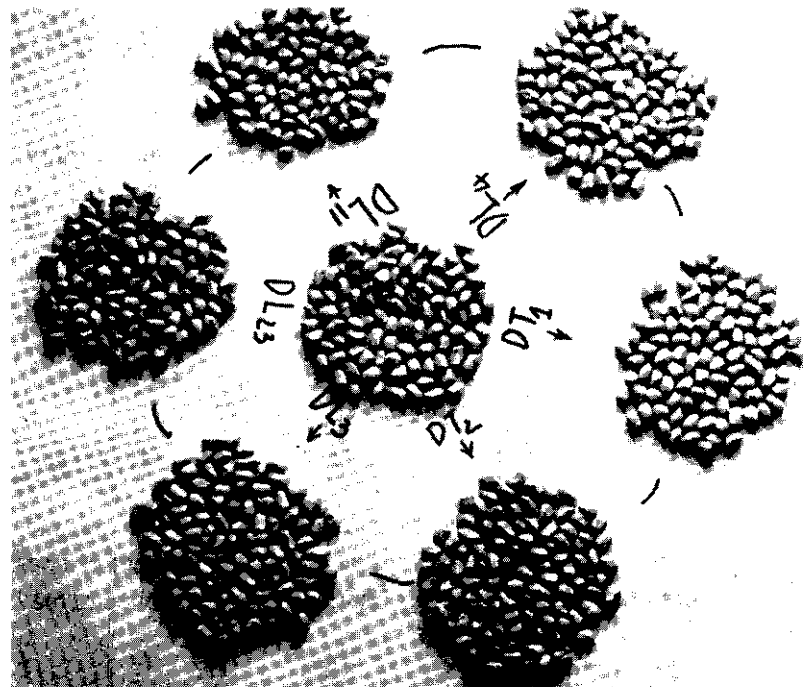


Fig2. Some nut type varieties

3.6. Yield capacity of breeding varieties.

Yield capacity is general figure, reflected growth and developing process of varieties. It is decided by genetic nature and environmental conditions. In the same experimental condition, the higher yielding variety is the better one; result in Table 6.

Table 6. Yield and some factors determining yield

Varieties	DT1	DT2	DL3	DL23	Sen	Control
Element						
N _o . of Pods/plant	20.3	26.2	15.5	21.7	14.6	16.4
N _o . of Solid pods/plant	17.6	23.3	13.6	20.1	14.6	16.4
Weight of 100 pods (gr)	127.1	137.4	149.2	144.2	134.9	116.8
Weight of 100 seeds (gr)	52.2	55.8	55.2	55.2	50.1	46.7
Percentage of solid pod (%)	86.7	88.9	87.7	92.6	82.9	75.0
Real yield (T/ha)	38.1	41.1	36.0	42.4	22.8	28.4
Yield compared with control (%)	134.2	144.7	128.6	149.3	80.3	100

LSD 0.05 % : 2.2 ; Cv (%) : 6.57

Data in Table 6 show that, in the same area, mutant varieties have some factors determining higher than the control and the original variety (Sen). Consequently mutant varieties have higher yielding than the control from 34.2 % to 49.3 % and the original dose in the same intensive cultivated conditions.

International Workshop on Biology, Hanoi - Vietnam 2-5 July 2001

For estimating the adapted potential of breeding varieties in each area, the experimental and test production in some places in the whole country were carried out. The result was reported in Table 7. It showed that with different ecological conditions in almost places, breeding varieties have shorter growth duration, their yielding capacity were similar to or higher than control.

Table 7. Yield capacity of peanut varieties in some places.

Province	DT1	DT2	Control	Cv (%)	LSD 0.05
Ha Noi	16.6	22.0	27.7	6.2	3.5
Vinh Phuc	27.0	25.3	25.2	4.4	6.5
Thai Nguyen	21.7	-	21.3	5.2	2.0
Hai Duong	-	34.5	22.3	14.4	9.1
Thanh Hoa	19.1	28.1	20.7	4.7	2.6
Nghe An	25.7	31.7	22.0	10.3	7.1
Ha Tinh	-	35.5	31.4	-	-
Quang Binh	31.8	35.5	28.3	6.5	2.2
Quang Tri	24.8	26.2	18.9		
Thua Thien Hue	41.2	43.3	31.5	6.7	4.1
Quang Nam	38.4	41.1	28.5	2.2	8.8
Quang Ngai	25.3	30.0	25.3	3.8	2.0
Binh Dinh	35.5	38.6	28.7		
Gia lai		36.5	30.2		
Can Tho	14.5		14.8		

3.8. DNA variation:

Random Amplified Polymorphis DNA (RAPD) technique was carried out to analyze DNA of DT1, DT2 and Sen (original variety). Five primers were used: N8, N10, N12, N15, N16. Order of sample: 1 = Sen; 2 = DT1; 3 = DT2.

The electrophoresis pattern was showed in Figure 2 and summarized in Table 8.

The results showed that DT1, DT2 have difference of base pair in genome from original variety (Sen). On the hand, they have different genetic nature.

Mutant varieties selected by using γ - ray with dose of 10 kR (DT1) and 15 kR (DT2), were significant variations.

Table 8. Summary of electrophoresis pattern using RAPD technique.

Varieties	Reaction 1 (N8)	Reaction 2 (N10)	Reaction 3 (N12)	Reaction 4 (N15)	Reaction 5 (N16)
Sen	PP:1 1 band \approx 0.7 Kb	PP:4 3 band \approx 2; 1; 0.6 Kb	PP:8 2 band \approx 0.8; 0.6 Kb	PP:11 3 band \approx 4.5; 0.8; 1.2Kb	PP:15 1 band \approx 1.2 Kb
DT1	PP:2 1 band \approx 1.05 Kb	PP:5 None	PP:9 2 band \approx 1.35; 0.6 Kb	PP:12 2 band \approx 0.8; 0.2 Kb	PP:16 1 band \approx 1.2 Kb
DT2	PP: 3 None	PP: 7 None	PP:10 1 band \approx 1.4 Kb	PP:13 None	PP:17 None

(PP: position in photograph)

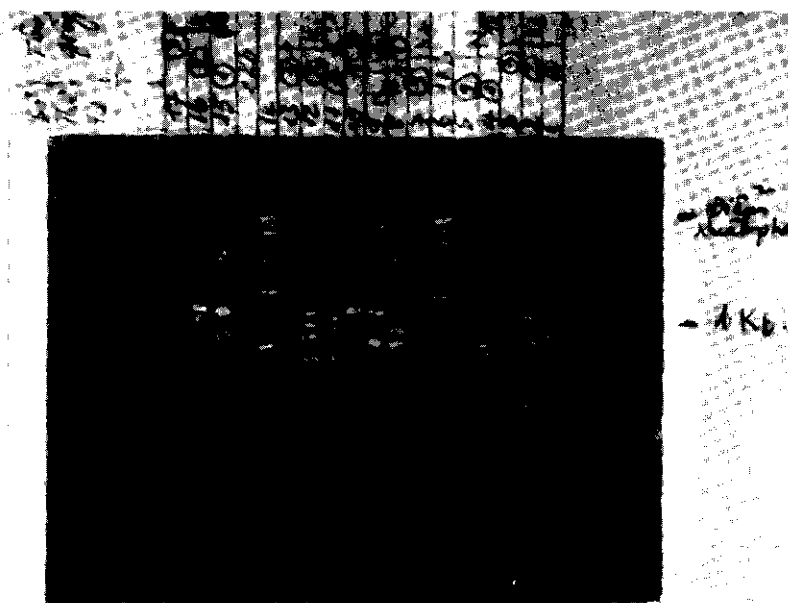


Fig 3. Electrophoresis pattern of analyzed DNA of DT1, DT2 and Sen varieties

IV. CONCLUSION AND SUGGESSTION

Conclusion: Breeding varieties have some characteristics as follows:

1. Early maturity suitable to structure of 3 crops/ year.
2. Higher yielding capacity than Sen and other varieties.
3. Rather good quality.
4. Different genetic nature.
5. DT1, DT2 were certified as local varieties by National Certified Variety Committee.

Suggestion: DT1, DT2 varieties could be planted in Central region and other areas in Vietnam.

REFERNCES

1. Nguyen Huu Dong et al. Present Status on cereal Mutation breeding in Vietnam. Worshop on Mutation Breeding Using Radiation Technology on Cereal Crops, 9 - 15 October, 1995. P. 139 - 144.
2. Nguyen Dinh Hien, STATH Software Programme, 1998.

3. Vo Hung, Le Tien Dung et al. Breeding peanut varieties by radiation mutation. Journal of Agriculture and Food Stuff Industry, 405: 99 - 101, March 1996.
4. Vo Hung, Le Tien Dung et al. Result of breeding some peanut lines adapted to ecological condition in Central provinces by radiation factor. Journal of Agriculture and Food Stuff Industry, 422: 330 - 331, August 1996.
5. Vo Hung, Le Tien Dung et al. Breeding peanut varieties by radiation mutation. Journal of Agriculture and Food Stuff Industry, 405: 99 - 101, March 1996.
6. Vo Hung, Le Tien Dung et al. Estimating some biological characteristic and yield capacity of some peanut varieties in Quangnam - Danang. Journal of Agriculture and Food Stuff Industry, 413: 466 - 467, November 1996.
7. Nguyen Thien Luong, Le Quy Tuong et al. Tested result of peanut varieties in to years 1996 - 1997. Journal of Agriculture and Food Stuff Industry, 431: 198 - 200, May 1998.
8. Lu Chih Chang, Extension bulletin, 13, January, 1972.
9. Maluszynski M., Bsigurbjornsson et al. Mutant varieties data band, Mutation Breeding Newsletter, 1991, 38: 16 - 21.
10. Maluszynski M., Bsigurbjornsson et al. Mutant varieties data band, Mutation Breeding Newsletter, 1992, 39: 14 - 17.

ABSTRACT

Peanut varieties DT1, DT2, DL3, DL25 received from induced mutation when treating Sen (Nghsan) variety with gamma ray dose 10 kR (DT1) and 15 kR (DT2, DL3, DL23), etc ... from 1992 - 1993. Mutant varieties DT1, DT2, DL3, DL25 have their genetic nature, however some characters differ from the original variety. The seed ratio, the grain quality (oil, protein ...) of DT1, DT2, DL3, DL23 are higher than Sen. These ones have shorter growth duration (88 - 100 days), earlier than the original variety. They are suitable to different areas in Vietnam, but in some provinces of Centre Vietnam, the yield is almost higher.

X

NHỮNG BIẾN ĐỔI TRONG QUÁ TRÌNH Ủ LÁ MÍA THÀNH PHÂN BÓN HỮU CƠ

NGUYỄN LAN HƯƠNG, LÊ VĂN NHƯỞNG, HOÀNG ĐÌNH HOÀ.

Viện Công nghệ Sinh học & Công nghệ Thực phẩm.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong sản xuất nông nghiệp, phân bón có vai trò quyết định về năng suất và chất lượng sản phẩm. Cùng với các loại phân bón hoá học, phân hữu cơ ngày càng góp phần thúc đẩy sự phát triển của nền nông nghiệp trên toàn cầu.

Một hình thức sản xuất phân hữu cơ rất phổ biến là ủ (composting), để phân huỷ hợp chất hữu cơ tự nhiên (chủ yếu là lignoxenuloza) bởi quần thể vi sinh vật (vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn,...) dưới tác động của độ ẩm, nhiệt độ và không khí tạo nên các sản phẩm cuối là chất mùn và chất dinh dưỡng mà cây trồng có thể hấp thụ được. Trong những phế thải của công nghiệp mía đường thì lá mía là hợp phần chiếm khối lượng lớn và khó xử lý. Để hiểu rõ hơn các thay đổi trong quá trình ủ lá mía, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sự biến động về vi sinh vật, sự thay đổi về các thành phần hoá học cũng như cấu trúc bề mặt của lá mía khi ủ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

- Lá mía ở vùng nguyên liệu Hà Tây thu hoạch năm 1999.
- Chúng giống vi sinh vật: Được phân lập từ các mẫu đất trồng mía, lá mía mục ở Hà Tây, Thanh Hoá, (N1, N2, X2, V2 theo kết quả [3]).

2 Phương pháp nghiên cứu

- Xác định tổng số tế bào vi sinh vật [1]
- Xác định tổng số tế bào vi sinh vật có khả năng phân giải xenuloza [1]
- Xác định hàm lượng axit humic [2]
- Xác định hàm lượng photpho tổng số [2]
- Xác định hàm lượng kali tổng số [2]
- Xác định hàm lượng nitơ tổng số theo phương pháp Keldal [2]
- Chụp ảnh cấu trúc lá mía bằng kính hiển vi điện tử quét.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

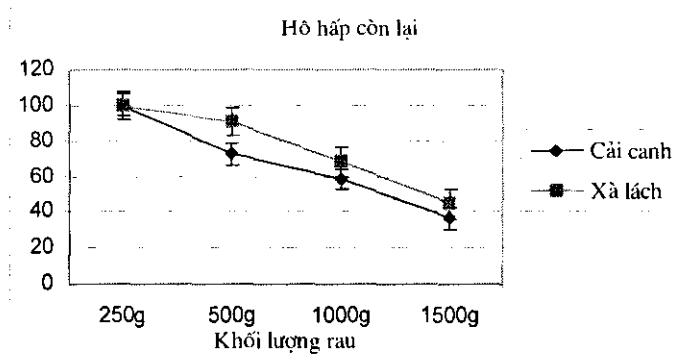
1 Sự biến động của vi sinh vật

30°C. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở các hình 1, 2.

Hình 1. Sự biến động của mật độ VSV ưa nhiệt trong các đồng ủ (VI, PHC, TN)

Hình 2. Sự biến động của mật độ VSV ưa ấm trong các đồng ủ (VI, PHC, TN)

gam) trong một thời gian như nhau (01 giờ). Kết quả được trình bày trên hình 3. Qua hình 3 có thể thấy rằng, hô hấp của rau chịu ảnh hưởng rất nhiều bởi thể tích bao gói chúng. Độ tương quan giữa hai đại lượng này của cải canh và xà lách tương ứng là -0,97 và -0,999 (xác định bằng hàm CORREL của EXCEL).



Hình 3: Ảnh hưởng của khối lượng rau lên hô hấp của cải canh

3.4- Thử nghiệm bảo quản

Chất hấp thụ ethylene được điều chế bằng cách đưa $KMnO_4$ lên chất mang có bề mặt riêng lớn (Zeolite), nhằm phát huy tối đa hiệu quả của hoạt chất.

Hình thức bảo quản như sau: Rau được đóng kín trong các túi LDPE, PP, trong mỗi túi có đặt các gói hấp thụ ethylene. Từ kết quả ở phần 3.3 chúng tôi chọn tỷ lệ khối lượng rau/thể tích bao gói là 0,5kg/2,0lít.

Các gói rau được sắp xếp vào trong hộp các-tông và đặt vào tủ lạnh có chế độ nhiệt là 4-8°C. Hộp các-tông ở đây có tác dụng để cho rau tiếp xúc với nhiệt độ thấp một cách từ từ nhằm hạn chế những rủi ro do choáng lạnh gây ra.

3.5- Kết quả sau hai tuần bảo quản

Sau 14 ngày bảo quản chất lượng cảm quan của hai loại rau như sau:

Rau cải canh đã xuất hiện một vài dấu hiệu úa vàng, tuy nhiên không có dấu hiệu thối hỏng. Ở những bao không đặt gói hấp thụ ethylene rau úa nhiều hơn so với loại có đặt túi hấp thụ ethylene. Rau được bao gói bằng bao bì LDPE (dày 50 μ m) có màu sắc và độ tươi cao hơn so với rau được bao gói bằng bao bì PP (dày 25 μ m).

Xà lách bao gói trong cả hai loại bao bì vẫn chưa có dấu hiệu già úa, rau vẫn xanh và tươi nguyên như ban đầu. Tuy nhiên loại không được đặt túi hấp thụ ethylene rau vẫn kém tươi hơn so với loại có đặt túi hấp thụ ethylene.

Để kiểm chứng cho kết quả cảm quan chúng tôi đã tiến hành xác định hàm lượng các sắc tố trong lá rau, kết quả được trình bày trên bảng 1.

Bản này của bài báo 120

Bảng 1: Kết quả phân tích sắc tố của rau sau 14 ngày bảo quản:

Loại rau	Cải canh				Xà lách			
	PP		LDPE		PP		LDPE	
Sắc tố (mg/g)	Chla	Chlb	Chla	Chlb	Chla	Chlb	Chla	Chlb
Không EAS	0,731	0,301	0,776	0,378	0,408	0,115	0,439	0,142
Có EAS	0,729	0,520	0,775	0,568	0,470	0,143	0,536	0,166

EAS: gói hấp thụ ethylene (ethylene absorbent sachet)

Kết quả trên bảng 1 cho thấy, việc có hoặc không có chất hấp thụ ethylene trong công thức bảo quản đã không ảnh hưởng lên hàm lượng Chlorophyll a của rau cải canh. Tuy nhiên chất hấp thụ ethylene lại có ảnh hưởng rõ rệt lên hàm lượng Chlorophyll b ở lá rau cải canh. Trên bảng còn cho thấy hàm lượng sắc tố ở rau cải canh bao gói bằng bao bì LDPE (dày 50µm) cao hơn hàm lượng sắc tố của cải canh bao gói bằng bao bì PP (dày 25µm). Có lẽ đây chính là nguyên nhân mà chúng tôi thấy rau cải canh bao gói trong bao bì PP úa hơn.

Đối với rau xà lách kết quả cho thấy khá rõ ràng rằng, chất hấp thụ ethylene có khả năng ngăn chặn sự phá huỷ Chla và Chlb. Xà lách bao gói trong bao bì LDPE có hàm lượng sắc tố cao hơn so với xà lách bao gói bằng bao bì PP.

IV. KẾT LUẬN

Nhiệt độ(4-8°C), độ ẩm tương đối (45%), khối lượng rau bao kín là các yếu tố có khả năng làm giảm hô hấp của rau cải canh (*B. juncea* L.) và xà lách (*L.sativa*).

Phương án bảo quản bằng bao bì LDPE dày 50µm, PP dày 25µm, ở nhiệt độ 4-8oC, kết hợp với chất hấp thụ ethylene tự điều chế đã giữ cải canh và xà lách trong hai tuần, trong khi đó đối chứng chỉ để được 2 ngày.

Sau hai tuần bảo quản thấy rằng, bao bì LDPE dày 50µm kết hợp với chất hấp thụ ethylene có khả năng giữ rau xanh hơn, tươi hơn so với các công thức còn lại (hàm lượng sắc tố xanh cao hơn so với đối chứng)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Andrew P. Medlicott et al. (1992), "Measurement of colour changes in ripening bananas and mangoes by instrumental, chemical, and visual assessments". Tropical Agriculture (Trinidad), vol. 69 (No 2): 165-172.
2. Ben-Yehoshua (1991), "New development in applying individual seal packaging for improved handling of fruits and vegetables". In the "Proceedings of International Citrus Symposium", Guangzhou, China, November, 1990. Beijing, International Academic Press, 757-771.

3. Geeson, J.D. (1989), "Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables". *Acta Horticulturae*, (258), 143-150.
4. Holden, M. (1976), "Chlorophylls", in "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Vol. 2 (Ed. By Goodwin, T.W.), London, Academic Press, pp 1-37.
5. Karder et. al. (1989), "Modified Atmosphere Packgng of Fruits and Vegetables". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (28), 1-30.
6. Norman, T.J. Bailey (Editor). (1997), "Statistical methods in biology". Cambridge University Press
7. Shirazi, A. and Cameron, A.C. (1992), "Controlling relative humidity in modified atmosphere packages of tomato fruit". *HortScience*, (27), 336-339.

BÁO CÁO TÓM TẮT

Nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình bảo quản rau cải canh và xà lách đã được nghiên cứu, bao gồm: nhiệt độ, độ ẩm tương đối, tỷ lệ giữa thể tích bao gói với khối lượng rau, chất hấp phụ ethylene, bao bì bao gói. Trong số các yếu tố nghiên cứu, nhiệt độ, độ ẩm tương đối và tỷ lệ giữa thể tích bao gói với khối lượng rau đã cho thấy là có ảnh hưởng rất lớn đến hô hấp của rau. Ngoài ra hô hấp của rau còn giảm theo thời gian bao kín.

Chất hấp phụ ethylene tự điều chế đã cho thấy là có khả năng làm giảm quá trình phân huỷ chất màu chlorophyll.

Nhìn chung hai loại bao bì sử dụng LDPE (dày 50 μ m) và PP (dày 25 μ m) đều có khả năng sử dụng trong bảo quản hai loại rau nghiên cứu, tuy nhiên bao LDPE cho rau có tươi cao hơn.

Abstract

FACTORS INFLUENCE PRESERVATION OF LACTUCA SATIVA AND BRASSICA JUNCEA L.

LE TIEN DUNG β NGUYEN KIM VU β , VU VAN VU α

β Post-harvest Technology Institute
 α Hanoi University of Science,
Vietnam National University, Hanoi

Various factors influence the respiration rate of the two vegetables has been investigated. Temperature, relative humidity, the ratio between package volume and amount of vegetables packed have shown to have great effect on the respiration rate of the two vegetables. The respiration rate of vegetables also reduced gradually during ait-tight process.

Polyethylene (50 μ m thickness), Polypropylene (25 μ m thickness) bags with Ethylene absorbent have shown to be able to preserve the two vegetables at 4-8oC for two weeks.

Further studies are being carried out on modeling for prediction of shef-life of the vegetables.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng và các cộng sự. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập 2, NXB KHKT HN, 1976.
2. Viện thổ nhưỡng Nông hoá. Sổ tay phân tích đất, nước, phân bón và cây trồng, NXB nông nghiệp, 1998
3. Nguyễn Lan Hương, Lê Văn Nhung, Hoàng Đình Hoà. Tuyển chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính xenlulaza cao và nghiên cứu động học của quá trình phân huỷ lá mía. Tạp chí Khoa học và Công nghệ các trường Đại học kỹ thuật 23+24, tr 50-54, 2000.
4. Ganer. A. C. Microbial decomposition of organic matter and humus in soil and compost. FAO/ UNEP “ Technology composting”, tr 119 - 127, 1980.
5. Rao N.S.S. Biofertilizer in agriculture. Oxford and IBH publishing Co. PVT. Ltd New Delhi, tr 161,1988.

SUMMARY

CHANGES OF SUGAR CANE LEAVES COMPOSTED TO ORGANIC FERTILIZER

To carry out composting sugar cane leaves with 3 samples: none microorganism, microorganism and organic fertilizer addition. Determined the change of humic acid (H), organic (O), C/N rate (R), total phosphor (P), potassium (K), nitrogen (N) contents after 3 months composting. Results of experiments are determinated as N: 0,98%, P:0,73%, K: 0,4%, H: 0,654%, R: 24, O: 40,53%.

ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ NẤM MEN GIEO CẤY ĐẾN CÁC ĐẶC TÍNH KỸ THUẬT CỦA NẤM MEN BIA

HOỒ PHÚ HÀ, HOÀNG ĐÌNH HOÀ, NGUYỄN THỊ HIỀN, VÔ THỊ LÝ

Đại học Bách khoa Hà nội

I. MỞ ĐẦU

Trong quá trình lên men bia, việc tái sử dụng nấm men có một ý nghĩa rất quan trọng. Sử dụng men sữa có thể giảm bớt công đoạn nhân giống nấm men để tạo sinh khối ban đầu, giảm lượng nguyên liệu (chất khô) tiêu hao cho quá trình tạo sinh khối. Nấm men tái sử dụng đã thích nghi, ngay với môi trường và điều kiện lên men, chúng luôn ở trạng thái hoạt động cho nên quá trình lên men được rút ngắn. Điều này giúp cho các nhà sản xuất rút ngắn được chu kỳ sản xuất, giảm bớt chi phí cho nguyên liệu cũng như nhân công. Hơn nữa chất lượng sản phẩm cũng được ổn định, đó chính là vấn đề đang được quan tâm hàng đầu hiện nay.

Tuy vậy, qua các thế hệ tái sử dụng, các đặc tính kỹ thuật của nấm men sẽ dần bị suy giảm. Vấn đề đặt ra là làm thế nào để kéo dài thời gian tái sử dụng mà vẫn ổn định được các đặc tính kỹ thuật của nấm men. Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự ổn định này, đó là thành phần dinh dưỡng của môi trường (thành phần và nồng độ đường, thành phần và nồng độ đạm), điều kiện lên men, phương thức cung cấp oxy, trong đó lượng nấm men gieo cấy ban đầu cũng là một yếu tố quan trọng.

Lượng nấm men gieo cấy ban đầu ảnh hưởng đến thời gian đạt cân bằng động giữa quần thể nấm men và môi trường. Nếu lượng nấm men gieo cấy ít thì thời gian lên men sẽ kéo dài do phải tạo lượng sinh khối cần thiết. Nếu lượng nấm men gieo cấy nhiều quá cũng sẽ ảnh hưởng đến trạng thái sinh lý của nấm men và mùi vị của bia thành phẩm. Do đó phải tìm được lượng men gieo cấy thích hợp để đảm bảo qua trình lên men diễn ra bình thường, chất lượng sản phẩm bảo đảm và các đặc tính kỹ thuật của nấm men bị suy giảm ít nhất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- + Malt đại mạch của Pháp
- + Nấm men *Saccharomyces carlsbergensis* SP

2. Các phương pháp xác định

- + Xác định nồng độ chất khô: Bằng chiết quang kế
- + Xác định hàm lượng axit, este: Phương pháp chuẩn độ bằng NaOH
- + Xác định mật độ tế bào, tỷ lệ tế bào chết, nảy chồi: Buồng đếm Thoma
- + Xác định hàm lượng cồn: Phương pháp chưng cất, cân tỷ trọng
- + Xác định khả năng kết lắng: Thông qua lượng nấm men kết lắng sau 10 phút, ml/10 ml dịch
- + Xác định hàm lượng diacetyl: Phương pháp so màu

1) Các bước tiến hành thực nghiệm

+ Chuẩn bị dịch đường: Dịch đường được chế biến từ malt đại mạch qua các giai đoạn nhiệt độ 52 °C, 65°C và 75°C là như nhau với tất cả các mẫu.

+ Lên men dịch đường: Các mẫu dịch đường được điều chỉnh đến nồng độ chất khô 10Bx và đem lên men ở 10-12°C với lượng men giống ban đầu là 10±2 triệu tế bào/ml; 20±2 triệu tế bào/ml; 30±2 triệu tế bào/ml ký hiệu lần lượt là mẫu I, mẫu II, mẫu III. Theo dõi mật độ tế bào, tỷ lệ tế bào nảy chồi và nồng độ chất khô 8 tiếng một lần.

+ Kết thúc quá trình lên men, bia non được chuyển sang lên men phụ ở 1-3°C trong 10 ngày. Men sữa thu được một phần đưa vào lên men tiếp lần sau, một phần đem xác định trạng thái sinh lý, năng lực lên men, khả năng kết lắng. Bia thu được đem xác định hàm lượng cồn và lượng đường sót, diacetyl, axit, este

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Mật độ tế bào lơ lửng trong dịch lên men

Mật độ tế bào trong dịch lên men là đại lượng quan trọng nhất, cho ta một hình dung tổng thể về tiến trình lên men. Thời điểm đạt mật độ cực đại và giá trị cực đại của mật độ là hai thông số thể hiện rõ nét nhất về trạng thái sinh lý của nấm men.

Trên bảng 1 đã trình bày mật độ tế bào cực đại và thời điểm đạt mật độ cực đại của các mẫu ở các thế hệ.

Bảng 1: Mật độ tế bào cực đại và thời điểm đạt mật độ cực đại của các mẫu ở các thế hệ

Thế hệ nấm men	Mẫu I		Mẫu II		Mẫu III	
	t, h	m, 10 ⁶ tb/ml	t, h	m, 10 ⁶ tb/ml	t, h	m, 10 ⁶ tb/ml
Men giống	64	54,0	56	57,5	56	58,5
1	56	55,0	32	59,7	32	56,7
2	24	60,2	24	61,9	24	62,9
3	32	63,2	32	63,8	24	58,8
4	32	55,0	32	57,0	24	62,8
5	40	50,3	32	52,9	32	57,6
6	40	45,7	32	50,8	32	47,9
7	32	30,0	32	40,0	24	42,1

t- thời gian lên men, h; m- mật độ cực đại, a x 10⁶ tb/ml

Qua bảng trên cho thấy nấm men hoạt động mạnh nhất ở năm thế hệ đầu, bắt đầu giảm từ thế hệ thứ 6 và giảm mạnh ở thế hệ 7, rõ rệt nhất là đối với mẫu I.

2. Độ lên men và nồng độ cồn tạo thành

Đối với nấm men, khả năng lên men triệt để cũng như hàm lượng cồn tạo thành là một tiêu chuẩn khá quan trọng để đánh giá chất lượng nấm men. Sau khi lên men, chúng tôi xác định hàm lượng cồn, đo nồng độ chất khô và từ đó tính ra độ lên men biểu kiến. Kết quả nghiên cứu đã được trình bày ở bảng 2

Bảng 2: Độ lên men và hàm lượng cồn ở các mẫu qua các thế hệ nấm men

Thế hệ nấm men	Hàm lượng cồn, %V			Độ lên men biểu kiến, %		
	Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III	Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III
Men giống	2,50	2,70	2,70	60	62	62
1	2,50	2,70	2,70	60	61	62
2	2,70	2,70	2,70	61	62	62
3	2,43	2,43	2,57	58	58	60
4	2,43	2,57	2,57	58	60	60
5	2,43	2,70	2,70	58	62	62
6	2,43	2,43	2,43	57	58	57
7	2,37	2,37	2,30	50	51	49

Như vậy nấm men lên men mạnh nhất ở 6 thế hệ đầu, đến thế hệ 7 giảm rõ rệt. Từ thế hệ thứ 3 trở đi, mẫu I lên men kém triệt để hơn các mẫu còn lại.

3. Khả năng kết lắng của nấm men

Khả năng kết lắng của nấm men có ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng sản phẩm, nó quyết định giải pháp công nghệ nhằm tách nấm men ra khỏi bia non. Mặt khác nấm men lắng chặt và chắc cũng chứng tỏ nấm men còn khoẻ và có thể tái sử dụng được. Khả năng kết lắng được thể hiện ở bảng 3

Bảng 3: Khả năng kết lắng của nấm men

Thế hệ nấm men	Thể tích nấm men lắng được sau 10 phút, ml		
	Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III
1	3,6	2,9	2,7
2	3,2	1,2	2,6
3	3,0	2,5	2,0
4	3,7	3,4	1,7
5	4,9	4,5	2,9
6	5,2	5,0	5,5
7	6,0	5,9	6,3

Bảng trên cho thấy khả năng kết lắng của nấm men giảm dần theo thời gian tái sử dụng, các thế hệ từ 1-5 kết lắng tốt nhất phù hợp với kết quả theo dõi được trong quá trình lên men. Trong cùng một thế hệ mẫu I có khả năng kết lắng kém hơn các mẫu khác

4. Trạng thái sinh lý của nấm men sữa thu được

Nấm men thu được sau quá trình lên men được đem xác định tỷ lệ tế bào chết và tế bào nảy chồi

Bảng 4: Tỷ lệ tế bào nảy chồi và chết

Thế hệ nấm men	Tỷ lệ tế bào nảy chồi, %			Tỷ lệ tế bào chết		
	Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III	Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III
Men giống	7,3	7,3	7,3	1,2	1,2	1,2
1	7,5	6,4	6,1	3,0	3,4	3,3
2	8,1	9,5	7,2	4,2	3,9	4,2
3	17,0	12,3	11,8	3,9	4,2	4,0
4	9,6	6,6	5,4	4,5	4,7	5,0
5	8,3	6,3	5,0	4,7	5,0	5,8
6	5,6	5,8	4,5	5,6	5,3	6,4
7	3,7	5,4	3,4	6,7	6,3	7,5

Nhìn chung trạng thái sinh lý của nấm kém dần qua các thế hệ. Nấm men nảy chồi nhiều nhất ở thế hệ thứ 3 và tỷ lệ nảy chồi giảm mạnh ở thế hệ 7. Tuy nhiên trạng thái sinh lý ở mẫu II là ít thay đổi nhất.

5. Một số chỉ tiêu hoá học của bia

Bảng 5.1. Hàm lượng diaxetyl và các dixeton khác

Thế hệ nấm men	Hàm lượng diaxetyl và các dixeton khác, mg/l		
	Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III
Men giống	1,17	1,19	0,82
1	0,74	0,76	0,66
2	0,72	0,72	0,69
3	0,72	0,55	0,53
4	1,19	1,02	0,60
5	1,26	1,16	1,08
6	1,28	1,05	1,04
7	1,06	1,06	1,00

Bảng trên cho thấy hàm lượng diaxetyl trong bia giảm khi lượng nấm men gieo cấy tăng. Hàm lượng này nhỏ nhất khi lên men với nấm men thế hệ 1,2,3.

Bảng 5.2. Hàm lượng axit và este

Thế hệ nấm men	Hàm lượng axit, mg/l			Hàm lượng este, mg/l		
	Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III	Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III
Men giống	321	321	288	48,4	39,6	44,0
1	345	330	330	88,0	88,0	79,2
2	372	372	330	102,2	101,2	74,8
3	400	345	375	79,2	66,0	52,8
4	378	330	342	57,0	48,4	35,2
5	220	224	224	46,4	35,2	30,1
6	330	312	300	74,8	74,8	70,4
7	210	224	210	44,0	48,4	39,6

Qua bảng trên thấy rằng hàm lượng axit và este thay đổi qua các thế hệ theo quy luật không rõ ràng nhưng nhìn chung lượng nấm men gieo cấy tăng thì hàm lượng các sản phẩm này giảm.

Nhìn chung các số liệu cho thấy trạng thái sinh lý và khả năng lên men của mẫu II và III ổn định hơn so với nấm men mẫu I, tuy nhiên theo đánh giá sơ bộ về cảm quan thấy rằng bia mẫu III có hương vị kém hơn, điều này cũng phù hợp với số liệu về hàm lượng este chung trong bia (bảng 5.2)

IV. KẾT LUẬN

- Lượng nấm men gieo cấy ban đầu có ảnh hưởng rõ rệt đến các đặc tính kỹ thuật của nấm men bia

- So với lượng nấm men gieo cấy ban đầu 10 triệu và 30 triệu tế bào/ml thì với lượng nấm men gieo cấy 20 triệu tế bào/ml các đặc tính kỹ thuật của nấm men bia là ổn định nhất

TÓM TẮT

Đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nấm men gieo cấy ban đầu đến các đặc tính công nghệ của nấm men bia như: mật độ tế bào lơ lửng, khả năng lên men, khả năng kết lắng, trạng thái sinh lý của tế bào, một số chỉ tiêu của bia thành phẩm. Với nồng độ nấm men gieo cấy 20 triệu tế bào/ml các thông số trên thể hiện tốt nhất và tốc độ suy giảm các đặc tính kỹ thuật của nấm men bia được hạn chế thấp nhất

SUMMARY

Influence of pitching rate on technological characteristics of brewer's yeast (cell concentration, fermentation rate, flocculation capacity, physiological state of yeast cells,...) has been studied. The result shows that with pitching rate of 20 millions cells/ml the degeneration of yeast is maximum limited.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Đình Hoà
2. Công nghệ sản xuất malt và bia.
3. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật 1998
4. Jean-Paul Laurent
5. Biotechnologie des levures
6. Maison Paris-Milan-Barcelon-Bonn 1991
7. M. Bouix, J.Y-Leveau
8. Microbiologie alimentaire. Les levures.
9. Tec & Doc Lavoisier 1991
10. J. De Clerck
11. Cours de brasserie. Volume 2. Methode control de fabrication.
12. Editeur Université de Louvain. Belgique 1963.

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG *AZOTOBACTER* CHO SẢN XUẤT PHÂN BÓN VI SINH VẬT

NGUYỄN THU HÀ, NGUYỄN NGỌC QUYÊN - viện KHKTNNVN

VŨ THỊ MINH ĐỨC - Trường ĐHQG Hà Nội

I/ ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiệu quả tốt của việc xử lý hạt với huyền phù dịch *Azotobacter* trước khi gieo trồng đã được ghi nhận hàng chục năm trước đây. Ngoài khả năng cố định nitơ, *Azotobacter* còn có khả năng hình thành các vitamin (B_1 , B_2 , piridoxin, nicotinic, xianocobalamin v.v...), các chất kích thích sinh trưởng thực vật (axit indolacetic, axit gibberellic).

Việc nghiên cứu để tận dụng khả năng cố định nitơ và khả năng kích thích sinh trưởng thực vật của vi khuẩn *Azotobacter* nhằm góp phần tăng năng suất cây trồng là một hướng thiết thực. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành phân lập, tuyển chọn chủng *Azotobacter* cho sản xuất phân bón vi sinh vật.

II/ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập chủng vi sinh vật từ đất:

Đất được thu thập từ các vùng chuyên canh rau, màu, sau đó chia làm 2 lô: lô 1: để ướt, bảo quản trong tủ lạnh; lô 2: hong khô ở nhiệt độ phòng, nghiền mịn. Sau đó cho 1 g đất khô (hoặc 2 g đất ướt) vào bình chứa 50ml môi trường dịch thể Burk cải tiến. Sau 1 tuần lấy 1 vòng que cấy lớp váng mỏng trên bề mặt dịch thể cấy ria lên đĩa thạch môi trường Burk, ủ 30°C trong 3 ngày. Thu nhận khuẩn lạc lần đầu. Tiếp tục làm sạch nhiều lần để thu được khuẩn lạc thuần khiết.

2.2. Xác định đặc điểm, hình thái khuẩn lạc, tế bào: theo Tchan và Peter (1984)

3.2. Xác định ảnh hưởng của các chất kháng sinh tới sự phát triển của các chủng vi sinh vật phân lập:

Bằng cách xác định vòng ức chế sự phát triển của vi sinh vật bằng phương pháp đục lỗ.

2.4. Xác định IAA thô:

Khả năng tổng hợp IAA thô của các chủng vi sinh vật được xác định theo phương pháp Salkowski cải tiến.

-Cấy chủng vi sinh vật vào bình tam giác chứa môi trường Burk, có bổ sung Tryptophan 0,1% đã khử trùng, nuôi cấy lắc (220 vòng/phút) ở nhiệt độ 30°C trong 5 ngày.

-Lấy 2ml dịch vi sinh vật đã li tâm loại bỏ tế bào, bổ sung thêm 8ml thuốc thử Salkowski cải tiến, lắc đều. Theo Misra và Kauskik. IAA tác dụng với thuốc thử Salkowski cải tiến sẽ cho màu hồng nhạt đến đỏ phụ thuộc hàm lượng IAA được sinh ra. Hàm lượng IAA thô được xác định theo phương pháp so màu ở 530nm với đồ thị chuẩn IAA.

2.5. Xác định khả năng cố định nitơ:

Đo hoạt tính nitrogenaza bằng phương pháp khử axetylen trên máy sắc ký khí PYE UNICAM series 204 chromatograp (Anh).

2.6. Xác định ảnh hưởng của dịch vi sinh vật đối với mầm ngô:

Hạt giống ngô tẻ P.11 và ngô lai ĐK.888 được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 4 phút. Rửa lại bằng nước cất vô trùng nhiều lần. Ngâm hạt trong nước cất vô trùng từ 3 đến 4 giờ. Sau đó ủ hạt với dịch vi sinh vật đã li tâm loại bỏ tế bào (pha loãng tỷ lệ 5%) ở 30 °C trong 2 ngày.

2.7. Xác định ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật phân lập đối với rau cải trắng:

Thí nghiệm được tiến hành trong 2 vụ Đông xuân và Hè thu 1998 trong chậu 7kg đất/chậu. Nền phân bón: 40 N : 80 P₂O₅ : 40 K₂O. Công thức thí nghiệm được bón thêm 10⁷ tế bào vi sinh vật/chậu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau 45 ngày trồng, thu hoạch, đánh giá theo các chỉ tiêu: số lá/chậu, khối lượng tươi thân lá, cao cây, % vật chất khô, vitamin C, đường tổng số và hàm lượng NO₃⁻.

III/ KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

2.1. Phân lập chủng vi sinh vật từ đất:

Sau khi phân lập thu được kết quả: 13/38 mẫu đất khô và 6/12 mẫu đất ướt đã phát hiện được có chứa *Azotobacter*. Các chủng thu nhận từ đất khô dễ tồn tại trong điều kiện nuôi cấy nhân tạo. Các chủng phân lập từ đất ướt kém ổn định hơn, một số bị chết sau thời gian bảo quản trong ống môi trường. Do có khả năng hình thành cyst nên *Azotobacter* có thể chống chịu khô hạn, vì vậy để tăng cường tính chọn lọc, việc làm khô đất ở nhiệt độ phòng trước khi phân lập *Azotobacter* là cần thiết.

Qua phân tích pH của các mẫu đất có chứa *Azotobacter* cho thấy các mẫu đất này có độ pH trong khoảng 5,15 - 7,75. Một số mẫu đất khác có độ pH thấp hơn không phát hiện thấy *Azotobacter*. Điều này phù hợp với những nghiên cứu trước đây là *Azotobacter* thường được phát hiện ở đất có pH từ hơi axit đến kiềm.

Bảng 1

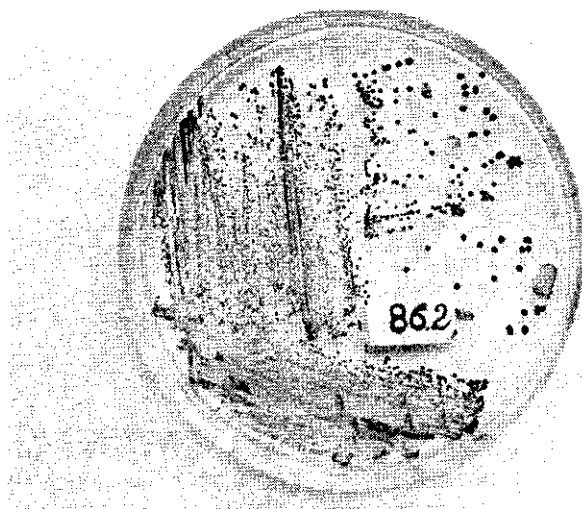
pH của các mẫu đất phát hiện có chứa *Azotobacter*

stt	Mẫu đất	pH	stt	mẫu đất	pH
1	1	6,35	10	20	6,45
2	2	7,25	11	21	6,35
3	4	6,85	12	24	6,70
4	6	5,95	13	25	6,70
5	8	7,75	14	26	6,60
6	9	7,05	15	28	6,15
7	11	5,95	16	32	7,45
8	18	6,35	17	35	5,15
9	19	6,45	18	36	5,40

Từ 18 chủng vi sinh vật phân lập được, chúng tôi chọn 3 chủng vi sinh vật phát triển ổn định, có sinh khối mạnh nhất cho các nghiên cứu tiếp theo. Đồng thời, chúng tôi cũng sử

dụng chủng AT.19 (chủng nhập nội, đang sử dụng cho sản xuất chế phẩm vi sinh vật) làm chủng đối chứng.

2.2. Đặc điểm, hình thái khuẩn lạc, tế bào của các chủng vi sinh vật:



Ảnh: Hình dạng khuẩn lạc chủng 86.2 sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường Burk

Bảng 2

Đặc điểm, hình thái khuẩn lạc, tế bào của các chủng vi sinh vật

ĐẶC ĐIỂM	CHỦNG VI SINH VẬT		
	86.2	76.6	20.2
Nguồn gốc	Đất số 4	Đất số 20	Đất số 9
Hình dạng khuẩn lạc	Lúc còn non có màu trắng đục, lỏng. Khi già ngả màu đen, không tiết sắc tố ra môi trường	Lúc còn non có màu trắng đục, lỏng. Khi già ngả màu đen, không tiết sắc tố ra môi trường	Lúc còn non có màu trắng đục. Khi già ngả màu vàng, không tiết sắc tố ra môi trường
Hình dạng tế bào	Khi còn non có dạng tròn, 2 tế bào thường dính liền nhau thành hình số 8	Khi còn non có dạng tròn, thường 2-3 tế bào dính liền nhau	Khi còn non có dạng hình trứng, 2 tế bào thường dính liền nhau thành hình số 8
Khả năng di chuyển	Di chuyển chậm	Di chuyển chậm	Không di chuyển
Hình thành cyst	+	+	+
Tạo homopolisaccarit khuếch tán	+	+	+
Phân huỷ tinh bột	+	+	+ -

2.3. Xác định ảnh hưởng của các chất kháng sinh tới sự phát triển của các chủng vi sinh vật:

Một trong các tiêu chuẩn để đánh giá tính cạnh tranh của các vi sinh vật là sức đề kháng của chúng đối với các chất kháng sinh được tiết ra bởi các vi sinh vật sống lân cận.

Bảng 3

Ảnh hưởng của các chất kháng sinh tới sự phát triển của các chủng vi sinh vật

S T T	ĐK VÒNG ỨC CHẾ (cm) CHÙNG VI SINH VẬT	TETRAXICLIN			STREPTOMIXIN		
		100 µg/ml	1,0 µg/ml	0,5 µg/ml	100 µg/ml	1,0 µg/ml	0,5 µg/ml
1	86.2	5,6	0,6	0,2	3,4	1,4	0,5
2	76.6	5,8	1,0	0,2	4,2	1,0	0,5
3	20.2	4,8	1,2	0,2	4,0	1,2	0,4

Qua bảng 3 cho thấy các chủng 86.2, 76.6, 20.2 có độ mẫn cảm với streptomixin và tetraxiclin ở các nồng độ khác nhau là khác nhau. Điều này đúng theo nghiên cứu của Tchan và Peter (1984): độ mẫn cảm của *Azotobacter* với streptomixin và tetraxiclin thay đổi tùy từng loài.

3.4. Khả năng tổng hợp IAA thô của các chủng vi sinh vật:

Bảng 4

Khả năng tổng hợp IAA thô của các chủng vi sinh vật

STT	TÊN CHÙNG VI SINH VẬT	HÀM LƯỢNG IAA THÔ (µg/ml)
1	86.2	7,57
2	76.6	9,50
3	20.2	5,73
4	AT.19 (Chủng đối chứng)	7,13
	CV (%)	8,3
	LSD _{0,05}	1,24

Qua bảng 4 cho thấy, các chủng 86.2, 76.6, 20.2 đều có khả năng tổng hợp IAA thô. Trong đó chủng 86.2 và 76.6 có hàm lượng IAA thô được tổng hợp tăng từ 6,17 đến 33,24% so với chủng AT.19 (chủng đối chứng).

3.5. Khả năng cố định nitơ của các chủng vi sinh vật:

Các chủng 86.2, 76.6, 20.2 đều có khả năng khử axetylen cao hơn chủng AT.19 (D/C) từ 17,10 đến 56,78 nmol C₂H₄/ml.h (13,5 - 45,49).

3.6. Ảnh hưởng của dịch vịnh vật đến sự nảy mầm của hạt ngô:

Các chủng 86.2, 76.6, 20.2 đều có khả năng kích thích sự nảy mầm của hạt ngô, tăng từ 8,57 đến 14,11% (ngô lai ĐK.888) và 5,71% (ngô tẻ P.11) so với đối chứng (không nhiễm vi sinh vật).

3.7. Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật đối với rau cải trắng:

Công thức nhiễm chủng 86.2, 76.6, 20.2 ở cả hai vụ (xuân và hè thu 1998) đều cho năng suất rau cao hơn đối chứng (không nhiễm vi sinh vật) và tương đương với chủng AT.19 (D/C).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Đã phân lập được 18 chủng Azotobacter từ đất rau, màu. Trong đó 3 chủng 86.2, 76.6 và 20.2 có khả năng tổng hợp IAA thô (tăng 7,14 - 42,86% so với chủng đối chứng), khả năng khử axetylen (tăng 13,3 - 50,39% so với chủng đối chứng), kích thích sự nảy mầm của hạt ngô, tăng năng suất và chất lượng rau .
2. Cả 3 chủng 86.2, 76.6 và 20.2 có triển vọng dùng để sản xuất phân bón vỉnh vật,cần sớm được thí nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của chúng trên diện rộng.

ABSTRACT

ISOLATION AND SELECTION AZOTOBACTER FOR BIOFERTILYZER PRODUCTION

NGUYEN THU HA, NGUYEN NGOC QUYEN-*Vietnam Agricultural science institute*

VU THI MINH DUC-*Hanoi University of science, Vietnam national university*

18 Azotobacter strains isolated from 50 - vegetable and rice soil samples in the North Vietnam. Azotobacter strains was found in collected samples that pH from slightly acid to slightly alkaline (5.15 - 7.75). In the strains (86.2, 76.6 and 20.2) that have stable growth. Big biomasses for further research. In the same time, AT.19 strain is import strain and has been using for productive biofertilizer as control strain.

The obtained results show that, three strains (86.2, 76.6 and 20.2) had productive raw IAA ability (raise 6.17 - 33.24% compare with control strain), acetylene assay ability (raise 13.7 - 44.49% compare with control strain), stimulated growth, raised the yields and quality of celery cabbage.

Three Azotobacter strains (86.2, 76.6 and 20.2) can use for production of biofertilizer.

VAI TRÒ CỦA ÔXY TRONG LÊN MEN BIA NỒNG ĐỘ CAO f

NGUYỄN THIU HÀ⁽¹⁾, NGUYỄN THỊ HIỀN⁽²⁾TRƯỜNG THỊ HOÀ⁽¹⁾,
NGUYỄN MẠNH ĐẠT⁽¹⁾, TRƯỜNG HƯƠNG LAN⁽¹⁾, PHẠM ANH TUẤN⁽³⁾

⁽¹⁾Viện Công nghiệp Thực phẩm

⁽²⁾Trường Đại học Bách khoa Hà nội

⁽³⁾Viện nghiên cứu Rượu - Bia - Nước giải khát

1. MỞ ĐẦU

Công nghệ sản xuất bia nồng độ cao là phương pháp tạo và lên men dịch đường có nồng độ cao hơn bình thường, sau đó pha loãng bằng nước đặc biệt (nước vô trùng và đã khử oxy), thu được bia thành phẩm có độ cồn mong muốn [2, 4].

Nhờ giảm được tỷ lệ nước trong dịch đường, công nghệ sản xuất bia nồng độ cao cho phép tăng hiệu suất sử dụng thiết bị sẵn có, đồng thời tiết kiệm năng lượng (điện, hơi, nước), giảm chi phí nhân công, nâng cao công suất nhà máy và đặc biệt tăng tỷ lệ nguyên liệu thay thế mà hầu như không có dấu hiệu về sự thay đổi hương vị bia. Bên cạnh đó, sinh khối cũng giảm, dẫn tới tăng hàm lượng cồn tạo thành trên đơn vị đường có thể lên men. Do đó, việc pha loãng bia theo hàm lượng cồn một lần nữa làm tăng năng suất. Ngoài ra công nghệ mới này rất linh hoạt trong việc đa dạng hoá sản phẩm, là kết quả của việc lựa chọn nguyên liệu cho sản xuất dịch đường và lựa chọn tỷ lệ pha loãng đến nồng độ cồn theo mong muốn [2,3]. Tuy nhiên, sản xuất bia nồng độ cao cũng có nhiều nhược điểm mà các nhà công nghệ đang quan tâm khắc phục: sự thiếu hụt một số thành phần trong dịch đường có thể ảnh hưởng đến chất lượng bia, như độ bền bọt và hương vị bia, mặt khác môi trường nồng độ đường cao có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình lên men và kết lắng của nấm men (do tăng áp suất thẩm thấu). Do vậy, quá trình lên men bia thường bị kéo dài và không triệt để. Trong các biện pháp rút ngắn thời gian lên men, như tăng nhiệt độ, tỷ lệ men giống, hàm lượng oxy hoà tan ban đầu, thì biện pháp cuối có hiệu quả hơn cả. Vì oxy không chỉ thúc đẩy nấm men nhanh chóng sinh trưởng, thiết lập trạng thái cân bằng giữa quần thể nấm men với môi trường mà còn giúp nấm men tạo đủ lượng sterol và axit béo không no trong màng tế bào. Điều này giúp chúng chống chịu tốt hơn với môi trường có áp suất thẩm thấu lớn, hàm lượng cồn cao sau này (4)...

Trong lên men bia nồng độ cao, oxy đảm bảo quá trình sinh sản nhanh của tế bào nấm men vào giai đoạn đầu lên men tạo lượng tế bào mới, trẻ, có hoạt tính cao là tiền đề cho quá trình lên men nhanh. Mặt khác oxy còn giúp cho nấm men có khả năng sống cao hơn, chống chịu tốt hơn với các tác động từ môi trường là điều kiện để quá trình lên men diễn ra triệt để. Quá trình sinh sản nhanh dẫn đến cường độ trao đổi chất tăng, glucoza bị tiêu thụ nhanh, sự ức chế glucoza không còn nữa, quá trình lên men maltoza và maltotriosa sẽ xảy ra sớm hơn. Ngoài ra oxy còn ảnh hưởng mạnh đến hương vị bia, thiếu oxy làm kéo dài quá trình lên men, hương vị bia không cân đối, làm tăng vọt hàm lượng este đặc biệt etyl axetat. Nếu hàm lượng oxy không đủ sẽ làm giảm khả năng sinh sản của nấm men, giảm hiệu suất lên men, giảm hấp thụ đạm và khả năng sống của nấm men. Nhưng hàm lượng oxy quá cao sẽ dẫn đến tổn thất dịch đường cho sinh khối, quá trình lên men diễn ra quá nhanh và mạnh sẽ tạo nhiều sản phẩm phụ không mong muốn, giảm chất lượng bia. Do đó việc cung cấp, kiểm soát hàm lượng oxy thích hợp trong quá trình lên men là rất quan trọng (2).

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu:

Malt đại mạch úc

Hoa houblon Đức

Gạo IR203 mua trên thị trường

Xi rô maltoza và xi rô glucoza mua ngoài thị trường

Chủng nấm men *Saccharomyces carlsbergensis* YCFD₁₈₀ thuần khiết trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm.

2.2. Phương pháp:

- Xác định mật độ tế bào, tỷ lệ tế bào sống, nảy chồi trên buồng đếm Gorjaev.
- Xác định hàm lượng oxy hoà tan bằng thiết bị Model 830 & 835 của Mỹ.
- Xác định hàm lượng cồn, độ khô thực, diacetyl theo AOAC 95.
- Tối ưu hoá bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm dùng mạt trận Doehlert.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. ảnh hưởng của hàm lượng oxy hoà tan đến các đặc tính sinh lý của nấm men.

Để nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng oxy hoà tan đến các đặc tính sinh lý của tế bào nấm men chúng tôi tiến hành quan sát hình thái kích thước và khả năng sống của chủng YCFD₁₈₀ ở ngày thứ 7 của quá trình lên men, tỷ lệ nảy chồi vào giờ thứ 30 trên môi trường dịch đường 16°Bx. Kết quả được trình bày ở bảng 1

Bảng 1

Đặc điểm sinh lý của tế bào

Đặc điểm	M2	M8	M20	M30	M40
Hình thái tế bào	Ovan	Ovan	Ovan	Ovan	Ovan
Kích thước(µm)	5,13	5,27	5,30	5,35	5,36
Tỷ lệ tế bào nảy chồi(%)	46,2	65,0	68,5	69,5	71,0
Khả năng sống (%)	83,1	94,6	95,0	95,0	95,0

Chú thích: M2: mẫu đối chứng, không sục oxy, hàm lượng oxy hoà tan bằng 2mg/l.

M8: mẫu được sục đến 8mg O₂ hoà tan/l.

M20: mẫu được sục đến 20mg O₂ hoà tan/l.

M30: mẫu được sục đến 30 mg O₂ hoà tan/l.

M40: mẫu được sục đến 40 mg O₂ hoà tan/l.

Từ kết quả trên, chúng tôi nhận thấy hàm lượng oxy hoà tan không làm thay đổi lớn hình dạng và kích thước tế bào. Nhưng trong các mẫu có hàm lượng oxy hoà tan cao chúng tôi quan sát thấy tế bào nấm men có dạng ôvan trứng dài hơn: M8 : 5,27µm; M40: 5,36µm hình dạng tế bào nấm men càng tròn hơn trong môi trường có đầy đủ oxy đặc biệt trong mẫu M8, M20.

Tỷ lệ nảy chồi tăng khi tăng hàm lượng oxy: ở M2 tỷ lệ nảy chồi là 46,2%, tăng nhanh đến 65,0% ở M8, sau đó nếu tiếp tục tăng hàm lượng oxy như ở mẫu M20, M30 và M40 thì tỷ lệ nảy chồi tăng không đáng kể lần lượt là 68,5%, 69,5%, 71,0%.

Hàm lượng oxy hoà tan có ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào. Khi tăng hàm lượng oxy thì khả năng sống tăng: với hàm lượng 2mg O₂/l tỷ lệ tế bào sống sau 7 ngày lên men là 83,1%, tăng hàm lượng oxy tới 8mg/l, chỉ số này đạt 94,6%. Tỷ lệ tế bào sống cao rất có ý nghĩa trong sản xuất, bia không có mùi vị nấm men và khả năng tái sử dụng nấm men cao.

3.2 ảnh hưởng của hàm lượng oxy hoà tan đến quá trình lên men.

Quan sát ảnh hưởng của oxy hoà tan đến sự phát triển số lượng tế bào, khả năng tiêu thụ đường của chủng YCFD₁₈₀ trong quá trình lên men, trên môi trường dịch đường 16°Bx, kết quả bảng 2 và hình 1 cho thấy khi tăng hàm lượng oxy hoà tan mật độ tế bào nấm men cực đại tăng. Mật độ tế bào cực đại ở M2 là 60 x10⁶ TB/ml, tăng lên ở M8: 79,3 x10⁶ TB/ml. Khi hàm lượng oxy quá lớn lượng sinh khối tăng không nhiều M30: 92,9 x10⁶ TB/ml, M40: 97 x10⁶ TB/ml.

Bảng 2

Ảnh hưởng của hàm lượng oxy hoà tan đến quá trình lên men

Thời gian (ngày)	M2		M8		M20		M30		M40	
	^o Bx	TB	^o Bx	TB	^o Bx	TB	^o Bx	TB	^o Bx	TB
0	16	25	16	25	16	25	16	25	16	25
1	13	50	12	69,3	11,6	80,6	11,3	87,4	10,9	93
2	11,5	57,3	8,9	79,3	8,5	80,6	7,9	92,9	7,6	97
3	10	60	7,75	73,8	7,5	80,5	7,4	86,2	7,3	90,6
4	9,2	42	7,2	54	7,1	60,9	7	65	7	70,6
5	8,5	30	7,0	33	6,8	36,8	7	41,6	7	46,4
6	8	18	7,0	20	6,8	22	7	25	7	29
7	8	10	7,0	11	6,8	14	7	17	7	20
Nồng độ chất khô thực (%)	5,73		4,79		4,50		4,51		4,51	
Độ lên men thực (%)	64,2		70,0		71,9		71,8		71,8	
Sinh khối (g/l bia)	7,5		9,7		10,9		11,6		11,7	

Chú thích: TB là mật độ tế bào (x10⁶ TB/ml); ^oBx :độ khô biểu kiến.

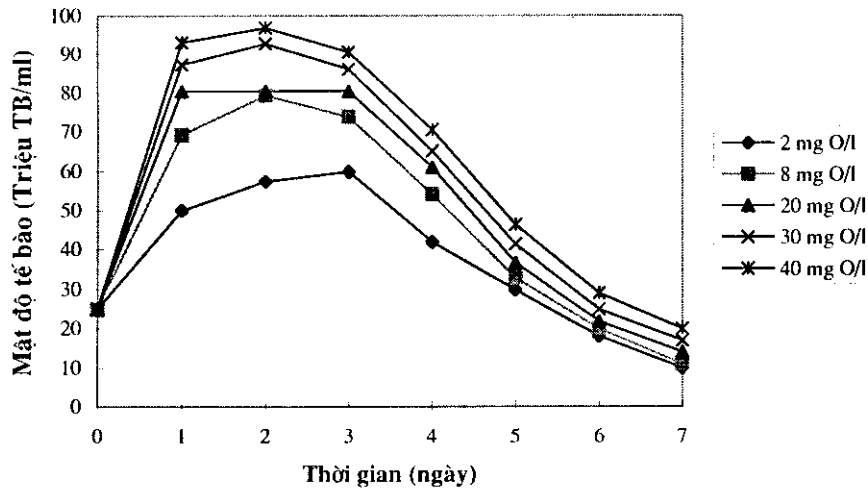
Mật độ cực đại đạt được sớm hơn nếu hàm lượng oxy hoà tan lớn: M2 đạt mật độ cực đại ở ngày thứ 3, trong khi các mẫu còn lại đều đạt mật độ cực đại ngay từ ngày thứ hai. Hàm lượng oxy hoà tan tăng, lượng sinh khối thu được sau lên men chính càng lớn. Điều này phù hợp với sự tăng mật độ nấm men cực đại trong quá trình lên men, khi tăng hàm lượng oxy hoà tan.

Sự đạt mật độ tế bào cực đại sớm và lớn hơn khi hàm lượng oxy hoà tan lớn, là nguyên nhân làm giảm nhanh nồng độ chất khô biểu kiến của dịch lên men. Sau ngày đầu nồng độ chất khô biểu kiến trong mẫu M2 là 13^oBx, trong khi đó M8 là 12^oBx, M20 là 11,6^o Bx, M30 là 11,3^oBx, M40 là 10,9^oBx.

Nồng độ chất khô thực còn lại sau lên men chính giảm từ 5,73 (ở M2) tới 4,79 (ở M8) khi tăng hàm lượng oxy hoà tan từ 2mg/l đến 8mg/l nhưng nếu tiếp tục tăng hàm lượng oxy hoà tan như

trong các mẫu M20, M30 và M40, nồng độ chất khô thực giảm không đáng kể. Độ lên men thực tăng khi tăng hàm lượng oxy hoà tan, nhưng nếu hàm lượng oxy quá lớn độ lên men tăng ít và có thể bị tổn thất đường do tạo sinh khối.

Hàm lượng oxy hoà tan càng cao, thời gian lên men chính càng ngắn. Thời gian lên men chính của M2 là 7 ngày, M8 và M20 là 6 ngày và M30 và M40 là 5 ngày. Tuy nhiên thời gian lên men chính quá ngắn, nấm men phát triển ồ ạt ở giai đoạn đầu, có thể làm tăng hàm lượng các sản phẩm trao đổi chất không mong muốn.



Hình 1. Sự phát triển của nấm men trong quá trình lên men.

3.3 Ảnh hưởng của hàm lượng oxy hoà tan đến các chỉ tiêu hoá học của bia non .

Sau 7 ngày lên men chính, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng cồn, diaxetyl và độ axit của bia non. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Qua bảng chúng tôi nhận thấy:

- Ôxy ảnh hưởng ít đến hàm lượng cồn tạo thành. ảnh hưởng chỉ đáng kể khi thay đổi hàm lượng oxy từ 2mg/l đến 8mg/l.

- Ôxy có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng diaxetyl: với 2mg/l oxy hoà tan hàm diaxetyl là 0,47mg/l, khi tăng đến 8mg oxy/l thì hàm lượng diaxetyl giảm tới 0,45mg/l, nhưng nếu tiếp tục tăng hàm lượng oxy hoà tan thì hiệu quả sẽ ngược lại, hàm lượng diaxetyl sẽ tăng mạnh đến 0,55mg/l ở M20 và 0,75mg/l ở M40. Điều này có thể giải thích là do oxy ảnh hưởng đến hoạt lực của nấm men, khi hàm lượng oxy lớn, hoạt động trao đổi chất diễn ra mạnh làm tăng hàm lượng diaxetyl tạo thành nhưng sau đó do cồn được tạo ra nhanh, môi trường lại nghèo dinh dưỡng nên hoạt tính khử diaxetyl kém, hàm lượng diaxetyl còn lại trong bia non cao. Để khắc phục hạn chế trên, có thể sử dụng kết hợp enzym α - axetolactat decacboxylaza (chế phẩm Maturex) làm giảm hàm lượng diaxetyl trong bia.

- Khi tăng hàm lượng oxy hoà tan, đã làm tăng độ axit. Đó có thể do hàm lượng oxy hoà tan tăng đã làm tăng hoạt động trao đổi chất, sự tiêu thụ nhanh và nhiều axit amin và sinh axit hữu cơ là nguyên nhân làm tăng độ axit...

Bảng 3

Chỉ tiêu hoá học của bia non

Mẫu	M2	M8	M20	M30	M40
Độ cồn (% V/V)	5,36	6,15	6,16	6,15	6,15
Diaxetyl (mg/l)	0,47	0,45	0,55	0,71	0,75
Độ axit (Số ml NaOH 1N/100 ml bia non)	1,15	1,2	1,29	1,32	1,35

3.4. Tối ưu hoá các điều kiện lên men bia nồng độ cao

Để xác định hàm lượng oxy thích hợp cho chủng YCFD₁₈₀ ở các nồng độ dịch đường khác nhau, chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm tối ưu hoá. Khi thay đổi nồng độ đường và hàm lượng oxy hoà tan thì tỷ lệ men giống cũng cần có thay đổi phù hợp. Để số lượng thí nghiệm phải thực hiện là ít nhất đồng thời nghiên cứu được tác động qua lại giữa các yếu tố, chúng tôi đã sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm dùng ma trận Doehlert. 3 chỉ tiêu để tối ưu hoá là:

Y₁: Hàm lượng cồn (% V/V)

Y₂: Độ lên men thực (%)

Y₃: Hàm lượng diaxetyl(mg/l)

Các chỉ tiêu này được xác định sau khi kết thúc lên men chính.

Đối với chủng nấm men YCFD₁₈₀, các yếu tố chính ảnh hưởng đến 3 chỉ tiêu trên là:

Hàm lượng oxy hoà tan (X₁): 2 ÷ 40mg/l

Tỷ lệ men giống: (X₂): 10x10⁶ ÷ 40x10⁶ TB/ml

Nồng độ dịch đường: (X₃): 12 ÷ 20⁰Bx

Kết quả thu được sau khi phân tích bề mặt đáp ứng như sau:

- Điều kiện để có hàm lượng cồn cao nhất:

Nồng độ đường 17,5 ÷ 19,8⁰ Bx

Hàm lượng oxy hoà tan 18 ÷ 25 mg/l

Tỷ lệ giống 25x10⁶ TB/ml.

- Điều kiện để có hiệu suất lên men cao nhất:

Nồng độ đường 12 ÷ 13⁰ Bx

Hàm lượng oxy hoà tan 8 ÷ 18 mg/l

Tỷ lệ giống 25x10⁶ TB/ml.

- Điều kiện để có hàm lượng diaxetyl nhỏ nhất:

Nồng độ đường 12 ÷ 13⁰ Bx

Hàm lượng oxy hoà tan 2 ÷ 10 mg/l

Tỷ lệ giống 25 ÷ 35x10⁶ TB/ml.

IV.. KẾT LUẬN

Với chủng YCFD₁₈₀, dịch đường nồng độ 16^oBx

Ôxy có ảnh hưởng đến quá trình lên men bia nồng độ cao đặc biệt ở khoảng hàm lượng ôxy hoà tan thấp. Hàm lượng ôxy hoà tan tăng từ 2 mg/l đến 40mg/l làm:

+ Tăng khả năng sống của tế bào nấm men từ 83,1% đến 95% và khả năng nảy chồi từ 46,2% đến 71%.

+ Tăng mật độ tế bào cực đại trong dịch lên men từ 60×10^6 TB/ml đến 97×10^6 TB/ml.

+ Tăng hiệu suất lên men từ 64,2% đến 71,8%.

+ Rút ngắn thời gian lên men chính từ 7 ngày xuống 5 ngày.

+ Tăng hàm lượng cồn từ 5,36 đến 6,15%(V/V).

Để có hàm lượng cồn và độ lên men cao, đồng thời hàm lượng diacetyl thấp, nên tiến hành lên men theo các điều kiện sau:

Nồng độ đường 14 ÷ 16^o Bx

Hàm lượng ôxy hoà tan 18 ÷ 20 mg/l

Tỷ lệ giống 25×10^6 ÷ 30×10^6 TB/ml.

SUMMARY

EFFECT OF DISSOLVED OXYGEN CONCENTRATION ON HIGH GRAVITY BREWING

Nguyen Thu Ha.,nguyen thi hien, Truong Thi Hoa , Nguyen Manh Dat. Truong Huong Lan, Pham Anh Tuan.

High gravity brewing has been progressively introduced into breweries around the world for the past twenty five year. The major advantage of this process is that by reducing the amount of water in the mash, increasing production, demands can be met without expanding existing brewing, fermenting and storage facilities. In high gravity brewing, effect of dissolved oxygen on physiological state and yeast performance of strain *Saccharomyces carlsbergensis* YCFD 180 is determined. Results indicated that, when increasing dissolved oxygen from 2 mg/l to 40 mg/l, the viability increased from 81.2% to 95%. Besides, fermentation efficiency also increased from 64.2% to 71.8%. Therefore, primary fermentation time reduced from 7 days to 5 days. Ethanol concentration increased parallel with diacetyl, from 5.36% to 6.15% and from 0.47 mg/l to 0.71 mg/l respectively. By using Doehlert experiment matrix, fermentation conditions of high gravity brewing should be: gravity wort: 14 ÷ 16^o Bx, dissolved oxygen 18 ÷ 20 mg/l, pitching rate: 25×10^6 ÷ 30×10^6 cells/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AOAC Official Method of Analysis. 1995
2. E. Pfisterer and G.G. Stewart.1976. High gravity brewing, J. of Brew. Inst. Vol. 56, P. 132-143.
3. G.G. Stewart. 1998. Brewing Science and Technologies.
4. Narziss, Weihenstephan.1997. Global brewing technologies - a look over the fence.

NGHIÊN CỨU NÂNG CAO CHẤT LƯỢNG ⁺ RƯỢU VANG NHO VIỆT NAM

NGUYỄN THANH HẰNG, PHẠM THU THUY

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM, TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI.

I. MỞ ĐẦU

Rượu vang là một rượu nhẹ độ, được lên men từ các loại quả, rất được ưa chuộng. Ở nước ta, nghề trồng cây ăn quả ngày càng được phát triển, đặc biệt là các loại quả có tính chất thích hợp cho sản xuất rượu vang. Để góp phần thúc đẩy công nghệ sản xuất rượu vang từ các loại quả nhiệt đới thì việc tìm ra biện pháp nhằm nâng cao hiệu suất lên men và chất lượng rượu là một vấn đề cần thiết. Xuất phát từ yêu cầu đó, chúng tôi đi vào nghiên cứu nâng cao chất lượng rượu vang nho Việt Nam.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nho:

Nho Việt Nam, nho ngọt, quả chín đều, màu đỏ, không dập nát.

Dâu:

Dâu từ vùng Ba Vì - Hà Tây, chọn quả to, chín đều, màu đỏ, không dập nát.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- + Xác định hàm lượng chất khô bằng chiết quang kế cầm tay.
- + Xác định hàm lượng đường theo phương pháp Graxianop.
- + Xác định hàm lượng axit bằng phương pháp chuẩn NaOH 0,1 N
- + Xác định hàm lượng rượu êtylic bằng phương pháp chưng cất, sau đó tỷ trọng.
- + Xác định khả năng lên men bằng phương pháp đo hàm lượng CO₂.
- + Xác định hàm lượng tanin dựa trên cơ sở oxi hóa tanin và các chất màu bằng KMnO₄ với sự có mặt của indigocarmin làm chất chỉ thị.
- + Xác định hiệu suất lên men = (lượng rượu thu được/ lượng rượu theo lý thuyết) x 100

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1) 3.1. Xác định một số thành phần của nguyên liệu

Thành phần của nguyên liệu đã được trình bày ở bảng 1

Bảng 1. Thành phần nguyên liệu

Loại nguyên liệu (% khối lượng)	Nho	Dâu
Lượng axit tổng	0,56	0,49
Hàm lượng đường	9,88	9,19
Hàm lượng pectin	0,92	0,31
Hàm lượng tanin	0,077	0,035
Màu sắc	hồng	đỏ đậm

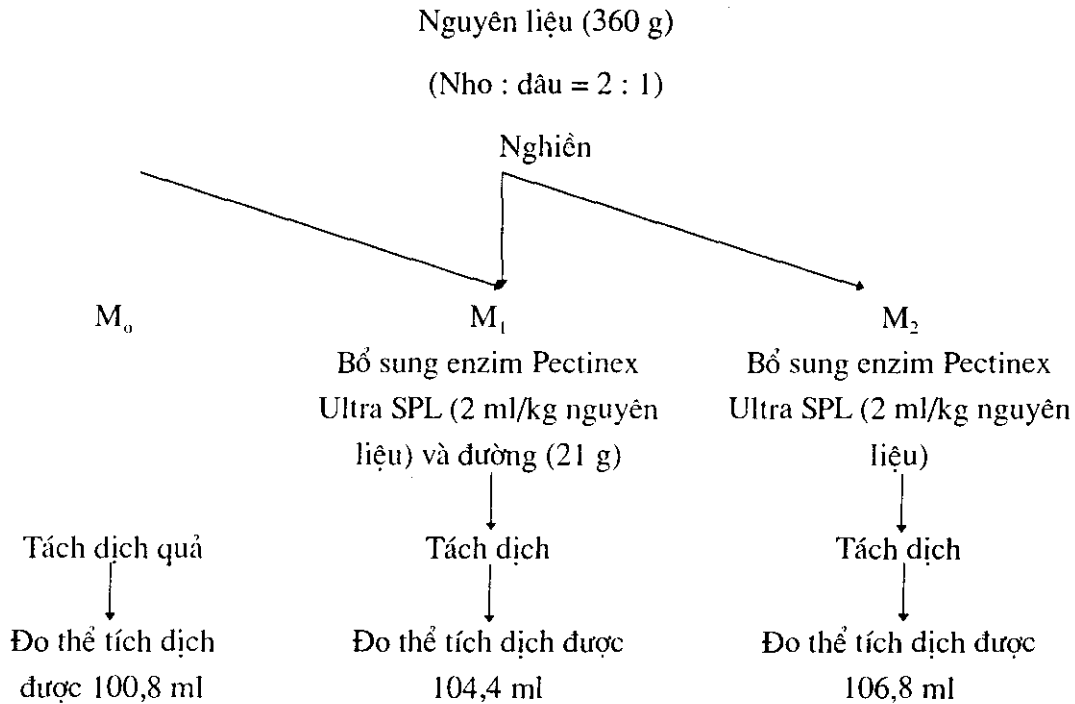
Để cải thiện màu sắc rượu vang từ nho, chúng tôi sử dụng hỗn hợp 2 loại quả : nho và dâu với tỉ lệ 2/1.

3.2 ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu

3.2.1. ảnh hưởng tới hiệu suất thu hồi dịch quả

Nguyên liệu được xử lý theo các phương pháp như đã trình bày trên sơ đồ 1; kết quả nhận được sau xử lý được đánh giá bằng lượng dịch thu hồi sau khi tách chiết.

Sơ đồ 1: Các phương pháp xử lý nguyên liệu



Kết quả nhận được cho thấy việc xử lý bằng enzym cho hiệu suất thu hồi dịch quả lớn hơn ít nhất 3,57 %. Nhưng xử lý enzym không có mặt của đường bổ sung thì lại cho hiệu suất thu hồi cao hơn (106,8 ml so với 104,4 ml). Như vậy, có thể đường bổ sung vào đã ức chế hoạt động của enzym. Mặt khác, nếu bổ sung đường vào trước chắc chắn sẽ có sự tổn thất của đường ở trong bã.

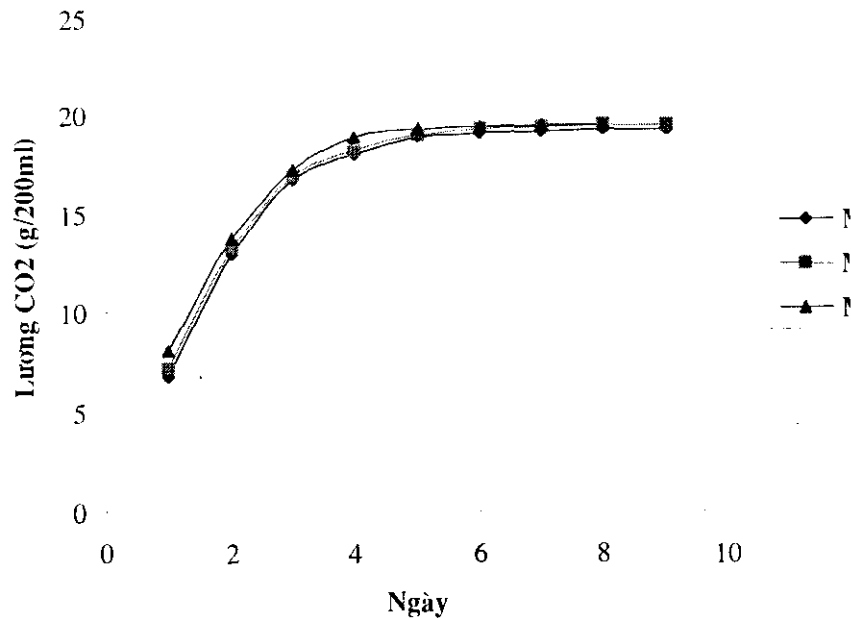
Vì vậy, cần phải xử lý nguyên liệu bằng enzym, sau đó mới bổ sung đường tới nồng độ lên men sẽ cho hiệu suất thu hồi dịch quả cao nhất.

3.2.2. ảnh hưởng đối với quá trình lên men

Các dịch quả nhận được ở trên được điều chỉnh về hàm lượng đường, nguồn Nitơ, pH, nhiệt độ trước khi lên men như sau :

- Hàm lượng đường (g/l)	: 210
- Nguồn nitơ (NH ₄) ₂ SO ₄ (mg nitơ/l)	: 84
- pH	: 4,0
- Nhiệt độ lên men	: 30°C

Kết quả nhận được sau lên men đã được trình bày ở hình 1 và ở bảng 2



Hình 1 : Lượng CO₂ thoát ra g/200ml

Bảng 2. Kết quả lên men

Các chỉ tiêu	M ₀	M ₁	M ₂
Nồng độ chất khô (%)	4,0	3,8	3,7
Đường sót (g/l)	7,8	7,0	6,9
Lượng axit (g/l)	6,0	6,7	6,7
Nồng độ cồn (%V)	12,40	12,55	12,60
Hiệu suất lên men (%)	91,0	92,2	92,6
Màu sắc	đỏ nhạt	đỏ	đỏ
Mùi vị	mùi vị ít đặc trung hơn	mùi vị đặc trung	mùi vị đặc trung
Độ trong	Trong	Trong	Trong

Sử dụng enzym để xử lý nguyên liệu cho phép cải thiện quá trình lên men rượu (rút ngắn thời gian lên men 1 ngày, hiệu suất lên men cao hơn 1,2% và 1,6%). Quá trình lên men rượu của 2 dịch lên men nhận được bằng hai phương pháp xử lý enzym khác nhau không đáng kể.

Với những kết quả nhận được ở trên, chúng tôi chọn phương pháp xử lý nguyên liệu quả bằng enzym và chỉ bổ sung dịch đường sau khi tách quả. Nghiên cứu điều kiện lên men

Điều kiện lên men rượu vang được nghiên cứu trong khoảng :

+ pH : 3,0 — 4,5

+ lượng nitơ (mg/l) : 50 — 100

Với khoảng xác định trên tiến hành tối ưu hóa điều kiện lên men dịch quả, chỉ số đánh giá là : nồng độ rượu đạt được (%V)

Mức thí nghiệm của các yếu tố :

Mức thí nghiệm	x_1 (pH)	x_2 (lượng nitơ)
Mức gốc	3,75	75
Khoảng biến đổi	0,75	25
Mức trên	4,5	100
Mức dưới	3,5	50

Số thí nghiệm là $N = 2^2 = 4$

Ma trận thực nghiệm và kết quả thu được ghi trong bảng 3

Bảng 3. Ma trận thực nghiệm và kết quả

STN	x_1	x_2	y_1	y_2	y_{TB}	ξ_j^2
1	+	+	11,20	11,34	11,27	0,00980
2	—	+	10,10	10,15	10,13	0,00125
3	+	—	11,60	11,70	11,65	0,00500
4	—	—	10,30	10,43	10,37	0,00845

Các số liệu bảng 3 có cùng độ chính xác như nhau ($G_T < G_B$) và tính được phương trình hồi quy có dạng :

$$y = 10,85 + 0,61.x_1 - 0,16.x_2.$$

Y: nồng độ rượu đạt được(%V)

Tối ưu hóa theo Box — Willson : Kết quả nhận được ghi trong bảng 4

Bảng 4. Tối ưu hóa theo Box □ Willson

STN	x_1	x_2	y_1	y_2	y_{TB}
1	3,75	75	12,60	12,58	12,59
2	3,90	70	12,65	12,67	12,66
3	4,05	65	12,59	12,58	12,59
4	4,20	60	12,30	12,32	12,31
5	4,35	55	12,20	12,18	12,31

Số liệu ở bảng 4 cho biết độ rượu đạt cực đại ở thí nghiệm 2. Điều kiện tối ưu của quá trình là pH = 3,9, lượng nitơ là 70 mg/l.

IV. KẾT LUẬN

Phương pháp xử lý nguyên liệu nho và dâu bằng enzym Pectinex ULTra (2mg/kg) cho phép tăng hiệu suất thu hồi dịch quả và cải thiện quá trình lên men rượu vang.

Điều kiện tối thích cho lên men rượu vang hỗn hợp nho dâu là :

pH = 3,9

Nguồn nitơ bổ sung $(NH_4)_2SO_4$: 70 mg nitơ/l

TÓM TẮT

Việc xử lý nguyên liệu nho và dâu bằng Enzim Pectinex Ultra SPL (2ml/kg) đã cho phép tăng hiệu suất thu hồi dịch quả và cải thiện quá trình lên men rượu vang. Điều kiện tối thích cho sự lên men rượu vang của hỗn hợp nho dâu là: pH=3.9, nguồn Nitơ bổ xung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 70mg nitơ/l.

SUMMARY

STUDY FOR IMPROVING THE QUALITY OF VIETNAMESE GRAPE WINE

Treatment on the mixture of of grape and mulberry by Pectinex Ultra SPL (2 ml/kg) efficiently increased the high recovery of fruit juices and ameliorated wine fermentation.

The optimal conditions for wine fermentation from mixture of grape and mulberry were: pH 3.9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ added: 70 mg N/l.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1- Emile Peynaud
Connaissance et travail du vin. Paris 1971
- 2- Jean Ribereau Gayon, Emile Peynaud, Pascal Ribereau Gayon, Pierre Sudraud.
Sciences et techniques du vin . Paris 1975
- 3- Graham H. Fleet.
Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers 1992
- 4- H. Heslot, B.Vladescu.
La Levure dans les industries alimentaires. Paris 1994
- 5- P. M.Mansev, N. A. Emenlianova
Osnovu Nauchnuc Isledovani. Kiep 1982

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH NẢY MẦM CỦA THÓC P4 ĐỂ ỨNG DỤNG CHO SẢN XUẤT BIA

NGUYỄN THỊ HIỀN, LÊ THANH MAI, LÊ QUANG HÒA
*Bộ môn Công nghệ sinh học thực phẩm
Viện CN Sinh học và CN Thực phẩm
Trường Đại học Bách khoa Hà nội*

I. MỞ ĐẦU

Trong thời gian qua, cùng với sự tăng trưởng mạnh mẽ của ngành công nghiệp Rượu - Bia, chúng ta cũng đã phải chi ra một lượng ngoại tệ lớn để mua nguyên liệu sản xuất bia là malt (năm 1997, lượng ngoại tệ mà nước ta đã phải bỏ ra để nhập malt là khoảng 30 triệu USD). Việt Nam hiện nay là nước có sản lượng gạo xuất khẩu đứng hàng thứ ba thế giới, do vậy việc nghiên cứu sản xuất malt từ thóc là một việc làm hết sức có ý nghĩa. Trước đây đã có khá nhiều nghiên cứu sản xuất malt thóc để sản xuất bia nhưng chất lượng thành phẩm còn chưa được như ý muốn. Nhiều nhà nghiên cứu cho rằng có rất nhiều nguyên nhân, nhưng nguyên nhân chính là do hàm lượng protein trong thóc thấp hơn nhiều so với đại mạch. Trong thời gian vừa qua, chúng ta đã lai tạo được giống lúa mới P4 có hàm lượng protein từ 8 - 9%. Từ thành công này, chúng tôi đã thực hiện đề tài "*Nghiên cứu quá trình nảy mầm của thóc P4 để ứng dụng cho sản xuất bia*" với hy vọng rằng chất lượng malt được sản xuất từ giống thóc này sẽ đạt kết quả tốt.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Thóc P4 lấy từ Viện Cây Lương thực - Thực phẩm.
- Thóc CR203 mua từ Công ty Cây trồng Trung ương.
- Malt đại mạch của Pháp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Xác định độ ẩm theo phương pháp sấy khô đến trọng lượng không đổi.
- Xác định hàm lượng tinh bột theo phương pháp thủy phân bằng axit HCl.
- Xác định hàm lượng đường khử theo phương pháp Lain-Aynon.
- Xác định hoạt lực diastaza (DC) theo phương pháp năng lực đường hóa.
- Xác định hoạt lực amilaza (AC) theo phương pháp SKB cải tiến.
- Xác định năng lực nảy mầm theo phương pháp EBC.
- Xác định hàm lượng nitơ tổng số và nitơ hòa tan theo phương pháp Kjeldahl.
- Xác định axit amin theo phương pháp Lowry.
- Phương pháp thu nhận malt thóc:

Mỗi mẻ 200 g thóc ngâm trong 1 lít nước. Để tránh sự nhiễm khuẩn và phá trạng thái ngủ của hạt, thêm dung dịch H_2O_2 30% vào nước ngâm nhằm đạt liều lượng 0,1g H_2O_2 /l. Cứ sau 3h30' ngâm trong nước có sục khí, hạt để ráo 30 phút nhằm tạo điều kiện cho hạt tiếp xúc với oxy không khí. Sau khi đạt độ ẩm yêu cầu (40 - 42%), hạt được chuyển sang các rổ nhựa có phủ giấy thấm xung quanh để giữ ẩm và duy trì độ ẩm cho hạt trong suốt quá trình nảy mầm. Bên cạnh việc dùng quạt để cung cấp oxy, đuổi CO_2 và nhiệt tỏa ra do sự hô hấp của khối hạt, cần thường xuyên đảo trộn khối hạt để tạo sự thoáng khí và tránh hiện tượng rối rễ (3 h/lần). Đối với các mẫu

hạt có xử lý axit gibberellic thì bổ sung axit gibberellic với liều lượng yêu cầu vào nước ngâm lần cuối cùng. Lúc này đa số các hạt ngâm đã bắt đầu nhú mầm và lớp vỏ nước dính bên ngoài hạt đã bay hơi hết trong thời gian để ráo cho nên axit gibberellic sẽ nhanh chóng thấm vào bên trong hạt theo mầm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định các đặc tính của nguyên liệu

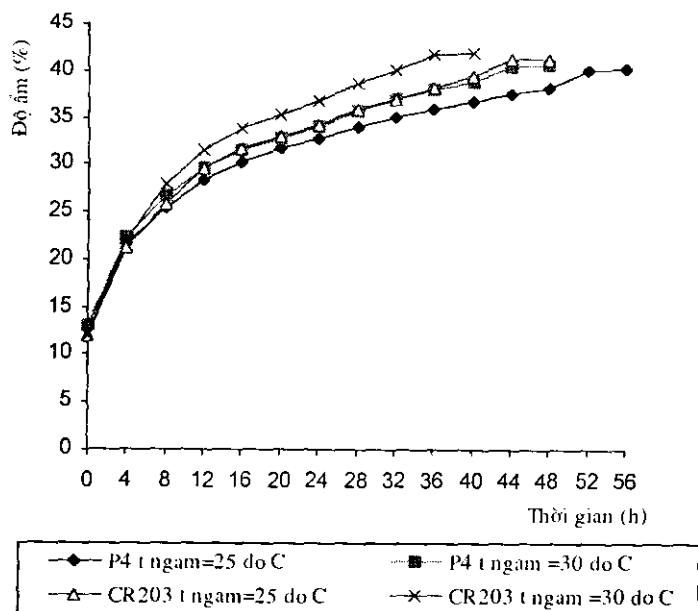
Chúng ta đều biết đặc tính của thóc đều có ảnh hưởng quyết định đối với toàn bộ quá trình sản xuất malt từ giai đoạn ngâm cho đến giai đoạn sấy. Do vậy, chúng tôi đã tiến hành xác định các đặc tính cơ lý cũng như thành phần hóa học của các giống thóc nghiên cứu và so sánh với đại mạch. Các kết quả đã được trình bày ở bảng 1

Bảng 1: Các chỉ số của nguyên liệu

Các chỉ số	Đại mạch	P ₄	CR203
Trọng lượng 1000 hạt (g)	41,5	22,81	22,03
Hàm lượng trấu (%)	17,6	19,3	18,2
Chiều dài hạt (mm)	7,21	6,31	5,76
Chiều rộng hạt (mm)	2,80	2,06	2,25
Tỷ số dài/rộng	2,57	3,06	2,56
Độ ẩm (%)	12,0	13,0	11,9
Tinh bột (%CK)	63,0	59,1	60,8
Đường khử (%CK)	1,2	1,1	0,8
Nitơ tổng số (%CK)	1,712	1,434	1,213
Nitơ hòa tan (%CK)	0,212	0,071	0,066
Nitơ axit amin (% mg/g)	80	39	32

Qua các kết quả thu được, chúng ta thấy hạt thóc nhỏ hơn hạt đại mạch và có trọng lượng chỉ bằng 1/2 hạt đại mạch nhưng hàm lượng trấu lại cao hơn. Thóc P₄ có hàm lượng nitơ tổng số và nitơ hòa tan cao hơn so với thóc CR203. Hàm lượng tinh bột và đường khử trong thóc P₄ và CR203 đều nhỏ hơn, nhưng hàm lượng đường tan trong thóc P₄ vốn là giống có hàm lượng protein cao, lại lớn hơn so với thóc CR203.

Như đã nói ở phần trên, hàm lượng nitơ tổng số, nitơ tan và nitơ amin trong malt tươi và malt thành phẩm đều có ảnh hưởng rất lớn đối với các đặc tính của bia thành phẩm như màu



Đồ thị 1: Sự hút ẩm của hạt ở các nhiệt độ khác nhau

sắc, mùi vị, tính giữ bọt và khả năng tạo kết tủa lạnh.

3.2. Nghiên cứu sự hút ẩm của hạt thóc với các nhiệt độ ngâm khác nhau

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sự biến thiên độ ẩm của hạt trong quá trình ngâm ở hai nhiệt độ 25 và 30°C. Kết quả thí nghiệm được trình bày qua đồ thị 1. Kết quả cho thấy đối với cả hai giống thóc P4 và CR203, nhiệt độ ngâm càng cao thì thời gian để hạt đạt độ ẩm bão hòa càng ngắn. Tốc độ hút ẩm của thóc giống P4 có phần nhỏ hơn so với thóc CR203 có thể do kích thước của hạt thóc P4 có độ dài lớn hơn hẳn so với thóc CR203 (6,31 so với 5,76 mm), P4 có hàm lượng protein lớn hơn nhiều so với CR203, như chúng ta đã biết, hạt có hàm lượng protein càng cao thì càng khó hút ẩm. Như vậy với cùng một giống thóc thì ngâm ở nhiệt độ 30°C sẽ cho độ ẩm bão hòa cao hơn khoảng 1 - 2% so với ở nhiệt độ 25°C mà thời gian ngâm lại ngắn hơn tới 8 h.

3.3. Sự thay đổi hoạt lực của enzym amilaza trong quá trình nảy mầm

Với mục đích sử dụng malt thóc này để sản xuất bia nên chúng tôi quan tâm tới enzym amilaza trong quá trình nảy mầm. Đối với đại mạch, thông thường giống có hàm lượng protein càng cao sẽ cho hoạt lực amilaza và proteaza cao hơn so với giống có hàm lượng protein thấp. Để kiểm nghiệm hiện tượng này có tồn tại ở thóc hay không, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sự biến đổi của hệ enzym amilaza ở hai loại P4 và CR203 trong quá trình nảy mầm. Để giảm mức độ nhiễm vi sinh vật thóc được ngâm ở nhiệt độ 25°C và nảy mầm ở hai nhiệt độ 25 và 30 °C. Quá trình nảy mầm diễn ra trong 7 ngày, lấy mẫu hàng ngày để xác định năng lực đường hóa (DC) và α -amilaza (AC). Các kết quả nghiên cứu được trình bày trên bảng 2.

Cũng giống như quá trình nảy mầm của đại mạch, nhiệt độ càng cao thì thời gian đạt hoạt lực cực đại càng nhanh nhưng giá trị ở nhiệt độ cao lại nhỏ hơn so với nảy mầm ở nhiệt độ thấp. Mặt khác, thóc P4 có hàm lượng protein cao hơn CR203 nhưng hoạt lực enzym Diastaza và Amilaza giữa hai giống thóc tương đương nhau. Từ kết quả thu được, chúng tôi nhận thấy để đạt

được giá trị hoạt độ enzym amilaza cao nên ngâm và nảy mầm ở nhiệt độ 25°C là thích hợp hơn cả.

Bảng 2: Sự thay đổi năng lực đường hóa và α-amilaza theo thời gian nảy mầm

Thời gian (ngày)	Diastaza				α-amilaza			
	P4		CR203		P4		CR203	
	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C
0	8	8	6	6	0	0	0	0
1	29	32	24	28	12	14	8	8
2	51	56	46	52	28	32	20	22
3	72	78	68	77	45	50	42	46
4	90	98	92	96	61	66	52	64
5	102	101	104	102	75	67	72	68
6	105	97	101	99	78	64	78	68
7	99	90	97	95	76	61	77	66

3.4. Tối ưu hóa quá trình nảy mầm của giống thóc P4

Quá trình nảy mầm dẫn đến một số biến đổi rất lớn từ hoạt lực enzym, hàm lượng tinh bột, đường khử và các tổn thất, do vậy yêu cầu xem xét toàn bộ sự biến đổi của quá trình để chọn ra một vùng tối ưu nhất cho sự sản xuất một loại malt nào đó là điều rất cần thiết. Để giải quyết vấn đề này chúng tôi sử dụng ma trận Doehlert.

Như chúng ta đã biết, quá trình nảy mầm phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố: thời gian nảy mầm, nhiệt độ, điều kiện thông khí, độ ẩm, nồng độ chất kích thích. Trong nghiên cứu này chúng tôi tối ưu hóa quá trình nảy mầm với 2 yếu tố chính là: nồng độ Gibberellin (X_1), sử dụng trong khoảng 0,1 - 0,9 mg/kg và thời gian nảy mầm (X_2) từ 72 tới 168 h. Các yếu tố khác có ảnh hưởng tới quá trình nảy mầm được giữ cố định như sau: nhiệt độ ngâm và nảy mầm: 25°C, độ ẩm hạt ngâm bão hòa tới 41%, chúng tôi đã xét ảnh hưởng của 2 yếu tố nồng độ Gibberellin và thời gian nảy mầm lên các đại lượng xác định sau:

- Hoạt lực α-amilaza Y_1
- Năng lực đường hóa Y_2
- Hàm lượng tinh bột Y_3 (%)
- Tổn thất chất khô Y_4 (%)

Các kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 3

Bảng 3: Các kết quả thực nghiệm của ma trận Doehlert

tt	Biến mã hóa		Biến số thực		Các kết quả thí nghiệm			
	X_1	X_2	X_1	X_2	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
1	1	0	1,9	120	154	141	50,5	11,6
2	-1	0	0,1	120	121	120	52,4	5,1
3	0,5	0,866	1,45	162	160	132	49,6	12,6
4	-0,5	-0,866	0,55	78	109	120	54,3	7,4
5	0,5	-0,866	1,45	78	116	131	54,1	7,8
6	-0,5	0,866	0,55	162	151	126	49,5	11,8
7	0	0	1,0	120	140	135	51,1	10,6
8	0	0	1,0	120	137	133	50,9	10,5
9	0	0	1,0	120	137	136	50,9	10,6

Từ các kết quả trên chúng tôi nhận thấy ảnh hưởng của X_1 và X_2 là khá lớn vì khi thay đổi nồng độ X_1 và X_2 trong khoảng nghiên cứu thì AC tăng từ 109 tới 154 đơn vị, còn DC từ 120

tới 141; hàm lượng tinh bột giảm nhưng không đáng kể từ 52,4 xuống còn 49,6%, còn tổn thất trong cả quá trình nảy mầm là 5,1 đến 10,6%.

Từ các kết quả thực nghiệm, chúng tôi tính được các hệ số hồi quy và thu được các phương trình hồi quy như sau:

$$Y_1 = 138,7 + 13,7X_1 + 24,8X_2 - 1,2X_1^2 - 5,8X_2^2 - 1,1X_1X_2$$

$$Y_2 = 134,7 + 9,8X_1 + 2,0X_2 - 4X_1^2 - 8,5X_2^2 - 2,9X_1X_2$$

$$Y_3 = 50,7 - 0,7X_1 + 2,6X_2 - 2,6X_1^2 + 0,8X_2^2 - 1,4X_1X_2$$

$$Y_4 = 10,6 + 0,9X_1 + 2,7X_2 - 0,7X_1^2 - 0,9X_2^2 - 0,2X_1X_2$$

Để hiểu rõ hơn ảnh hưởng của hai yếu tố trên tới từng đại lượng xác định, ta xét riêng từng chỉ tiêu.

* Hoạt lực amilaza (AC): Kết quả cho thấy cả thời gian nảy mầm và hàm lượng gibberellin đều có ảnh hưởng rất lớn đối với hoạt lực α -amilaza. Hàm lượng gibberellin càng lớn, thời gian ngâm càng dài thì hoạt lực AC đạt càng cao. Ngoài ra, ảnh hưởng của thời gian nảy mầm lớn hơn rất nhiều so với ảnh hưởng của hàm lượng gibberellin.

* Năng lực đường hóa (DC): Khác với α -amilaza, năng lực đường hóa hầu như chỉ phụ thuộc nồng độ gibberellin. Thời gian có ảnh hưởng đến chỉ số này, nhưng chỉ khi ở mức lớn và là ảnh hưởng nghịch ($b_{22} = -8,5$). Từ bề mặt đáp ứng chúng tôi có thể kết luận rằng sẽ thu được hoạt lực DC cao nhất, hàm lượng gibberellin nên dùng ở mức lớn 1,7 - 1,9 mg/kg, còn thời gian nảy mầm nên giữ ở mức 5 ngày.

* Hàm lượng tinh bột: Hàm lượng gibberellin và thời gian nảy mầm có ảnh hưởng ngược tới hàm lượng tinh bột, có nghĩa là càng dùng nhiều gibberellin và thời gian nảy mầm càng dài thì hàm lượng tinh bột càng bị giảm tuy rằng không đáng kể. Điều này hoàn toàn hợp lý.

* Tổng tổn thất: trong quá trình nảy mầm thì quy luật biến thiên hoàn toàn tương tự như AC và DC có nghĩa là khi hàm lượng gibberellin dùng càng lớn thì quá trình hô hấp sẽ tăng và càng làm tăng tổng tổn thất hoặc càng kéo dài thời gian nảy mầm. Do đó mục tiêu của quá trình sản xuất malt là làm sao làm tăng hàm lượng các enzym càng lớn càng tốt nhưng giảm tới đa tổng tổn thất.

Qua việc xét từng chỉ tiêu cụ thể, chúng tôi đã tiến hành chọn điều kiện tối ưu cho quá trình nảy mầm để sản xuất malt là:

- Hàm lượng gibberellin: 1,8 - 1,9 mg/kg
- Thời gian: 100 - 110 h

3.5. Chọn phương pháp sấy thích hợp

Nguyên tắc của phương pháp sấy malt vàng là tách ẩm trong malt tươi càng nhanh càng tốt ở nhiệt độ thấp nhằm bảo vệ hoạt lực enzym, giảm lượng melanoidin tạo thành. Thông thường, nhiệt độ sấy không được vượt quá 40°C khi độ ẩm của malt còn lớn hơn 12%. Chúng tôi đã tiến hành xác định sự biến thiên độ ẩm của malt tươi khi sấy ở 40°C với 2 phương pháp sấy: sấy thường và sấy hồng ngoại đều có thông gió.

Các kết quả được trình bày trên bảng 4:

Bảng 4: Sự biến thiên độ ẩm khi sấy thường và sấy hồng ngoại

Thời gian sấy 40°C (h)	Độ ẩm	
	Sấy thường có thông gió	Sấy hồng ngoại có thông gió
0	41,0	41,0
1	33,6	29,2
2	27,4	19,8
3	21,1	14,1
4	16,8	12,0
5	14,5	
6	12,7	
7	11,9	

Sau khi đã đạt tới độ ẩm 12% chúng tôi tiến hành sấy tiếp ở 60°C trong vòng 6h và nâng lên 80°C trong vòng 1 h (bảng 5).

Bảng 5: Các chỉ tiêu của malt thành phẩm sau sấy bằng các phương pháp khác nhau

Chỉ tiêu	Malt sấy bằng phương pháp hồng ngoại	Malt sấy bằng phương pháp thông thường
Năng lực đường hóa	118	106
Hoạt lực amilaza	132	122
Độ hòa tan	62	60

Qua những kết quả thu được chúng ta thấy phương pháp sấy hồng ngoại có tác dụng làm bay hơi ẩm rất nhanh cho nên chất lượng malt thành phẩm được sấy bằng phương pháp hồng ngoại chắc chắn cao hơn phương pháp sấy thông thường, kể cả hoạt lực AC và DC, đồng thời độ hòa tan cũng cao hơn.

IV. KẾT LUẬN

1. Hạt thóc có trọng lượng cũng như kích thước nhỏ hơn hẳn, trong khi đó hàm lượng trấu lại cao hơn, và hàm lượng tinh bột cũng như protein tổng số đều thấp hơn hạt đại mạch.
2. Giống thóc P4 có hàm lượng protein cao hơn, hút nước chậm hơn giống thóc CR203.
3. Khi ngâm và nảy mầm thóc ở nhiệt độ 25°C thì đều cho hoạt lực AC và DC lớn hơn ở nhiệt độ 30°C, nhưng thời gian ngâm và nảy mầm thì sẽ dài hơn.
4. Sử dụng ma trận thực nghiệm cho phép kết luận là hoạt lực α -amilaza và các tổn thất phụ thuộc rất mạnh vào cả hai biến số là nồng độ gibberellin và thời gian nảy mầm. Điều kiện tối ưu của quá trình nảy mầm để sản xuất malt vàng là nồng độ gibberelin 1,7 - 1,9 mg/kg và thời gian nảy mầm là 100 - 110h.
5. Phương pháp sấy hồng ngoại áp dụng để sấy malt vàng cho kết quả cao hơn khi sấy bằng phương pháp thông thường. Chế độ sấy malt vàng khi sử dụng phương pháp sấy hồng ngoại như sau: sấy ở 40°C trong 4h, sau đó giữ ở nhiệt độ 60°C trong 6h, cuối cùng sấy ở 80°C trong 1h.

Summary

Follow the review of Brewing industry in Vietnam at Technical symposium 1999, the amount of barley malt imported every year from 1997 is more than 70000 ton with more than 30 million USD for importing barley malt. In order to reduce the cost of beer, find out the way to produce the beer with reduced barley malt and use some kinds of local raw materials in Vietnam. In this research, some kinds of paddy in Vietnam named CR203, P4 with protein content higher and the layer of husk thinner are used. Some technical suitable conditions for making rice malt have found by experiment and by program of NEMROD. In germination, diastatic power, α -amylase power at all is mainly depended on two various as concentration of gibberellin and time of germination. For making rice pale malt, rice black malt and rice caramel malt as follow: 1,8 - 1,9 mg/kg and 100 - 110 hrs; 1,8 - 1,9 mg/kg and 125 - 130 hrs; 1,4 - 1,6 mg/kg and 150 - 160 hrs respectively.

For dried rice malt, using infrared rays better than normal drying with the suitable process as: 40°C in 4 hrs; 60°C in 6 hrs, finally 80°C in 1 hr for pale rice malt, at 50°C in 10 hrs, raise 105°C in 4 hrs and keeping 105°C in 2 hrs and 30 minutes for rice black malt.

We hope that these results are applied in Vietnam.

Tài liệu tham khảo

1. Trương Thị Thủy. Nghiên cứu điều kiện tối ưu tới quá trình tạo enzym từ hạt thóc nảy mầm của Việt nam và ứng dụng của nó. Hà nội 1996
2. Takane Matsuo, Kiyochika Hoshikawa. Science of the rice plant. Vol.1: Morphology. Food and Agriculture Police Research Center. Tokyo. 1993
3. Takane Matsuo, Kikuo Kumazawa, Ryuichi Ishii, Kuni Ishihara and Hiroshi Hirata. Science of the rice plant. Vol 2: Physiology. Food and Agriculture Police Research Center. Tokyo. 1995
4. Fraser J. Thomson. Technical Malting with Canadian barley. Sixth International Malt and Malting Barley Program. Canada 1997
5. Wolfgang Kunze. Technology Brewing and Malting. VLB Berlin. 1996
6. European Brewery Convention. Symposium on the relationship between malt and beer. Helsinki. November 1980.

USE OF ANTHR CULTURE IN RICE IMPROVEMENT

(Summary)

VU TUYEN HOANG, NGUYEN TAN HINH, NGUYEN MANH SON

HUYNH YEN NGHIA, NGUYEN THI NGA ET AL

Food Crops Research Institute

A number of rice varieties and hybrids were used for anther culture in rice improvement at the Food Crops Research Institute during 1997-2000. Some callus induction media (CIM): N6, L8, B5, D1 and some plant regeneration media (PRM): MS1, MS2, MS3, MS4 were used in the experiments.

The results show that most of the rice genotypes responded in anther culture. However, there was existed the effect of genotype x CIM, and CIM x PRM interaction on callus induction and plant regeneration. The callus induction media L8 and N6 were identified more suitable for callus induction of rice genotypes. Thousands of green plantlets were regenerated and hundreds of double haploid lines were obtained. Some pure promising lines of rice with high yield potential, good quality and other good agronomic traits were identified for further field trails.

ỨNG DỤNG NUÔI CÂY BAO PHẦN TRONG CẢI LƯƠNG GIỐNG LÚA

(Tóm tắt)

VŨ TUYÊN HOÀNG, NGUYỄN TẤN HINH, NGUYỄN MẠNH ĐÔN

HUỲNH YÊN NGHĨA, NGUYỄN THỊ NGA VÀ CTV

Viện Cây lương thực và cây thực phẩm

Trong giai đoạn 1997-2000, tại Viện Cây lương thực và cây thực phẩm đã sử dụng một loạt các giống lúa và tổ hợp lai cho nuôi cấy bao phần để cải lương giống lúa. Một số môi trường tạo callus (CIM): N6, L8, B5, D1 và một số môi trường tái sinh cây (PRM): MS1, MS2, MS3, MS4 đã được sử dụng trong các thí nghiệm.

Các kết quả cho thấy hầu hết các kiểu gen lúa đều có phản ứng trong nuôi cấy bao phần. Tuy nhiên, có sự tồn tại tương tác giữa giống x CIM và giữa CIM x PRM trong việc tạo callus và tái sinh cây. Môi trường tạo callus L8 và N6 được xác định là phù hợp hơn trong việc tạo callus đối với các kiểu gen lúa. Hàng nghìn cây xanh đã được tạo ra và đã thu được hàng trăm dòng lưỡng bội trong quá trình nuôi cấy. Đã xác định và tiếp tục thử nghiệm một số dòng lúa có triển vọng với tiềm năng năng suất cao, chất lượng tốt và có một số tính trạng nông học tốt khác.

VI KHUẨN KHỬ SUNPHAT SIÊU NHIỆT VÀ CHỊU ÁP, PHÂN LẬP TỪ GIẾNG KHOAN DẦU KHÍ MỎ BẠCH HỔ, VŨNG TÀU

LẠI THUY HIỀN, ĐỖ THU PHƯƠNG, PHẠM THỊ HẰNG, VƯƠNG THỊ ANGA,
NGUYỄN VĂN LONG, KIỀU QUỲNH HOA, LÊ PHI ANGA.
Viện Công nghệ Sinh học. Trung tâm KHTN&CNQG.
LÊ NHƯ TIÊU, NGUYỄN THỊ PHÚC, NGUYỄN VĂN AN.
Viện Dầu khí.

I. MỞ ĐẦU

Vi khuẩn khử sunphat là loại vi khuẩn kỵ khí bắt buộc, sống trong các tích tụ đáy của sông, hồ, biển, trong lớp đáy của các bể chứa xăng dầu, trong nước via các giếng khoan dầu khí.

Loại vi khuẩn này lần đầu tiên được biết đến từ năm 1895 do Beijerinck phân lập từ ống dẫn nước. Năm 1926 một người ở Mỹ và một người ở Nga cùng tìm thấy vi khuẩn khử sunphat trong các bể dầu. Từ đó đến nay, vi khuẩn khử sunphat được nhiều tác giả quan tâm vì vai trò quan trọng chúng trong quá trình chuyển hoá lưu huỳnh, hình thành dầu mỏ, khả năng làm sạch nước thải loại bỏ các hợp chất mang độc tính cao, khả năng sử dụng dầu thô trong điều kiện kỵ khí...

Mặt khác, vi khuẩn khử sunphat được đặc biệt quan tâm ở khía cạnh nguy hại mà chúng có thể gây ra cho các ngành công nghiệp, nông nghiệp và đời sống. Vì trong quá trình sống, chúng tạo ra một lượng lớn H_2S gây ăn mòn các thiết bị nằm sâu trong lòng đất, gây thối rữa bèo, lúa, làm chết cá hàng loạt. Đối với công nghiệp dầu khí, vi khuẩn khử sunphat không chỉ là tác nhân ăn mòn thiết bị khai thác gây hậu quả nghiêm trọng mà còn gây mùi hôi thối ở dầu thô, gây khó khăn cho việc tách nước khỏi dầu và làm giảm chất lượng các sản phẩm dầu mỏ. Ngoài ra, vi khuẩn khử sunphat còn tạo canxit thứ cấp làm tắc các mạch dẫn dầu.

Sự tồn tại của vi khuẩn khử sunphat trong các giếng khoan dầu khí đã được nhiều công trình nghiên cứu khẳng định. Ở đây, trong điều kiện cụ thể của Việt Nam, chúng tôi muốn khảo sát những địa điểm nào trong khu vực khai thác mỏ Bạch Hổ tồn tại vi khuẩn khử sunphat, khả năng chịu nhiệt, chịu áp cũng như vai trò của chúng trong việc tạo ra H_2S .

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Mẫu phân tích: Mẫu dầu và nước lấy tại 17 giếng khoan dầu khí thuộc các giàn 3, 6 và 8 mỏ Bạch Hổ bằng van lấy mẫu miệng giếng hoặc bơm ép ngược dòng ngoài cần. Các giếng có độ sâu từ: 3061 - 4935m; nhiệt độ vỉa: 110 - 140°C, áp suất từ: 200 - 300 atm; hàm lượng H_2S từ: 1 - 28ppm.

2. Môi trường nuôi cấy: Postgate B cải tiến, cơ chất lactate và acetate; bổ sung 20% nước biển, các nguyên tố vi lượng và hỗn hợp vitamin đảm bảo cho sự phát triển của vi khuẩn. Nồng độ muối và pH của môi trường phù hợp với từng địa điểm lấy mẫu.

3. Xác định số lượng vi khuẩn khử sunphat bằng phương pháp pha loãng tới hạn, nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ cao (60°C) và nhiệt độ thường (nhiệt độ phòng) với hai nguồn cơ chất lactate và acetate. Các mẫu được phân tích không quá 6 giờ kể từ khi lấy mẫu.

4. Sơ bộ kiểm tra thành phần chủng loại các vi khuẩn khử sunphat phân lập được theo đặc điểm hình thái và sinh lý sinh hoá của khoá phân loại vi khuẩn (Bergey 1984).

5. Xác định hàm lượng H_2S trong dịch nuôi cấy bằng chuẩn theo iốt của Rezinhicop.

6. Đánh giá khả năng chịu nhiệt độ cao, áp suất cao của vi khuẩn trên thiết bị Vinc technologies mô phỏng theo điều kiện mô hình vỉa oligoxen và móng (110°C - 120°C, 260atm).

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả phân lập vi khuẩn

Kết quả nêu trên bảng 1 cho thấy, thường ở các giếng bơm ép nước, số lượng vi khuẩn khử sunphat khá cao 10^4 - 10^6 tế bào/ml, ở các giếng khai thác số lượng vi khuẩn khử sunphat rất khác nhau, giao động từ 10^1 - 10^5 tế bào/ml. Nhiều giếng khai khác đã phân lập được vi khuẩn khử sunphat chịu nhiệt độ cao thậm chí không cần muối NaCl cho sự sinh trưởng. Chúng tồn ở các giếng khoan này đã tồn tại sẵn các vi khuẩn từ trước khi bơm ép nước biển vào vỉa. Những giếng khoan có số lượng vi khuẩn khử sunphat cần nồng độ NaCl cao cho sự phát triển thì vi khuẩn khử sunphat có nguồn gốc từ nước biển trong quá trình khai thác đã nhiễm vào vỉa và thích nghi với điều kiện ở đây. Như vậy hàm lượng H_2S xuất hiện trong các giếng khoan khai khác một phần là do vi khuẩn khử sunphat sinh ra.

Số lượng vi khuẩn khử sunphat trong các giếng khoan dầu khí mỏ Bạch Hổ đã nghiên cứu cũng tương đương với các tác giả trên thế giới đã công bố. ở các giếng khoan Trung Quốc, số lượng vi khuẩn khử sunphat từ 10^5 - 10^6 tế bào /ml. Các tác giả Đức đã thông báo số lượng vi khuẩn khử sunphat loại acetate lên tới 10^6 tế bào/ml [3]. Ở Nga, theo Nazina, số lượng vi khuẩn khử sunphat cao nhất ở vùng Asperon là 10^5 tế bào/ml [13].

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn khử sunphat trong các giếng khoan giàn 3, 6 và 8 mỏ Bạch Hổ (tế bào/ml)

Giàn	Giếng	Nhiệt độ thường				Nhiệt độ cao			
	Cơ chất	Lac	Ace	Lac	Ace	Lac	Ace	Lac	Ace
	Nồng độ NaCl	2%	2%	0%	0%	2%	2%	0%	0%
3	61	10^2	10^2	10^1	10^1	10^1	10^1	0	0
	64	10^2	10^1	10^1	10^1	0	10^1	10^1	10^1
	193	0	0	10^1	10^1	10^1	10^5	10^1	10^1
	BE 14	10^5	10^4	10^1	10^1	10^4	10^4	10^1	10^1
	NC 14	10^3	10^2	-	-	10^2	10^1	-	-
	73	10^4	10^4	10^1	10^1	10^1	10^1	0	0
	66	10^2	10^2	0	0	10^1	10^1	10^1	10^1
6	BC 100	10^2	10^2	-	-	10^5	10^5	-	-
	120	10^5	10^4	0	0	10^5	10^5	0	0
	80	10^2	10^2	-	-	10^2	10^2	-	-
	81	10^2	10^2	10^1	10^1	10^2	10^2	10^1	10^1
	90	10^2	10^2	-	-	10^2	10^2	-	-
	110	10^2	10^2	10^1	10^1	10^2	0	10^1	10^1
8	BE 100	10^6	10^6	0	0	10^4	10^1	0	0
	806	10^2	10^2	-	-	10^2	10^2	10^1	10^1
	815	10^2	10^2	-	-	10^2	10^2	-	-
	801	10^2	10^2	-	-	10^2	10^1	10^1	10^1
	802	0	10^1	-	-	10^2	10^2	-	-
	BE 820	10^5	10^5	-	-	10^5	10^3	10^1	10^1
BC 100	10^1	10^2	-	-	10^2	10^2	10^1	10^1	

Chú thích: BE: giếng bơm ép; BC: bể chứa dung tích 100m³; NC: mẫu ngoài cần; - không xác định.

2. Thành phần chủng loại các vi khuẩn khử sunphat phân lập được

Qua kết quả quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên nguồn cơ chất vi khuẩn sử dụng, hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử, kết hợp với khoá phân loại của Bergey, có thể thấy thành phần chủng loại vi khuẩn khử sunphat phân lập được từ các giếng khoan mỏ Bạch Hổ rất đa dạng. Vi khuẩn khử sunphat ở đây phần lớn thuộc các chi *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Thermotoga* và một số vi khuẩn cổ chưa được định tên.

Từ các chủng phân lập, đã lựa chọn 3 chủng đại diện có khả năng phát triển tốt ở điều kiện nhiệt độ cao để tiến hành nghiên cứu sâu hơn (14G3, 110G6, 801G8). Hình thái tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử được trình bày ở hình 1, 2.



Hình 1. Chủng 110G6 sau thí nghiệm mô hình vỉa ở 110°C, 260 atm (x 40 000 lần)



Hình 2. Chủng 14G3 sau thí nghiệm mô hình vỉa ở 120°C, 260 atm (x 40 000 lần)

3. Khả năng tạo H₂S của các chủng đã phân lập

Khả năng chuyển hoá nguồn sunphat trong môi trường thành H₂S là đặc điểm nổi bật để nhận biết sự có mặt của vi khuẩn khử sunphat, do đó có thể theo dõi sự phát triển của vi khuẩn thông qua chuẩn độ hàm lượng H₂S. ở các nhiệt độ từ 45 - 55°C, vi khuẩn tạo H₂S không mạnh, phát triển cực đại sau 5- 7 ngày, hàm lượng H₂S cao nhất là 110,5mg/l. ở 70°C, vi khuẩn phát triển cực đại sau 2- 3 ngày nuôi cấy, lượng H₂S sinh ra lên tới 255 mg/l, chứng tỏ vi khuẩn ưa nhiệt ưu thế hơn so với loại ưa ấm (bảng 2-4).

Bảng 2. Hàm lượng H₂S do vi khuẩn khử sunphat sinh ra ở 45°C (mg/l)

Chủng vi khuẩn	Thời gian (giờ)						
	24	48	72	96	120	144	168
14 G3	15	57	59	63	68	68	68
61 G3	25,5	68	68	68	170	136	76,5
64 G3	8,5	59,5	59,5	68	68	68	68
110 G6	17	59,5	59,5	59,5	76,5	76,5	76,5
801 G8	17	42,5	68	68	79	79	79
809 G8	25,5	51	59,5	59,5	81	81	81

Bảng 3. Hàm lượng H₂S do vi khuẩn khử sunphat sinh ra ở 55°C (mg/l)

Chủng vi khuẩn	Thời gian (giờ)						
	24	48	72	96	120	144	168
14 G3	17	83	85	85	103	102	102
61 G3	34	59,5	59,5	76,25	102	102	102
64 G3	17	85	85	85	102	102	102
110 G6	24,5	51	59,5	68	93,5	102	110,5
801 G8	17	42,5	68	93,5	102	115	116
809 G8	25,5	47	61	76,5	109	119	119,5

Bảng 4. Hàm lượng H₂S do vi khuẩn khử sunphat sinh ra ở 70°C (mg/l)

Chủng vi khuẩn	Thời gian (giờ)						
	24	48	72	96	120	144	168
14 G3	19	69	136	137	136	136	133
61 G3	25,5	78,5	176	176	175	170	165
64 G3	17	68	136	137	136	135	130
110 G6	17	76	207,4	210	207	190	190
801 G8	25,5	68	119	115	113	111	100
809 G8	17	93,5	255	256	232	230	220

4. Kết quả thử nghiệm mô hình vỉa

Đã tiến hành thí nghiệm trên mô hình vỉa với 3 chủng lựa chọn: 14 G3 đại diện cho tầng oligoxen, 110 G6 và 801 G8 đại diện cho tầng móng. Điều kiện thí nghiệm: nhiệt độ từ 110 - 120°C, áp suất 260 atm, môi trường nuôi cấy có thành phần phù hợp với địa điểm lấy mẫu của tầng chủng (hình 3). Thời gian theo dõi một mô hình thí nghiệm là 7 ngày.

Khả năng phát triển của các chủng vi khuẩn đã phân lập trong điều kiện mô hình vỉa được đánh giá qua hai thông số: hàm lượng H₂S và số lượng tế bào:

- Chủng 110 G6: Sau 8 giờ ổn định nhiệt độ và áp suất, số lượng vi khuẩn tăng lên từ 10⁴ đến 10⁵ tế bào/ml, hàm lượng H₂S cũng tăng từ 17,0mg/l đến 34,0mg/l. Sau 48 giờ, số lượng vi khuẩn tăng lên 10⁷ tế bào/ml và hàm lượng H₂S cũng tăng lên đến 59,0mg/l. Như vậy, chủng 110 G6 bước đầu đã thể hiện khả năng phát triển ở điều kiện nhiệt độ cao, áp suất cao (bảng 5). Do điều kiện thí nghiệm không ổn định nên chúng tôi đã dừng thí nghiệm sau 48 giờ.

Bảng 5. Kết quả thử nghiệm mô hình vỉa với chủng 110 G6 ở 110°C và 260 atm

Thời gian thử nghiệm (giờ)	Số lượng vi khuẩn khử sunphat (tế bào/ml)		Hàm lượng H ₂ S (mg/l)
	Cơ chất acetate	Cơ chất lactate	
Mẫu ban đầu	10 ⁴	10 ⁴	17,0
0	10 ⁵	10 ⁵	34,0
24	10 ⁶	10 ⁶	51,0
48	10 ⁷	10 ⁷	59,0

- Chủng 14 G3: Sau 8 giờ ổn định nhiệt độ và áp suất, số lượng vi khuẩn tăng lên đến 10³, 10⁴ tế bào/ml, khí H₂S cũng tăng từ 17,0mg/l đến 25,5mg/l. Sau 48 giờ, số lượng vi khuẩn khử sunphat phát triển cực đại đạt 10⁷ tế bào/ml và hàm lượng khí H₂S cũng tăng lên 42,5mg/l. Sau 72 giờ, số lượng vi khuẩn khử sunphat giảm xuống 10⁶ tế bào/ml và giữ số lượng ổn định đến 144 giờ đối với vi khuẩn loại acetate, giảm xuống 10⁴ - 10⁵ tế bào/ml đối với vi khuẩn loại lactate, hàm lượng khí cũng giảm xuống 25,5mg/l do nguồn cơ chất không được bổ sung (hình 3, 4).

- Chủng 801 G8: Sau 8 giờ ổn định nhiệt độ và áp suất, số lượng vi khuẩn khử sunphat tăng lên đến 10³ tế bào/ml, hàm lượng khí H₂S tăng đến 25,5mg/l. Sau 72 giờ, số lượng vi khuẩn khử sunphat phát triển cực đại đạt 10⁶ tế bào/ml và số lượng tế bào duy trì đến 96 giờ, hàm lượng khí H₂S cũng tăng lên 42,5mg/l. Sau 144 giờ, số lượng vi khuẩn khử sunphat giảm xuống 10⁵ tế bào/ml đối với vi khuẩn loại lactate và 10⁴ tế bào/ml đối với vi khuẩn loại acetate. Hàm lượng khí H₂S giảm xuống còn 34,0mg/l (hình 5,6).

Nhiều tác giả trên thế giới đã phân lập được vi khuẩn ưa nhiệt từ các mỏ dầu, nhiệt độ tối đa từ 60 - 100°C [2, 14, 16]. Năm 1993, Stetter đã công bố công trình nghiên cứu về các chủng vi khuẩn khử sunphat siêu nhiệt phân lập từ các giếng khoan dầu khí phía bắc Alaska và vùng biển bắc của Naury ở độ sâu 3000 m, nhiệt độ tối đa từ 80⁰ đến 110⁰C [17]. Các tác giả khẳng định vi khuẩn khử sunphat là nguyên nhân tạo H₂S trong các giếng khoan dầu khí. Ngoài vi khuẩn có sẵn trong giếng khoan, vi khuẩn khử sunphat còn có thể đi vào trong các giếng khoan qua quá trình bơm ép nước hoặc đưa dung dịch khoan vào vỉa.

Các thí nghiệm được tiến hành trên mô hình vỉa với các chủng vi khuẩn nói trên chứng tỏ vi khuẩn khử sunphat có khả năng phát triển trong các giếng khoan và là một tác nhân tạo ra H₂S ở đây, cho dù các vi khuẩn này có sẵn trong giếng khoan hay được lan truyền từ nước biển qua đường bơm ép nước.

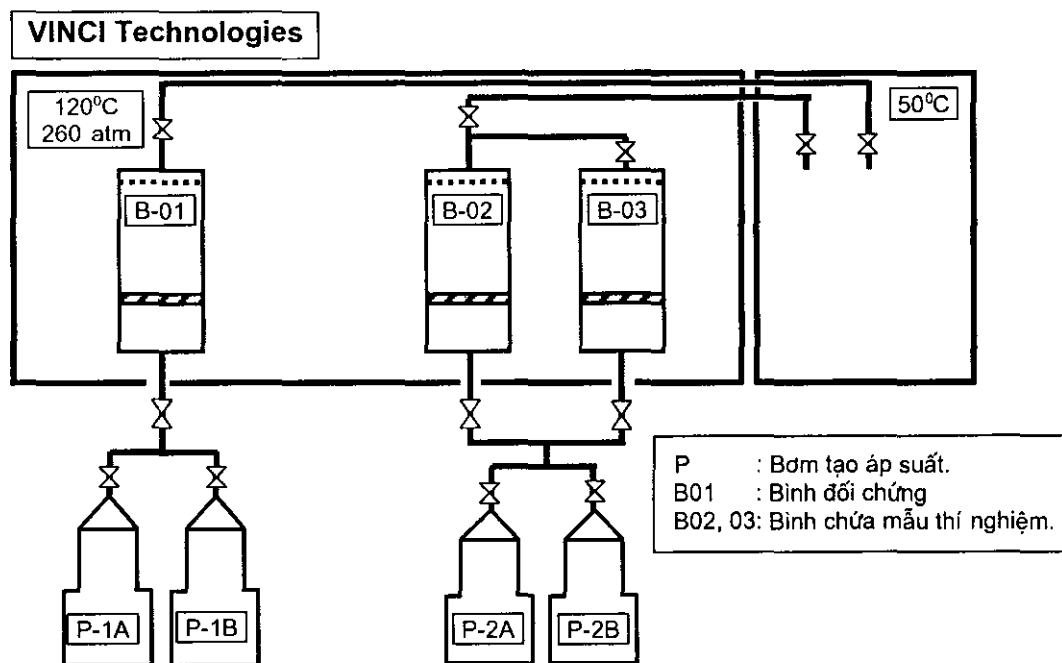
IV. KẾT LUẬN

- Từ 17 giếng khoan lấy mẫu phân tích đều phân lập được vi khuẩn khử sunphat. Trong các giếng bơm ép, số lượng vi khuẩn nhiệt độ thường rất cao, 10⁵ - 10⁶ tế bào/ml. Ở các giếng khai thác từ 10¹ - 10² tế bào/ml, trong đó vi khuẩn có nguồn gốc nước biển nhiều hơn vi khuẩn nội tại. Vi khuẩn khử sunphat nhiệt độ cao trong giếng giếng bơm ép từ 10³ - 10⁵ tế bào/ml, giếng khai thác dao động từ 10¹ - 10² tế bào/ml.

- Vi khuẩn khử sunphat ở mỏ Bạch Hổ rất đa dạng về chủng loại. Gồm các chi *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Thermotoga* và một số vi khuẩn cổ chưa được định tên.

- Xác định được điều kiện phát triển phù hợp cho các chủng vi khuẩn khử sunphat đã phân lập. ở điều kiện 40 - 55°C, vi khuẩn khử sunphat đạt cực đại trong vòng 5 đến 7 ngày, hàm lượng H₂S đạt 110 mg/l. ở điều kiện nhiệt độ cao (70°C), vi khuẩn phát triển mạnh hơn với thời gian ngắn hơn và lượng H₂S sinh ra nhiều hơn, cao nhất 809 G8 lên tới 256 mg/l.

- Kết quả thí nghiệm mô hình via chứng tỏ các vi khuẩn phân lập được có khả năng tạo H_2S trong điều kiện nhiệt độ và áp suất cao của các giếng khoan. Chính vi khuẩn khử sunphát là nguồn gốc sinh hoá của H_2S trong các giếng khoan dầu khí mỏ Bạch Hổ.



Hình 7. Mô hình thí nghiệm với chủng vi khuẩn khử sunphat 801G8 ở điều kiện 120°C, 260atm

Các tác giả chân thành cảm ơn Xí nghiệp Khai thác dầu khí, Vietsovpetro, Viện Vệ sinh Dịch tễ TW và Viện Dầu khí Việt Nam về sự giúp đỡ trong quá trình thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barton L. L., 1995. Sulfate-reducing bacteria. Plenum Press, New York, 243-292.
2. Beeder J., et. al., 1994. *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot North sea oil field waters. Appl. Environ. Microbiol. 66 (4): 1227-1231.
3. Cord-Ruwsich R., Kleinitz W., and Widdel F., 1987. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production, J. Pet. Technol. 97-106.
4. Fardeau M. L. et. al, 1997. *Thermotoga hypogea* sp. nov., a xylanolytic, thermophilic bacterium from an oil - producing well. Inter. J. Sys. Bacteriol. 47(4): 1013-1019.
5. Hamilton W. A., 1991. Sulfate-reducing bacteria and their role in biocorrosion, in: Biofouling and Biocorrosion in industrial water systems. Springer-Verlag, Berlin, 187-193.
6. Hugenholtz P. et al., 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. J. Bacteriol. 180: 366-376.
7. Lai Thuy Hien, Le Phi Nga, Vu Phuong Anh, Dang Phuong Nga, Pham Thu Thuy, Do Thu Phuong, Hoang Hai. Sulfate-reducing bacteria isolated from Vungtau oil field and treatment possibility by biocides, the 11th asian-Pacific corrosion control conference, November 1999. 106: 921-932.
8. Lee W., Lewandowski Z., Nielsen P. H., and Hamilton W. A., 1995. Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: a review, Biofouling, 8: 165-194.
9. Lien T., Beeder J., 1997. *Desulfobacter vibrioformis* sp. nov., a sulfate reducer from a water oil separation system. Inter. J. Sys. Bacteriol., 47 (4): 1124-1128.

10. Magot M., Ravot G., Campaignolle X., Ollivier B., and et al., 1997. *Dethiosulfovibrio* peptidovorans gen. Nov., a New anaerobic slightly halophilic, Thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells. *Inter. J. Sys. Bacteriol.*, 57 (3): 818-824.
11. Miller J. F. et. al., 1988. High - pressure - temperature bioreactor for studying pressure - temperature relationships in bacterial growth and producing. *Biotech and Bioeng.* 31: 407 - 403.
12. Mueller R. et. al., 1996. Characterization of thermophilic consortia from two souring oil reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (9): 3083-3087.
13. Nazina T. N. et al., 1996. *Microbiologia (Russia)*. 65 (3): 403-408.
14. Nelson C.M., et al., 1992. High - pressure, high - temperature bioreactor for comparing effects of hyperbaric and hydrostatic pressure on bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (5): 1789-1793
15. Nilsen. R. K. et al., 1996. Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in North Sea oil field waters and oil reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1793-1798.
16. Orphan V. J. et. al., 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2): 700-711.
17. Rosnes J. T. et. al., 1991. Spore - forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from north sea oil field waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (8): 2302-2307.
18. Stetter K. O. et. al., 1993. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Letters to nature.* 365: 743 - 345.
19. Takahata Y. et. al, 2000. Distribution and physiological characteristics of hyperthermophiles in the Kubiki oil reservoirs in Niigata, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (1): 73 - 79.
20. Tardy-Jacquenod C. et al., 1996. Characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from oil field waters. *Can. J. Microbiol.* 42: 259-266.

SUMMARY

HYPERTHERMOPHILIC AND BAROPHILIC SULFATE - REDUCING BACTERIA ISOLATED FROM BACH HO GAS-OIL WELLS

LAI THUY HIEN, DO THU PHUONG, PHAM THI HANG, VUONG THI NGA,
NGYEN VAN LONG, KIEU QUYNH HOA, LE PHI NGA.

Institute of Biotechnology. (N.C.S.T.)

LE NHU TIEU, NGUYEN THI PHUC, NGUYEN VAN AN.

Vietnam Petroleum Institute

Sulfate - reducing bacteria (SRB) were found and isolated from all of water and crude oil samples of 17 water-injection and crude oil-producing wells. The number of bacteria in the water-injection wells was about one thousand times higher than that in the producing wells. For each of oil - wells, the number of marine original bacteria were higher than number of native bacteria. SRB in Bach-ho oil field were varieties. SRB such as *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Thermotoga* were often found. Some of Archaeobacteria were also found, but not determined yet. Several isolated SRB strains grown at 70°C stronger than at 45 - 55°C were identified as *thermophiles*. At 70°C, 809 G8 strain produced a high amount of H₂S (about 256mg/l) after 4 days. The result in stratal modeling tests indicated that SRB used are able to produce H₂S in high-temperature and high-pressure condition of oil-reservoirs (120°C, 260 atm). These results suggested that SRB play an important role in H₂S production in Bach ho gas-oil wells.

NGHIÊN CỨU TRÍCH LY CÁC HOẠT CHẤT SINH HỌC TỪ NẤM LINH CHI

TS. TRƯƠNG THỊ HÒA, THS. TRƯƠNG HƯƠNG LAN, THS.
NGUYỄN THU HÀ, CN. NGUYỄN THỊ THI, KS. LAI QUỐC PHONG
Viện Công Nghiệp Thực Phẩm

1. MỞ ĐẦU

Nấm Linh chi là một loại dược liệu quý và hiếm, được sử dụng từ rất lâu trong y học cổ truyền của các nước Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản và một số nước á đông khác trong đó có Việt Nam. Linh chi đã được y học Trung quốc xếp đứng đầu trong nhóm " thượng dược" với chức năng điều hòa các hoạt động chuyển hóa trong cơ thể, kéo dài tuổi thọ, tăng khả năng đề kháng của cơ thể đối với những biến động của môi trường xung quanh. Hiện nay, những nghiên cứu hiện đại đã phát hiện ra gần 100 hoạt chất ở nấm Linh chi, trong đó có những nhóm rất quan trọng như triterpenoid, polysaccharid, steroid, axit ganoderic, nguyên tố hiếm germani... [1,2,6]. Những hoạt chất sinh học này có khả năng điều hòa huyết áp, giảm hàm lượng cholesterol trong máu, chống và làm tan khối u ác tính, chống dị ứng, cải thiện chức năng của gan, chống nhiễm mỡ xơ mạch, đái tháo đường, nhược cơ, đặc biệt là khả năng tăng cường hệ thống miễn dịch cho cơ thể. Trong những năm gần đây, Linh chi đã được sử dụng kết hợp với AZT (azidothimidin) để chữa bệnh AIDS [2,3,4,5].

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu:

Sử dụng nấm Linh chi giống Nhật được trồng tại sở Khoa Học, Công Nghệ và Môi Trường Thái Bình, nấm Linh chi Hàn quốc.

Chế phẩm enzym Novozym của Công ty NoVo Nordisk (Đan mạch)

2.2. Phương pháp phân tích:

Thành phần triterpenoid và chất khử của nấm Linh chi được xác định bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nghiên cứu khảo sát các chất có hoạt tính sinh học của nấm linh chi.

3.1.1. Định tính thành phần Triterpenoid

Giá trị quý báu nhất của nấm Linh chi đối với sức khoẻ của con người là có chứa các hoạt chất sinh học. Người ta xác định các chất có hoạt tính sinh học trong nấm Linh cho để phân loại cũng như để đánh giá giá trị dược lý của chúng. Trong số đó, nhóm chất triterpenoid có ý nghĩa quan trọng trong ức chế sinh tổng hợp cholesterol, ức chế giải phóng histamin, ức chế ACE, hạ huyết áp, bảo vệ gan và chống khối u. Vì thế, thành phần triterpenoid trong 3 mẫu quả thể nấm Linh chi M1, M2 và M3 (M1: là mẫu nấm Linh chi giống Nhật được trồng ở Sở KH-CN&MT Thái bình; M2 là loại nấm Linh chi Việt nam mua trên thị trường và M3 là loại nấm Linh chi Hàn quốc) được xác định bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM). Kết quả được thể hiện ở bảng 1 và ảnh 1.

Trên bảng 11 và hình 1, nhận thấy với thuốc thử vanilin-axit photphoric, sắc ký đồ của mẫu M1 và M3 cho các vết R_f với màu sắc và độ đậm như nhau, đặc trưng cho thành phần triterpenoid. Sắc ký đồ mẫu M2 không xuất hiện vết. Điều đó có nghĩa là mẫu nấm linh chi M1 và M3 có hoạt chất triterpenoid rất phong phú, trong khi mẫu M2 không biểu hiện hoạt chất này.

Bảng 1 - Kết quả định tính thành phần triterpenoid ở 3 mẫu nấm Linh chi bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Mẫu	Ký hiệu	Vết số	Rf	Hiện màu với thuốc thử vanilin-axit photphoric quan sát dưới ánh sáng thường
Axít Oleanolic	T1	1	0,45	Xanh da trời
		2	0,59	
Dịch chiết mẫu 1	M1	1	0,48	Xanh lá cây nhạt
		2	0,61	Tím hồng nhạt
		3	0,70	Tím nhạt
		4	0,90	Tím hồng thẫm
Dịch chiết mẫu 2	M2			Không hiện vết
Dịch chiết mẫu 3	M3	1	0,48	Xanh lá cây thẫm
		2	0,63	Tím hồng thẫm
		3	0,70	Tím nhạt
		4	0,89	Tím hồng thẫm

Ngoài ra, mẫu M3 còn có vết phụ với giá trị Rf 0,29-0,30

3.1.2. Định tính các hợp chất khử

Nhóm các hợp chất khử (hay hợp chất có hoạt tính antioxydan) có khả năng ức chế quá trình peroxy hoá các chất hữu cơ (chủ yếu là các axit chưa no ở màng tế bào) do các gốc tự do của oxy hay các dạng oxy hoạt động nói chung trong cơ thể gây ra. Điều đó có nghĩa là các chất khử có vai trò đặc biệt khử các gốc tự do sinh ra trong quá trình lão hoá cơ thể, tăng cường miễn dịch. Hơn thế nữa, các hợp chất khử có khả năng tan trong nước và những dung môi hữu cơ nên dễ dàng đi đến nhiều cơ quan trong cơ thể như não, gan, lá lách, tụy... do vậy càng làm tăng tính hiệu quả của việc chữa bệnh.

Kết quả định thành phần chất khử ở 3 mẫu nấm Linh chi được minh học ở bảng 2 và ảnh 1b

Bảng 2 - Kết quả định tính thành phần chất khử bằng SKLM ở 3 mẫu nấm Linh chi

Mẫu	Ký hiệu	Vết số	Rf	Hiện màu với thuốc thử tetrazolium blue quan sát dưới ánh sáng thường
Chế phẩm Linh chi Nhật	T2	1	0,25	Đỏ nâu
		2	0,32	Đỏ nâu hơi tím
Dịch chiết mẫu 1	M1	1	0,24	Đỏ hơi tím
		2	0,32	Đỏ nâu thẫm
		3	0,40	Tím nâu
Dịch chiết mẫu 2	M2	1	0,22	Đỏ nâu nhạt, hơi tím
		2	0,32	Nâu thẫm
		3	0,35	Nâu tím
Dịch chiết mẫu 3	M3	1	0,23	Đỏ nâu
		2	0,31	Đỏ nâu thẫm
		3	0,35	Nâu tím

Trên bảng 2 và ảnh 1b, với thuốc thử tetrazolium-blue, hệ dung môi T.E.A.F, cả 3 mẫu M1, M2 và M3 đều cho các vết có cùng màu sắc, độ đậm và giá trị Rf đặc trưng của chất khử. Từ những kết quả thu được cho thấy mẫu M3 (quả thể nấm Linh chi Hàn quốc) và M1 (quả thể nấm Linh chi Việt nam, giống Nhật bản) thể hiện rất rõ hai thành phần triterpenoid và chất khử, trong khi đó mẫu M2 chỉ có các hợp chất khử mà không có thành phần triterpenoid. Trong những thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi sử dụng nguyên liệu là mẫu M1 do đó có giá thành thấp và ổn định.

3.2. Nghiên cứu các phương pháp trích ly hoạt chất sinh học từ nấm Linh chi

3.2.1. Nghiên cứu phương pháp trích ly các hoạt chất hòa tan từ nấm Linh chi bằng nước nóng

Mặc dù phương pháp này là phổ biến và đã được sử dụng từ lâu, nhưng điều kiện tối ưu cho quá trình trích ly các chất hòa tan từ nấm Linh chi vẫn chưa được xác định rõ ràng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chiết nấm Linh chi ở nhiệt độ và thời gian khác nhau nhằm thu được hiệu suất trích ly(HSCL) cao nhất. Kết quả được minh họa ở bảng 3.

Bảng 3. ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian đến HSTL các hợp chất hòa tan từ Linh chi

Nhiệt độ Chiết	Nước (ml)	Chiết lần 1				Chiết lần 2		Chiết lần 3		Tổng
		h	°Bx	ml	HSTL %	h	HSTL %	h	HSTL %	HSTL %
80	10	1	0,7	31,5	2,2		1,5		1,2	4,7
	100	1,5	0,9	30	2,7	1	1,4	0,5	1,2	5,3
		2	1,0	30	3,0		1,4		1,1	5,5
90	10	1	0,8	30	2,4		1,7		1,2	5,3
	100	1,5	1,0	29	2,9	1	1,7	0,5	1,1	5,7
		2	1,3	28	3,6		1,6		1,1	6,3
100	10	1	1,6	30	4,8		2,0		0,7	7,5
	100	1,5	2,0	29	5,8	1	2,0	0,5	0,5	8,3
		2,0	2,2	27	5,9		2,0		0,5	8,4

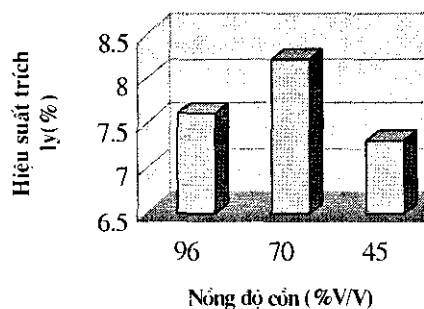
Bảng 3 cho thấy đối với phương pháp chiết bằng nước nóng, ở nhiệt độ 100°C đã cho hiệu suất trích ly cao hơn hẳn so với nhiệt độ 80°C và 90°C (8,4% so với 5,5 và 6,3% tương ứng). Thời gian chiết có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất trích ly, đặc biệt trong lần chiết đầu tiên. Hiệu suất trích ly đạt 7,5% sau khi chiết 2,5h; 8,3% sau thời gian 3h nhưng sau 3,5h hiệu suất trích ly tăng lên không đáng kể (8,4%). Như vậy, các thông số phù hợp cho phương pháp trích ly bằng nước nóng được lựa chọn là: nhiệt độ 100°C, thời gian chiết 3h chia làm 3 lần: lần thứ nhất 1,5h, lần thứ hai: 1h, lần thứ ba: 0,5h.

3.2.2. Nghiên cứu trích ly các hoạt chất hòa tan từ nấm Linh chi bằng cồn

Cồn là một trong những dung môi có khả năng trích ly các chất hòa tan ra khỏi dược liệu khá tốt. Hơn nữa, cồn có khả năng bảo quản dịch chiết không bị hư hỏng trong thời gian dài. Tuy nhiên, nồng độ cồn có ảnh hưởng lớn đến khả năng trích ly các chất hòa tan từ nấm Linh chi.

Bảng 4. ảnh hưởng của nồng độ cồn đến hiệu suất trích ly

Nồng độ cồn (%V)	Lần chiết thứ nhất			Lần chiết thứ hai			Lần chiết thứ ba			Tổng HSTL (%)
	Thời gian (h)	HS TL (%)	Độ màu (OD)	Thời gian (h)	HS TL (%)	Độ màu (OD)	Thời gian (h)	HS TL (%)	Độ màu (OD)	
96	24	4,6	0,249	12	1,8	0,159	12	0,5	0,061	7,6
70	24	5,7	0,648	12	1,9	0,260	12	0,6	0,074	8,2
45	24	5,2	0,496	12	1,7	0,164	12	0,5	0,058	7,3



Hình 1. ảnh hưởng của nồng độ cồn đến hiệu suất trích ly các chất hòa tan từ nấm Linh chi

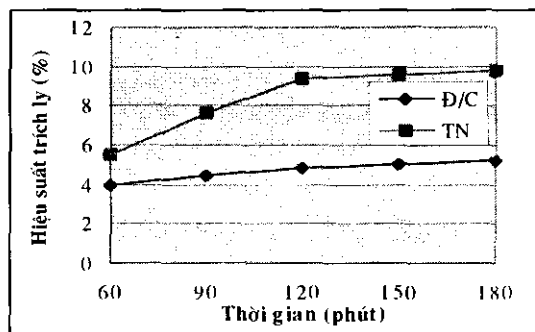
Hiệu suất trích ly và độ màu đạt cao nhất khi chiết ở cồn 70°. Trong lần chiết đầu tiên, hiệu suất trích ly đạt 5,7% và độ màu có giá trị OD = 0,648; cao hơn hẳn các chỉ tiêu tương ứng khi chiết bằng cồn 96° và cồn 45°. Điều này có thể được giải thích là do nấm Linh chi có khá nhiều các hoạt chất sinh học có độ phân cực khác nhau như dầu béo, curmarin, steroid, triterpenoid, các đường, và glucosid Cồn 96° có độ phân cực kém nên chỉ hòa tan được các chất khó phân cực, còn cồn 45° có độ phân cực gần như tương đương với nước nên có khả năng hòa tan các chất có độ phân cực mạnh. Trong khi đó, nhiều hoạt chất có khả năng tan mạnh trong dung môi có độ phân cực ở mức trung bình như cồn 70°.

Để quá trình trích ly được hoàn toàn triệt để, có thể sử dụng cả 3 nồng độ cồn ở những lần chiết khác nhau. Lần thứ nhất : chiết bằng cồn 96°, lần thứ hai : chiết bằng cồn 70°, lần thứ ba: chiết bằng cồn 45°. Bằng phương pháp này, phần lớn các chất hòa tan có độ phân cực khác nhau trong nấm Linh chi đều có thể được chiết ra dung môi, tổng hiệu suất trích ly đạt đến 8,8%.

3.2.3. Nghiên cứu sử dụng enzym để trích ly các hoạt chất hòa tan từ nấm Linh chi.

Vì nấm Linh chi thuộc loại nấm gỗ nên quá trình chiết bằng nước nóng đòi hỏi nhiều thời gian, hiệu suất chiết thu được không cao. Có thể, các chất hòa tan bị giữ lại trong hệ thống lưới xenluloza khá phức tạp của chúng. Hơn nữa, nhiệt độ trích ly cao có thể ảnh hưởng đến một số hoạt chất mẫn cảm với nhiệt độ. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu sử dụng Novozym 342, một chế phẩm enzym là hỗn hợp của xenlulaza và hemixenlulaza để nâng cao hiệu suất trích ly của nguyên liệu, đồng thời rút ngắn thời gian của quá trình chiết. Hình 2 trình bày kết quả nhận được.

Kết quả cho thấy hoạt tính của enzym đã tác động rõ rệt đến cấu trúc của nấm Linh chi, tạo điều kiện cho các chất hòa tan có thể giải phóng ra một cách dễ dàng. Hiệu suất trích ly đạt 9,8%, chứng tỏ rằng phương pháp enzym có khả năng trích ly hiệu quả. Tối ưu hóa quá trình trích ly nấm Linh chi bằng enzym Novozym theo phương pháp quy hoạch toán học thực nghiệm, chúng tôi đã thu được hiệu suất trích ly cao nhất là 10,2% với điều kiện nồng độ enzym 0,21%, nhiệt độ 60°C trong thời gian 120 ph.



Hình 2. Tác động của Novozym đến hiệu suất trích ly các chất hòa tan từ Linh chi

Bảng 5. Kết quả định tính thành phần triterpenoid bằng Sắc Ký Lốp Mỏng ở dịch chiết Linh chi thu được bằng phương pháp enzym và phương pháp chiết cồn

Mẫu	Ký hiệu	Vết số	Rf	Hiện màu với thuốc thử vanilin-axit photphoric quan sát dưới ánh sáng thường
Axit Oleanolic	T1	1	0,53	Tím đỏ thẫm
Dịch chiết bằng enzym	LC 1	1	0,42	Xanh đen nhạt
		2	0,55	Hồng
		3	0,64	Da cam, hơi hồng
		4	0,80	Tím hồng
Dịch chiết bằng cồn	LC 2	1	0,42	Xanh đen
		2	0,55	Hồng
		3	0,65	Da cam, hơi hồng
		4	0,80	Tím hồng thẫm

Bảng 6. Kết quả định tính các hợp chất khử bằng Sắc Ký Lốp Mỏng ở dịch chiết Linh chi thu được bằng phương pháp enzym và phương pháp chiết cồn

Mẫu	Ký hiệu	Vết số	Rf	Hiện màu với thuốc thử Tetrazolium blue dưới ánh sáng thường
Dược liệu Linh chi (chiết bằng methanol)	1	1	0,21	Hồng nhạt, hơi tím
		2	0,28	Tím nhạt
		3	0,32	Tím nhạt
Dịch chiết bằng Enzim Novozym	LC ₁	1	0,21	Hồng tím
		2	0,27	Nâu tím
		3	0,31	Tím nhạt
Dịch chiết bằng cồn	LC ₂	1	0,22	Tím nhạt
		2	0,27	Tím nhạt
		3	0,31	Tím nhạt

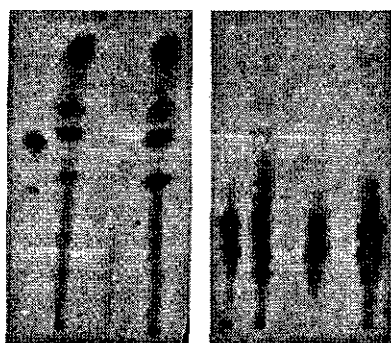
Bảng 5 và ảnh 2a cho thấy sắc ký đồ mẫu LC₁ và LC₂ đều cho các vết đặc trưng của thành phần triterpenoid có cùng màu sắc, độ đậm và giá trị Rf so với dược liệu. Trên ảnh 2b và bảng 6, thành phần chất khử đặc trưng của nấm Linh chi ở 2 mẫu dịch chiết cũng hiện rõ với 3 vết có giá trị Rf là 0,21; 0,27; 0,31 và 0,22; 0,27; 0,31 tương ứng. Ngoài ra LC₂ còn có 5 vết với giá trị Rf < 0,5. Trong dịch chiết LC₁ và LC₂ còn có đầy đủ 21 axit amin thay thế và không thay thế (bảng 7)

Bảng 7. Thành phần axit amin tự do trong dịch chiết nấm Linh chi LC₁ và LC₂ (mg/100ml)

STT	Axit amin	LC ₁	LC ₂	STT	Axit amin	LC ₁	LC ₂
1	Axit aspartic	0,42	0,14	12	Cystein+Cystin	0,06	0,04
2	Axit glutamic	0,71	0,41	13	Valin	0,90	0,72
3	Asparagin	0,08	0,05	14	Methionin	0,03	0,01
4	Serin	0,24	0,17	15	Tryptophan	2,11	0,93
5	Glutamin	0,32	0,19	16	Phenylalanin	0,51	0,25
6	Histidin	1,44	1,37	17	Izoloxin	0,47	0,12
7	Glyxin	0,54	0,25	18	Loxin	0,43	0,03
8	Threonin	0,54	0,21	19	Lyzin	0,54	0,42
9	Alanin	0,90	0,62	20	4-Hydroxy prolin	0,19	0,13
10	Arginin	2,08	0,89	21	Prolin	0,62	0,39
11	Tyrozin	0,34	0,22		Tổng số	13,47	7,56

So với phương pháp trích ly bằng cồn và nước nóng, phương pháp trích ly bằng enzym có những ưu điểm sau: Hiệu suất trích ly cao (10,2 %) so với 8,3% của phương pháp trích ly nước

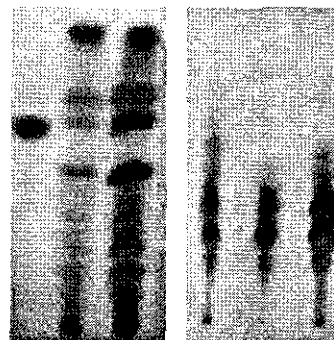
nóng hoặc 8,8 của phương pháp trích ly bằng cồn. Nhiệt độ chiết thấp (60°C) không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của một số chất mẫn cảm với nhiệt độ cao. Thời gian chiết nhanh hơn. Thời gian trích ly là 120 ph, trong khi đó thời gian trích ly bằng nước nóng là 150 ph và bằng cồn ít nhất 48 h.



T₁, M₁, M₂, M₃ T₂, M₁, M₂, M₃
T₁: axit oleanolic; T₂: chế phẩm
Linh chi Nhật Bản của Viện
Dược liệu được để đối chiếu.

Triterpenoid Chất khử

Ảnh 1a và 1 b. Định tính
triterpenoid và chất khử của 3
loại nấm Linh chi.



T₁ LC1 LC2 T₂ LC1 LC2
T₂: axit oleanolic, T₁ Linh chi quả
thể M1

Triterpenoid Chất khử

Ảnh 2a và 2 b. Sắc ký đồ
Triterpenoid và chất khử của
LC1(enzim) và LC2(cồn)

IV. KẾT LUẬN

Đã xác định được thành phần triterpenoid và các hợp chất khử trong nấm Linh chi Việt nam và Hàn quốc. Trong đó, nấm Linh chi giống Nhật trồng ở Thái bình có chứa nhóm triterpenoid với 4 vết Rf là 0,48; 0,61; 0,70 và 0,90, nhóm các hợp chất khử với 3 vết Rf là 0,24; 0,32 và 0,40, đặc trưng cho nấm Linh chi. Đây là những chất có tác dụng điều hoà huyết áp, chống khối u, chống dị ứng, tăng khả năng miễn dịch và chống lão hoá.

Đã nghiên cứu một số phương pháp trích ly các hoạt chất sinh học từ nấm Linh chi sử dụng cho công nghệ sản xuất rượu bổ. Phương pháp trích ly bằng cồn đạt hiệu quả cao 8,8% khi chiết lần thứ nhất bằng cồn 96°, lần thứ hai bằng cồn 70° và lần thứ ba bằng cồn 45°. Phương pháp trích ly sử dụng enzym Novozym (xellulaza) đạt hiệu suất trích ly cao nhất 10,2% ở điều kiện nhiệt độ 60°C, nồng độ enzym 0,21% trong thời gian 120 ph. Ưu điểm của phương pháp trích ly bằng enzym Novozym là hiệu suất trích ly cao, thời gian trích ly ngắn, nhiệt độ trích ly thấp không ảnh hưởng đến một số hoạt chất sinh học mẫn cảm với nhiệt độ cao.

Dịch chiết Linh chi thu được từ phương pháp trích ly bằng cồn hoặc bằng enzym đều có chứa các hoạt chất sinh học quan trọng như triterpenoid, các hợp chất khử và đầy đủ các axit amin thay thế và không thay thế, có thể sử dụng rất tốt trong sản xuất rượu và nước giải khát.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Bùi Chí Hiếu*, 1993. Tìm hiểu tác dụng lâm sàng của nấm Linh chi *Ganoderma lucidum*. Tài liệu tham khảo. Hội thảo lần thứ 3, trang 5-6.
2. *Chang, R.*, 1994, Effective Dose of *Ganoderma* in Humans. In: *Ganoderma* systematics, phytopathology and pharmacology. Proceedings of contributed symposium. 5 th International Mycobiological Congress Vancouver. Aug, p. 14-21.
3. *Ikekawa, T., Nakanishi, M.*, 1968, Antitumoraction of some basidiomycetes, especialy *Phellinus linteus*, Gann, 59, p.155-157.
4. Jonathan Miller. *Culture Shock*, 1989, Here's health. Magazine. UK Feb.
5. Liu, G.T, 1993, Pharmacology and clinical uses of *Ganoderma*. In: *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Edited by S.T. Chung, chapter 28, p.267-273.
6. *Miruno Takashi, Eri Suzuki, Kohji Maki, Hideo Tamaki*, 1994, Fraction, Chemical Modification and Antitumor Activity of Water-insoluble polysaccharide of the fruiting body of *Ganoderma lucidum*, Proceedings of contributed symposium. 5 th International Mycobiological Congress Vancouver. Aug, p. 113-122.

SUMMARY

RESEARCH ON USE OF REISHI FOR NUTRITIOUS LIQUOR PRODUCTION

DR. TRUONG THI HOA, MSC. TRUONG HUONG LAN,
MSC. NGUYEN THU HA, BSC. NGUYEN THI THI,
ENG. LE DINH HUNG, ENG. LAI QUOC PHONG
Food Industry Research Institute

Reishi (*Ganoderma lucidum*) is one of the valuable crude drugs, which has long been used in China, Japan, Vietnam and other countries as a traditional medicine for the treatment of various kinds of diseases. Recent studies have shown that Reishi contains 100 biosubstances, including triterpenoid, polysaccharid, ganoderic acid, germanium. In this study, extracts obtained from fruiting body of Reishi are used to fortified with liquor. Three extract methods are carried out. Extract productivity in hot water method is 8.3%, in etanolic method is 8.8% and in enzyme method is 10.2% (enzyme cellulase). The optimal conditions of extract method by enzyme are: concentration of Novozym is 0,21%, temperature 60°C for 120 minutes. Extracts are rich in triterpenoid, reduced compounds and 21 amino acid.

A EUKARYOTIC LEUCINE ZIPPER PROTEIN OF MITOCHONDRIAL ORIGIN

LE THANH HOA^{1,2}, DAVID BLAIR³, DONALD P. MCMANUS²

¹*Institute of Biotechnology of Vietnam, (N.C.S.T.)*

²*Molecular Parasitology Unit, Australian Centre for International and Tropical Health and Nutrition, The Queensland Institute of Medical Research and The University of Queensland, Australia.*

³*Discipline of Zoology and Tropical Ecology, James Cook University, Townsville, Queensland, Australia.*

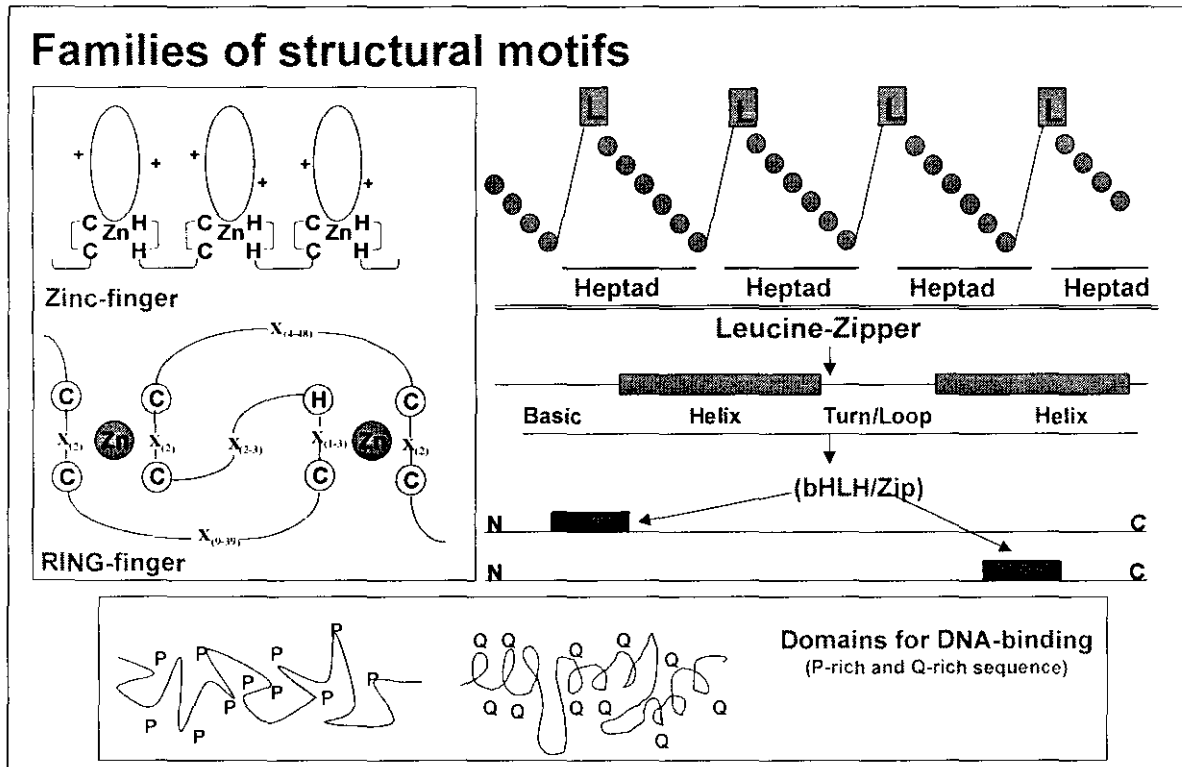
I. INTRODUCTION

Sequence-specific DNA-binding proteins are ubiquitous molecules that play integral roles in many cellular events including transcription, replication, recombination and DNA-correction (MITCHELL and TJIAN, 1989). They are usually grouped into families of structural motifs according to their characteristic DNA-binding domains. These proteins are characterised by short coiled-coil structural domains classified as Zinc-finger/RING-finger (FREEMONT, 1993; SAURIN, 1996), leucine zipper (L-Zip) (LANDSCHULZ *et al.*, 1988) or helix-loop-helix (HLH) motifs (MURRE *et al.*, 1989) (Figure 1). The L-Zip proteins are defined by a pattern of at least four leucine (L) residues repeated every seventh amino acid that mediate protein dimerization through the formation of parallel α -helical dimers (LANDSCHULZ *et al.*, 1988). A L-Zip polypeptide must exhibit a hydrophobic surface and adopt a coiled-coil structure to form and stabilize the intrahelical interaction (LANDSCHULZ *et al.*, 1988, Murre *et al.*, 1989). Usually the zipper is incorporated into a helix-loop-helix conformation called the basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH/Zip) (JIA *et al.*, 1997) (Figure 1). The L-Zip motif has been found in a range of important proteins including those which function as transcription factors in many organisms (MASSARI and MURRE, 2000) where the activation of gene expression occurs through oligomerization of interfaces contained in the helix-loop-helix and L-Zip domains (HARBURY *et al.*, 1994).

To date, all of the several hundred proteins reported as containing the L-Zip and/or bHLH/Zip motifs are nuclear-encoded (MASSARI and MURRE, 2000). Among these, some play a role in regulatory interaction with the mitochondrial genes. These include the mitochondrial transcription termination factor (mTERF) in humans (FERNANDEZ-SILVA *et al.*, 1997), or the RTG gene complex in yeast which functions in a signalling pathway from the mitochondria to the nucleus (CHELSTOWSKA and BUTOW, 1995; ROTHERMEL *et al.*, 1997). No leucine zipper polypeptide has, hitherto, been reported as mitochondrial in origin. In this chapter, we report such a polypeptide, the nicotinamide dehydrogenase subunit 4L (Nad4L). We first identified this in human blood flukes of the genus *Schistosoma* (phylum Platyhelminthes; class Trematoda) but show that this is a common feature in other eukaryotes as well.

The mitochondrial (mt) DNA genome in most animals is a compact, circular molecule, 14-20 kbp in size, typically containing 36 or 37 genes and some tracts necessary for replication and transcription (BOORE, 1999). It contains genes encoding 12 or 13 polypeptides [3 cytochrome oxidase subunits (*cox1-3*); 7 nicotinamide dehydrogenase subunits (*nad1-6*, *nad4L*); 2 adenosine triphosphatase subunits (*atp6*, *atp8*); and a cytochrome oxidase b subunit (*cob*)], each of which is essential in the mitochondrial respiratory chain. Interspersed among the protein-coding genes are 2 ribosomal RNA (large and small subunits, also termed 16S and 12S or *rnl* and *rns*, respectively) genes, 22 transfer RNAs (tRNAs) and a region of non-coding sequence that is variable in size (ZHANG and HEWITT, 1997). The Nad4L polypeptide (encoded by the *nad4L* gene) is a small protein that comprises 98 amino acids in most vertebrates but fewer in flatworms and nematodes, and a variable number in insects (OKIMOTO *et al.*, 1992; KEDDIE *et al.*, 1998; BOORE, 1999; LE *et al.*, 2000a).

Figure 1. Families of structural motifs according to their DNA-binding domain characteristics: Zinc-finger/RING-finger (adapted from MITCHELL and TJIAN, 1989; SAURIN *et al.*, 1996), Leucine zipper (L-



zip), and other domains for DNA-binding (adapted from MITCHELL and TJIAN, 1989).

II. MATERIALS AND METHODS

1. Sequencing of mitochondrial genomes of *Schistosoma* spp.

PCR-amplification, primer-walking sequencing, characterisation of the mt genomes of platyhelminths including *Schistosoma* species and analysis of mt genes was previously described (LE *et al.*, 2000a). Adult specimens of *Schistosoma* were: *S. mansoni* (Puerto Rican, NMRI strain), *S. japonicum* (Chinese, Anhui strain), *S. mekongi* (Khong Island, Laos) and *S. malayensis* (Baling, Peninsular Malaysia).

2. Identification and analysis of Leucine-Zipper motif in schistosomes

Leucine zipper motif sequence in the Nad4L of schistosomes was identified by the Long Motif Analysis program in the MacVector 6.5.3 package (Oxford Molecular Group). Three heptads of the perfect L-Zip were detected in Nad4L of *S. japonicum*, *S. mekongi*, and *S. malayensis* and, subsequently in *S. mansoni* by multi-alignment. Hydrophobicity plots were predicted by Janin algorithm and characteristics of helices by Robson-Garner's algorithm (MacVector 6.5.3).

3. Searching for the mitochondrial Leucine-Zipper motif in eukaryotes

Anticipating that other taxa might also have the L-Zip structure in their Nad4L protein sequences, we performed ENTREZ-searches (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) to collect all the Nad4L or Nad4L-like amino acid sequences available in the GenBank database. Suspecting that not all Nad4L sequences had been found in this way, we proceeded as follows. From the ENTREZ search findings, all well-defined Nad4L sequences were assigned to appropriate taxa (eg. birds, fish), those within each taxon aligned and a consensus sequence produced for that taxon. These consensus amino acid sequences were once again aligned (MacVector 6.5.3; Oxford Molecular Group) to obtain a final consensus sequence which was then used as a query in a PSI-BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/psiblast.cgi>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) with the E value threshold set for less than 0.01 ($E < 0.01$).

III. RESULTS AND DISCUSSION

1. The mitochondrial Leucine-Zipper motif in schistosomes

One of the subunit components of the nicotinamide dehydrogenase (NADH) complex, the Nad4L protein contains an N-terminally located leucine zipper with 3 heptad repeats in a highly conserved domain in one helix, separated from a second helix in the C-terminus by a loop (Figure 2). The L-Zip motif sequence and the confirmation of the two helices was found by submitting the Nad4L amino acid sequences we obtained for several *Schistosoma* spp. to the MacVector 6.5.3 program (using Protein Subsequence Analysis and Protein Analysis Toolbox).

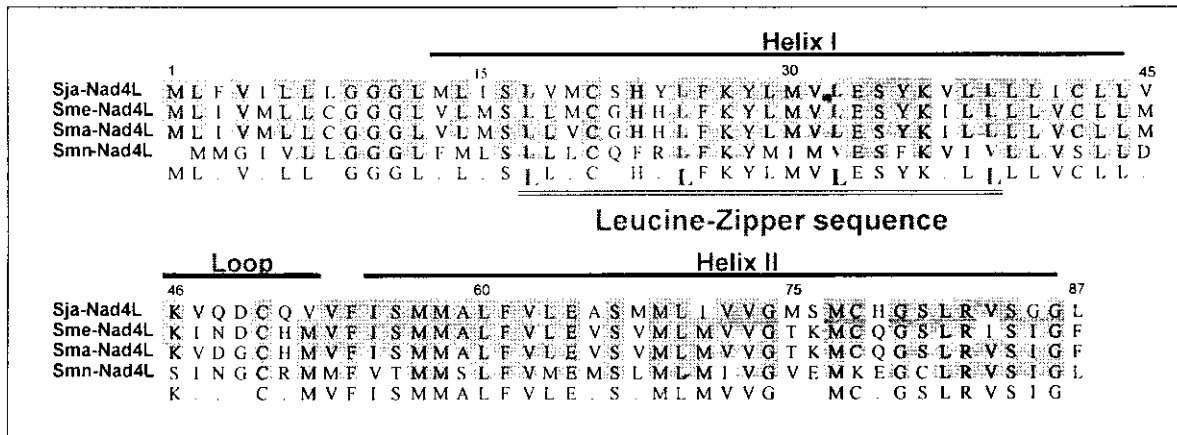


Figure 2. An alignment of the Nad4L protein sequences from *Schistosoma japonicum* (Sja), *S. mekongi* (Sme), *S. malayensis* (Sma) and *S. mansoni* (Smn) which shows the typical leucine zipper motif with four heptad repeated leucine residues (the third and fourth leucine residues are replaced by valines in *S. mansoni*) in one Helix (Helix I) separated from another Helix (Helix II) of hydrophobic residues by a loop.

As shown in Figure 2, the L-Zip sequence in the Asian schistosomes, *Schistosoma japonicum*, *S. mekongi* and *S. malayensis* perfectly exhibits a structural domain with 4 leucine residues in 3 heptads while in the African species, *S. mansoni*, the third and fourth leucines are replaced by valines (V) (LE *et al.*, 2001). The replacement of leucine with valine (or other hydrophobic residues such as methionine or isoleucine) retains the DNA-binding capacity of the polypeptide but the activity is somewhat reduced (LANDSCHULZ *et al.*, 1988, MURRE *et al.*, 1989). The hydrophobicity of the two helices of the Nad4L protein in *Schistosoma* spp. is very high, displaying amphipathic interfaces for putative dimerization in the DNA-binding process which is a characteristic typical of L-Zip polypeptides (MURRE *et al.*, 1989).

2. The mitochondrial Leucine-Zipper motif in eukaryotes

The consensus sequence generated from the Nad4L sequences obtained by ENTREZ search used as query, and some of the hits from the PSI-BLAST search, are shown in Figure 3A. The number of residues in the Nad4L consensus sequence was set at 98, the number most common among metazoans. Three iterations of PSI-BLAST were run and 272 sequences found. Of these, 242 sequences from 230 species, all identified as Nad4L, were found that exhibited a highly conserved N-terminal domain comprising leucine or, alternatively, methionine or valine residues repeated every seventh amino acid position and another domain of hydrophobic residues proximal to the C-terminus (Figure 3A). Figure 3B shows a selection of the sequences found. The species are representative of many animal phyla, including the Mollusca, Annelida, Arthropoda, Echinodermata (data not shown) and Chordata (including the Vertebrata).

International Workshop on Biology. Hanoi – Vietnam 2-5 July 2001

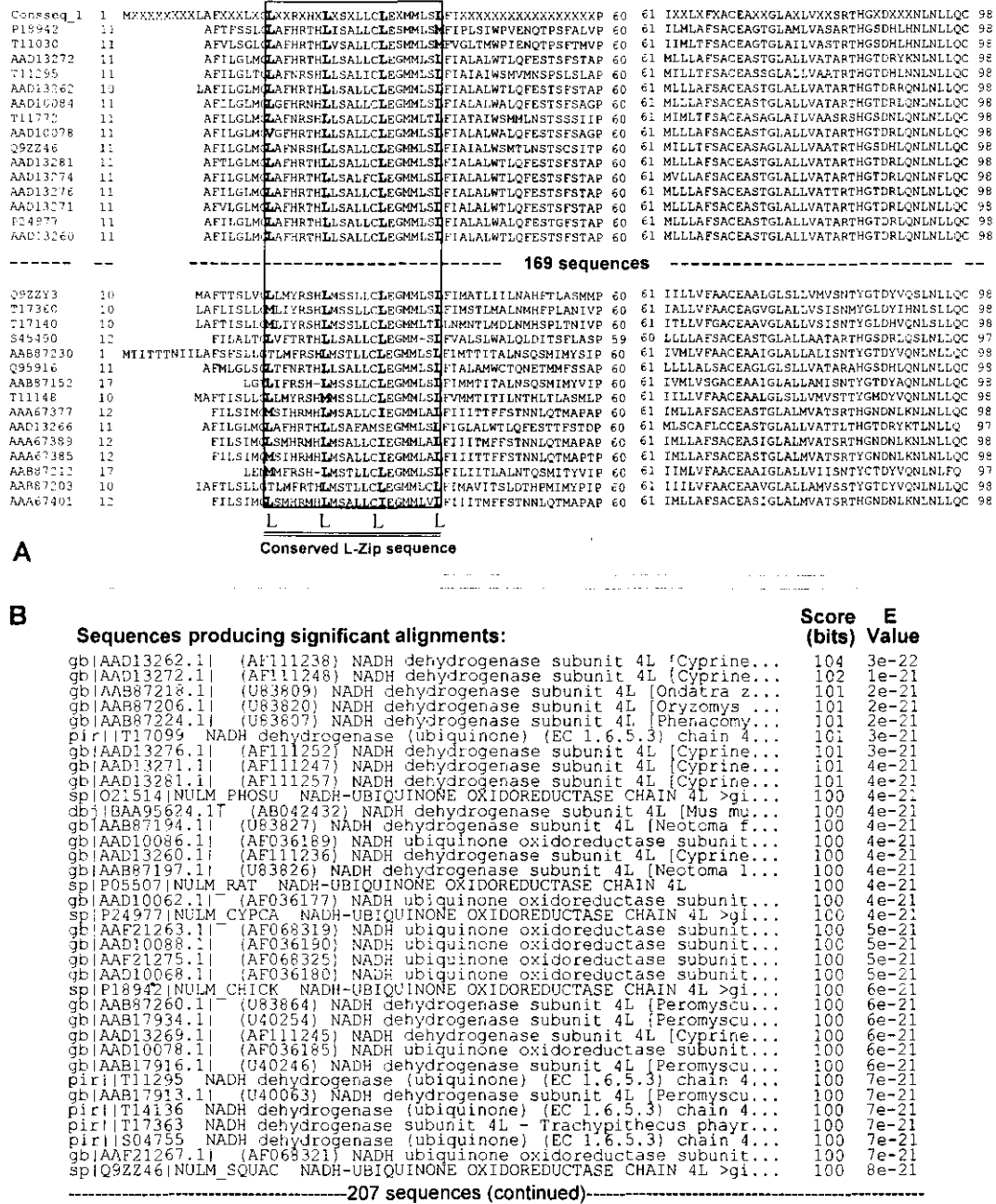


Figure 3. Results of PSI-BLAST search for Nad4L sequences containing the L-zip domain. The final consensus Nad4L sequence (on the top line) produced using MacVector 6.5.3 (see text for details) was used as the query in the PSI-BLAST search. Panel A: An alignment of some of the 199 vertebrate sequences found by PSI-BLAST. The conserved L-Zip sequences are boxed. Panel B: A part of the output following a PSI-BLAST search for Nad4L sequences containing the L-Zip domain. In total, 242 Nad4L sequences, all containing the L-zip, were obtained from diverse species representing many animal phyla.

The sequences, and their taxon-specific consensus sequences, were directly examined for the presence of the L-Zip. In the Vertebrata (where 199 sequences were available for analysis), the L-Zip motif was present in the Nad4L proteins of all the major classes: Chondrichthyes, Osteichthyes, Aves, Rodentia and Primates and other species in the Mammalia, including *Homo sapiens*.

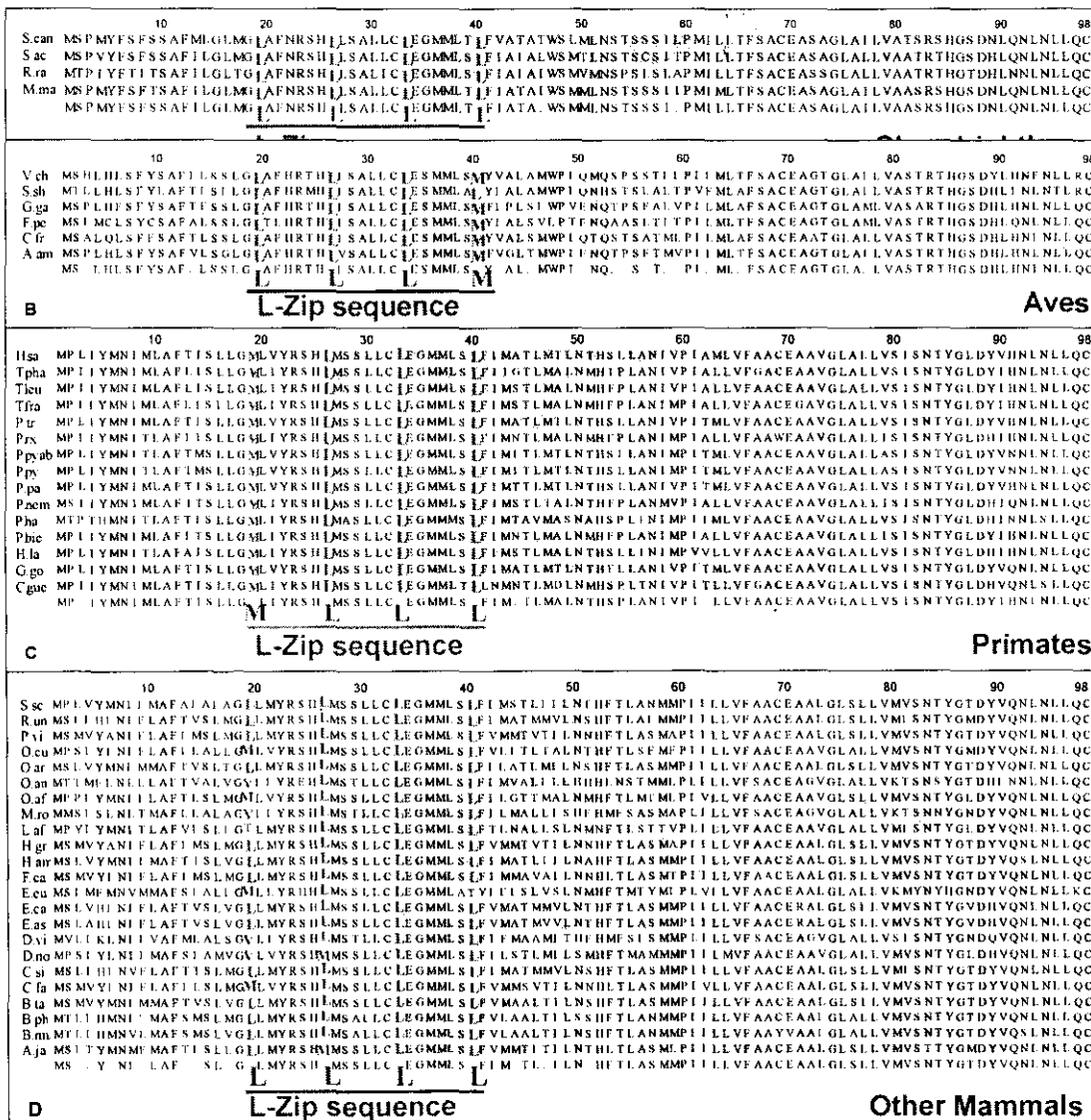


Figure 4. Alignments of Nad4L sequences from a number of vertebrate species representing several classes: Chondrichthyes (panel A), Aves (panel B), Primates (panel C) and other taxa in the Mammalia (panel D). Below each alignment is a consensus sequence. The L-Zip domain is underlined in each case. Names of species are as follows: CHONDRICHTHYES; S.can, *Scyliorhinus canicula*; M.ma, *Mustelus manazo*; R.ra, *Raja radiata*; S.ac, *Squalus acanthias*; AVES; V.ch, *Vidua chalybeata*; S.sh, *Smithornis sharpei*; G.ga, *Gallus gallus*; F.pe, *Falco peregrinus*; C.fr, *Corvus frugilegus*; A.am, *Aythya americana*; PRIMATES; H.sa, *Homo sapiens*; P.bie, *Pygathrix bieti*; T.pha, *Trachypithecus phayrei*; T.leu, *Trachypithecus leucocephalus*; P.nem, *Pygathrix nemaeus*; P.rox, *Pygathrix roxellana*; T.fra, *Trachypithecus francoisi*; C.gue, *Colobus guereza*; P.pyab, *Pongo pygmaeus abelii*; H.la, *Hylobates lar*; G.mo, *Gadus morhua*; P.ha, *Papio hamadryas*; P.py, *Pongo pygmaeus*; G.go, *Gorilla gorilla*; P.pa, *Pan paniscus*; P.tr, *Pan troglodytes*; OTHER MAMMALS; S.sc, *Sus scrofa*; R.un, *Rhinoceros unicornis*; P.vi, *Phoca vitulina*; O.cu, *Oryctolagus cuniculus*; O.ar, *Ovis aries*; O.an, *Ornithorhynchus anatinus*; O.af, *Orycteropus afer*; M.ro, *Macropus robustus*; L.af, *Loxodonta africana*; H.gr, *Halichoerus grypus*; H.am, *Hippopotamus amphibius*; F.ca, *Felis catus*; E.eu, *Erinaceus europaeus*; E.ca, *Equus caballus*; E.as, *Equus asinus*; D.vi, *Didelphis virginiana*; D.no, *Dasybus novemcinctus*; C.si, *Ceratotherium simum*; C.fa, *Canis familiaris*; B.ta, *Bos taurus*; B.ph, *Balaenoptera physalus*; B.mu, *Balaenoptera musculus*; A.ja, *Artibeus jamaicensis*.

Complete Nad4L and the consensus L-Zip sequences of representative groups (which typically show a perfect L-Zip sequence) are illustrated in Figure 4A-D. The L-Zip is highly conserved and is

IV. CONCLUSIONS

Our analysis of Nad4L sequences has revealed highly conserved domains in the polypeptide sequence including the L-Zip, and we conclude that these mitochondrial proteins belong to the leucine zipper family. Therefore, in addition to their well recognized role in oxidative phosphorylation, Nad4L proteins may be pivotally involved in a range of other biological processes such as transcription and/or replication activation or as signal transmitters in communication with the nucleus and other cellular organelles. This may indicate a link between transcription regulation and respiration in mitochondria. Such a critical concept needs to be tested experimentally. This will require functional expression of the *nad4L* gene.

REFERENCES

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. and LIPMAN, D.J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- ATCHLEY, W.R. AND FITCH, W.M. 1997. A natural classification of the basic helix-loop-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5172-5176.
- BOORE, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27, 1767-1780.
- CHELSTOWSKA, A. and BUTOW, R.A. 1995. RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 18141-18146.
- FERNANDEZ-SILVA, P., MARTINEZ-AZORIN, F., MICOL, V. and ATTARDI, G. 1997. The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *EMBO J.* 16, 1066-1079.
- FREEMONT, P.S. 1993. The RING family. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann. New York Acad. Sci.* 684, 174-192.
- JIA, Y., ROTHERMEL, B., THORNTON, J. and BUTOW, R.A. 1997. A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signalling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1110-1117.
- KEDDIE, E.M., HIGAZI, T. and UNNASCH, T.R. 1998. The mitochondrial genome of *Onchocerca volvulus*, sequence, structure and phylogenetic analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95, 111-127.
- LANDSCHULTZ, W.H., JOHNSON, P.F. and MCKNIGHT, S.L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- LE, T.H., BLAIR, D. and McMANUS, D.P. 2001. A leucine zipper protein of mitochondrial origin. *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 435-443.
- LE, T.H., BLAIR, D., AGATSUMA, T., HUMAIR, P.F., CAMPBELL, N.J.H., IWAGAMI, M., LITTLEWOOD, D.T.J., PEACOCK, B., JOHNSTON, D.A., BARTLEY, J., ROLLINSON, D., HERNIOU, E.A., ZARLENGA, D.S. and McMANUS, D.P. 2000. Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders - a cautionary tale from the parasitic flatworms. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1123-1125.
- MASSARI, M.E. and MURRE, C. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* 20, 429-440.
- MITCHELL, P.J. and TJIAN, R. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.
- MURRE, C., MCCAW, P.S., VAESSIN, H., CAUDY, M., JAN, L.Y., JAN, Y.N., CABRERA, C.V., BUSKIN, J.N., HAUSCHKA, S.D., LASSAR, A.B., et al. 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- OKIMOTO, R., MACFARLANE, J.L., CLARY D.O. and WOLSTENHOLME, D.R. 1992. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* 130, 471-498.
- ROTHERMEL, B.A., THORNTON, J.L. and BUTOW, R.A. 1997. Rtg3p, a basic helix-loop-helix/leucine zipper protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains. *J Biol Chem* 272, 19801-19807.
- SAURIN, A.J., BORDEN, K.L.B., BODDY, M.N. and FREEMONT, P.S. 1996. Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* 21, 208-214.
- WOLSTENHOLME, D. R. 1992. Animal mitochondrial DNA, structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 141, 173-216.
- ZHANG, D.X. and HEWITT, G.M. 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 99-120.

LEUCINE ZIPPER-LIKE MOTIFS IN NUOK PROTEIN OF PROKARYOTES

LE THANH HOA^{1,2}, DAVID BLAIR³, DONALD P. MCMANUS²

¹*Institute of Biotechnology of Vietnam, Hoang Quoc Viet st., Cau Giay dist., Hanoi-Vietnam*

²*Molecular Parasitology Unit, Australian Centre for International and Tropical Health and Nutrition, The Queensland Institute of Medical Research and The University of Queensland, 300 Herston Road, Brisbane, Queensland 4029, Australia*

³*Discipline of Zoology and Tropical Ecology, James Cook University, Townsville, Queensland 4811, Australia.*

I. INTRODUCTION

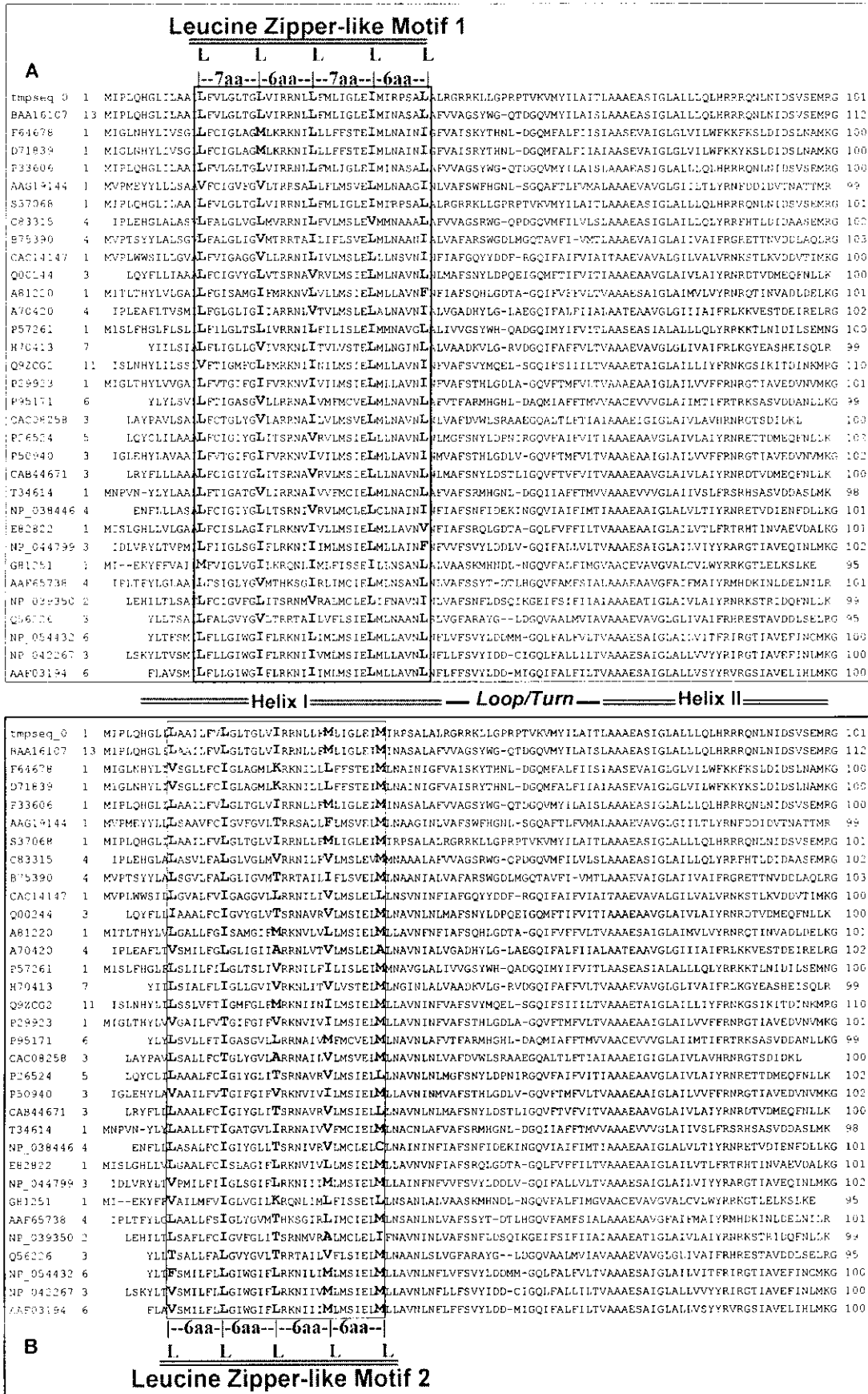
Sequence-specific DNA-binding proteins are ubiquitous molecules that play integral roles in many cellular events including transcription, replication, recombination and DNA-correction (MITCHELL and TJIAN, 1989). They are usually grouped into families of structural motifs according to their characteristic DNA-binding domains. These proteins are characterised by short coiled-coil structural domains classified as Zinc-finger/RING-finger (FREEMONT, 1993; SAURIN, 1996), leucine zipper (L-Zip) (LANDSCHULZ *et al.*, 1988) or helix-loop-helix (HLH) motifs (MURRE *et al.*, 1989). The L-Zip proteins are defined by a pattern of at least four leucine (L) residues repeated every seventh amino acid that mediate protein dimerization through the formation of parallel α -helical dimers (LANDSCHULZ *et al.*, 1988). A L-Zip polypeptide must exhibit a hydrophobic surface and adopt a coiled-coil structure to form and stabilize the intrahelical interaction (LANDSCHULZ *et al.*, 1988, MURRE *et al.*, 1989). Usually the zipper is incorporated into a helix-loop-helix conformation called the basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH/Zip) (JIA *et al.*, 1997). The L-Zip motif has been found in a range of important proteins including those which function as transcription factors in many organisms (MASSARI and MURRE, 2000) where the activation of gene expression occurs through oligomerization of interfaces contained in the helix-loop-helix and L-Zip domains (ATCHLEY and FITCH, 1997). A Leucine-Zipper structure has been found for the first time in a protein of mitochondrial origin, the Nad4L (LE *et al.*, 2001).

In prokaryotes, genes encoding the equivalent of subunits of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase are found to cluster at the *nuo* locus (WEIDNER *et al.*, 1993; DUPUIS *et al.*, 1995) which are equivalent to the mitochondrial complex I: *nad1*, *nad2*, *nad5*, *nad6* and *nad4L* (DUPUIS *et al.*, 1998a; 1998b). The products of the *nuo*-operon are all essential for the biogenesis of the respiratory NADH-ubiquinone oxidoreductase system (FALK-KRZESINSKI, *et al.*, 1998; DUPUIS *et al.*, 1998a; 1998b)

II. MATERIALS AND METHODS

The *nuo*-genes of prokaryotes for Leucine-Zipper motif were inspected. In prokaryotes (e.g. Bacteria) a number of genes at the locus *nuo* (terminology of NADH:ubiquinone oxidoreductase) were identified to be homologous to the mt NADH (ubiquinone oxidoreductase) (WEIDNER *et al.*, 1993; DUPUIS *et al.*, 1995). The *nuo* operon is located in the nuclear genome of bacteria and NuoK is the product of the gene *nuoK*, also known as NADH:ubiquinone oxidoreductase chain K, similar to the mitochondrially encoded *nad4L*. Using *E. coli* NuoK amino acid sequence (GenBank accession number CAA48370) as query, a PSI-BLAST search was carried out with the parameters previously described (ALTSCHUL *et al.*, 1997) to obtain an alignment of all NuoK and related protein sequences.

Figure 1. Results of PSI-BLAST search for prokaryotic NuoK sequences containing the L-zip domain.



III. RESULTS AND DISCUSSION

A number of genes of the gene locus *nuo* of the proton-translocating NADH (ubiquinone oxidoreductase) were identified in *Escherichia coli*, *Rhodobacter capsulatus* and other prokaryotes (WEIDNER *et al.*, 1993; DUPUIS *et al.*, 1995). All subunits of the *nuo*-locus are presumed to bind the substrates and to harbour the redox groups functionally related to the seven mitochondrially encoded ubiquinone oxidoreductases (see DUPUIS *et al.*, 1998), including a gene corresponding to the mitochondrial *nad4L*, termed as *nuoK* (referring to chain K, where this gene is located).

An alignment of 77 *nuoK* and related protein sequences of different prokaryotes (representative of the Bacteria, Archea and primitive Protista) obtained by a PSI-BLAST search using the *E. coli* *nuoK* protein as a query (see above for parameters) identified two L-Zip-like motifs (motifs 1 and 2) in the highly hydrophobic, leucine-rich domain at the N-terminus (Figure 1). L-Zip-like motif 1 has a modified structure with the first leucine (or a replacement residue) occurring in the available complete sequences at residue position 14 followed by other leucine (or valine, isoleucine or methionine as replacement hydrophobic amino acids) residues spaced at 6 or 7 amino acid intervals (panel A). Although there is less conservation in individual Zip residues between species, L-Zip-like motif 2 has the more classical L-Zip structure (LANDSCHULZ *et al.*, 1988) of 3 repeat heptads with the first leucine residue (or equivalent) occurring at position 10 of the available complete sequences (panel B).

IV. CONCLUSION

Thus, as well as reporting a leucine zipper motif in mitochondrial *Nad4L*, we have identified putative L-Zip-like motifs in the prokaryotic equivalent, *NuoK*.

REFERENCES

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. and LIPMAN, D.J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- ATCHLEY, W.R. AND FITCH, W.M. 1997. A natural classification of the basic helix-loop-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5172-5176.
- DUPUIS, A., CHEVALLET, M., DARROUZET, E., DUBORJAL, H., LUNARDI, J. and ISSARTEL, J.P. 1998a. The complex I from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1364, 147-165.
- DUPUIS, A., DARROUZET, E., DUBORJAL, H., PIERRARD, B., CHEVALLET, M., VAN BELZEN, R., ALBRACHT, S.P. and LUNARDI, J. 1998b. Distal genes of the *nuo* operon of *Rhodobacter capsulatus* equivalent to the mitochondrial ND subunits are all essential for the biogenesis of the respiratory NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* 28, 531-541.
- DUPUIS, A., PEINNEQUIN, A., CHEVALLET, M., LUNARDI, J., DARROUZET, E., PIERRARD, B., PROCACCIO, V. and ISSARTEL, J.P. 1995. Identification of five *Rhodobacter capsulatus* genes encoding the equivalent of ND subunits of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Gene* 167, 99-104.
- FALK-KRZESINSKI, H.J. and WOLFE, A.J. 1998. Genetic analysis of the *nuo* locus, which encodes the proton-translocating NADH dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 1174-1184.
- FREMONT, P.S. 1993. The RING family. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann. New York Acad. Sci.* 684, 174-192.
- JIA, Y., ROTHERMEL, B., THORNTON, J. and BUTOW, R.A. 1997. A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signalling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1110-1117.
- LANDSCHULTZ, W.H., JOHNSON, P.F. and MCKNIGHT, S.L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- LE, T.H., BLAIR, D. and McMANUS, D.P. 2001. A leucine zipper protein of mitochondrial origin. *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 435-443.
- MASSARI, M.E. and MURRE, C. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* 20, 429-440.

International Workshop on Biology. Hanoi – Vietnam 2-5 July 2001

MITCHELL, P.J. and TJIAN, R. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.

MURRE, C., MCCAW, P.S., VAESSIN, H., CAUDY, M., JAN, L.Y., JAN, Y.N., CABRERA, C.V., BUSKIN, J.N., HAUSCHKA, S.D., LASSAR, A.B., et al. 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.

SAURIN, A.J., BORDEN, K.L.B., BODDY, M.N. and FREEMONT, P.S. 1996. Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* 21, 208-214.

WEIDNER, U., GEIER, S., PTOCK, A., FRIEDRICH, T., LEIF, H. and WEISS, H. 1993. The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. *J. Mol. Biol.* 233, 109-122.

MITOCHONDRIAL GENOMICS OF PARASITIC PLATYHELMINTHS

LE THANH HOA^{1,2}, DAVID BLAIR³, DONALD P. MCMANUS²

¹*Institute of Biotechnology of Vietnam, (N.C.S.T)*

²*Molecular Parasitology Unit, Australian Centre for International and Tropical Health and Nutrition, The Queensland Institute of Medical Research and The University of Queensland, Australia*

³*Discipline of Zoology and Tropical Ecology, James Cook University, Queensland, Australia.*

I. IMPORTANCE OF STUDYING MITOCHONDRIAL GENOMICS OF PLATYHELMINTHS

Sequences generated from the mitochondrial (mt) genome provide excellent molecular markers for defining population groups, for tracing the genetic history of an individual or a particular group of related individuals, and for constructing deep-branch taxonomic phylogenies. In addition, metazoan mtDNAs exhibit an abundance of genetic novelties that include modified mt genetic codes; an unequalled variety in the secondary structures of ribosomal RNAs; variable base composition (A+T and G+C content) which for vertebrates mostly differs from invertebrates; the characteristic replication mode of the mtDNA molecule; the codon bias in usage for protein-encoding genes; the variable and modified structural forms of mt transfer RNAs; the presence of unassigned sequence(s) known as non-coding regions that are rich in repeated sequences, and the link of mutations in mtDNA to apoptosis and genetic disorders.

Information from mt sequences will be as valuable in studies on genetic variation in parasitic helminths as it has been on vertebrates or insects. Helminth populations are clearly able to respond to selective pressures and therefore, are genetically heterogenous. The use of conventional methods (e.g. isozyme analysis) to obtain direct evidence for variation and to link this variation to evolutionary responses have generally been less successful. Mitochondrial DNA markers offer more hope in this direction than do nuclear sequences. To date, over 130 complete metazoan mt genomes of different phyla have been reported (as of February, 2001), but only limited information on the mt molecules of parasitic flatworms (Phylum Platyhelminthes: Classes Trematoda and Cestoda) has been available. At the commencement of this study, a partial large (16S) subunit mt ribosomal RNA and 3466 bp of mt sequence of *Fasciola hepatica*, short fragments for the mt *cox1* gene for the cestode *Taenia saginata* and *cox1* and *nad1* for several *Schistosoma* spp. were available. Only in 1999, was the first complete mt genome of a flatworm, that of *Echinococcus multilocularis*, deposited in the GenBank database.

The major aim of this study was to obtain complete or near complete mt sequences for several species of parasitic flatworms which are of medical and/or veterinary importance, for comparative analysis. The first step was to obtain sequence for two available clones of mtDNA from *S. mansoni*. This yielded 8068 bp, or over half of the coding region of this species. The work was extended using PCR strategies to obtain the entire coding region for *S. mansoni* and subsequently for *S. japonicum*, *S. mekongi* and a large portion of *S. malayensis* and *S. haematobium*. Complete mt genomes were also obtained for two additional trematodes, *Fasciola hepatica* and *Paragonimus westermani*, two genotypes of *Echinococcus granulosus* (G1 genotype and G4 genotype), and another cyclophyllidean cestode, *Taenia c. ssiceps*.

II. FASCIOLA HEPATICA

The complete nucleotide sequence of the mitochondrial (mt) DNA molecule of the liverfluke, *Fasciola hepatica* (phylum Platyhelminthes, class Trematoda, family Fasciolidae), was determined. It comprises 14,462 bp, contains 12 protein-encoding, 2 ribosomal and 22 transfer RNA genes, and represents the first complete flatworm mitochondrial sequence to be described in detail. All of the genes are transcribed from the same strand. Of the genes typically found in mt genomes of eumetazoans, only *atp8* is absent (Figure 1 and 3). The *nad4L* and *nad4* genes overlap by 40 bp. Most intergenic sequences are very short. Two larger non-coding regions are present. The longer one (817 bp) is located between the *trnG* and *cox3* genes and consists of 8 identical tandem repeats of 85 bp, each rich in G and C,

followed by one imperfect repeat. The shorter non-coding region (187 bp) exhibits no special features and is separated from the longer region by *trnG*. The gene arrangement resembles that of other trematodes including the Asian schistosomes (and *Echinococcus multilocularis*) but it is strikingly different from that of the African schistosomes, represented by *Schistosoma mansoni*. The genetic code is as inferred previously for flatworms. Transfer RNAs range in length from 58-70 bp, producing characteristic 'clover leaf' structures, except for *tRNA*(S₂(UCN)) and *tRNA*(S₁(AGN)) lacking the DHU arm.

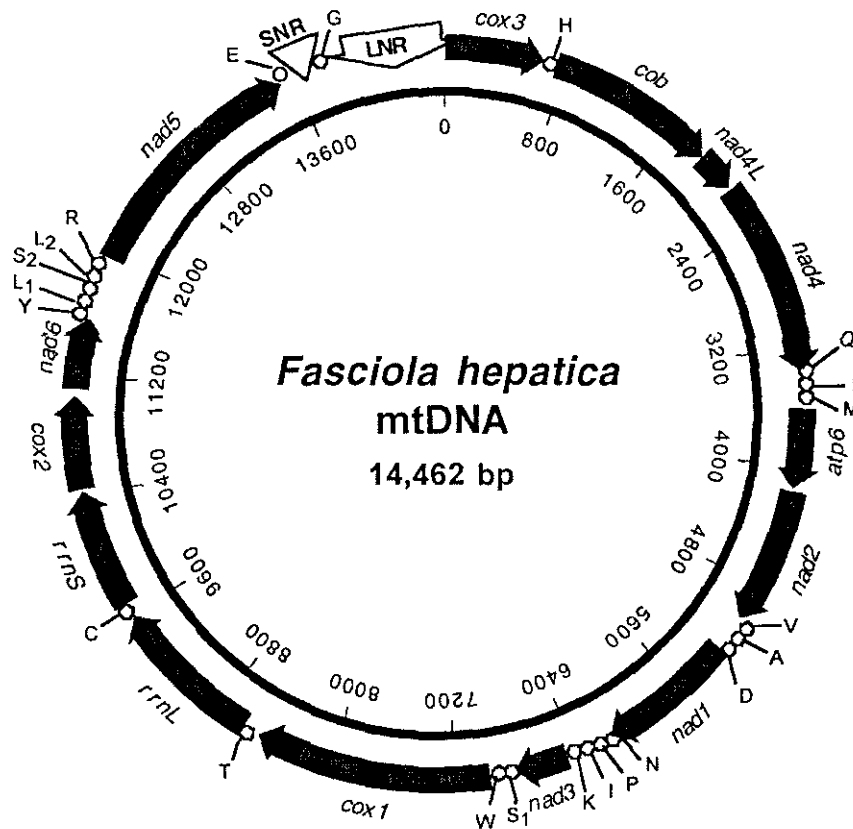


Figure 1. Circular mitochondrial map of the liverfluke, *Fasciola hepatica*

III. SCHISTOSOMA

Complete sequences were also obtained for the coding portions of the mt genomes of *Schistosoma mansoni* (NMRI strain, Puerto Rico; 14,415 bp), *S. japonicum* (Anhui, Chinese strain; 14,085 bp) and *S. mekongi* (Khong Island, Laos; 14,072 bp) (Figure 2-3). Each comprises 36 genes as reported for the mt genome of *Fasciola hepatica*. A large segment (9.6 kbp) of the coding region (comprising 15 tRNAs, 8 complete and 2 incomplete protein-encoding genes) for *S. malayensis* (Baling, Malaysian Peninsula) is also presented. Each genome also possesses a long non-coding region that is divided into two parts (a small and a large non-coding region, the latter not fully sequenced in any species) by one or more tRNAs. The protein-encoding genes are similar in size, composition and codon usage in all species except for *cox1* in *S. mansoni* (609 aa) and *cox2* in *S. mekongi* (219 aa), both of which are longer than homologues in other species. The identity between genes of these two species and those of *S. japonicum* is less (56-83% for amino acids and 73-79% for nucleotides). Identity between the genes of *S. mansoni* and the Asian schistosomes is far less (32-66% for amino acids and 54-68% for nucleotides), an observation consistent with the known phylogenetic distance between *S. mansoni* and the other species. There is a high level of identity (87-94% identity at both the nucleotide and amino acid levels) for all protein-encoding genes of *S. mekongi* and *S. malayensis*.

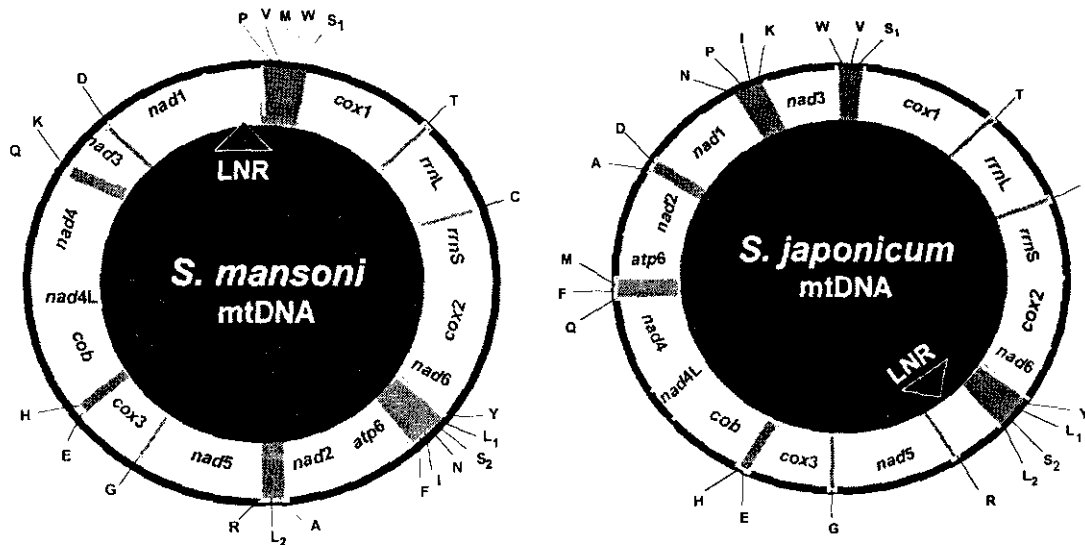


Figure 2. Circular mitochondrial map of the bloodflukes, *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*.

IV. ECHINOCOCCUS AND TAENIA

The complete mt sequences for *Echinococcus granulosus* genotype 1 (EgrG1) (13,588 bp), genotype 4 (EgrG4) (13,598 bp), and *T. crassiceps* (13,503 bp) were determined and compared with that of *E. multilocularis* (Figure 3). The genomes are relatively small and that of *T. crassiceps* is the smallest known among metazoans. All the 36 genes typically found in platyhelminth mtDNA genomes were identified. Homologous genes are of similar length among the cestodes and the protein-coding portions of each genome account for about 74% of the total. The *nad4L* and *nad4* genes overlap by 37 bp. The *cox1* of EgrG4 is shorter by 27 bp (9 aa) than that of the other cestodes. The A+T content differs slightly between the *Echinococcus* species on the one hand (67.0-69.1%) and *T. crassiceps* on the other (74%). There is very low use of C (~8%) in all species. At ~20%, the usage of A in *Echinococcus* species is lower than that in *T. crassiceps* (25.4%) but the usage of G (24-25%) is higher than in the latter (18.3%). These values are consistent throughout the protein and ribosomal coding sequences. As is the case in other platyhelminths, the most commonly used codons encode Phe, Leu, Ser and Val (making up ~50% of the total) whereas Gln, His, Lys, and Arg are the least frequently used. Codons consisting wholly or largely of T [for example, Phe (TTT), Val (GTT) and Leu (TTG)] are frequent and those containing C (CTC, CCC and ACC) are rare. Two short non-coding regions (NR1 and NR2) are separated by *nad5* and several tRNAs. Sizes of each are similar among the species except that NR1 of *E. multilocularis* is 3 times larger than that of other cestodes. The gene arrangement is identical in all species and is typical of that found in other platyhelminths (except *S. mansoni* - Chapter 4) although *trnE* and *trnG* occur in different places relative to trematode mt genomes. The *trnR* and *trnC* genes have a DHU replacement loop, a feature that is never (*trnR*) or only sometimes (*trnC*) observed in the trematodes. EgrG1 differs from EgrG4 at 12.4% of nucleotide (NC) sites and 11.6% of amino acid (AA) sites, a level similar to differences between these two genotypes and *E. multilocularis* (13-15% NC; and 11.5-13.5% AA). In their Nad3 and Atp6 sequences, EgrG6, EgrG7 and EgrG8 do not differ much from each other but are very distinct from EgrG1 and EgrG4. Thus the *E. granulosus* genotypes examined here fall into three groups, EgrG1, EgrG4 and (EgrG6-8), each almost as distant from the others as any is from other distinct species within *Echinococcus*.

Gene arrangement in mtDNA of platyhelminths

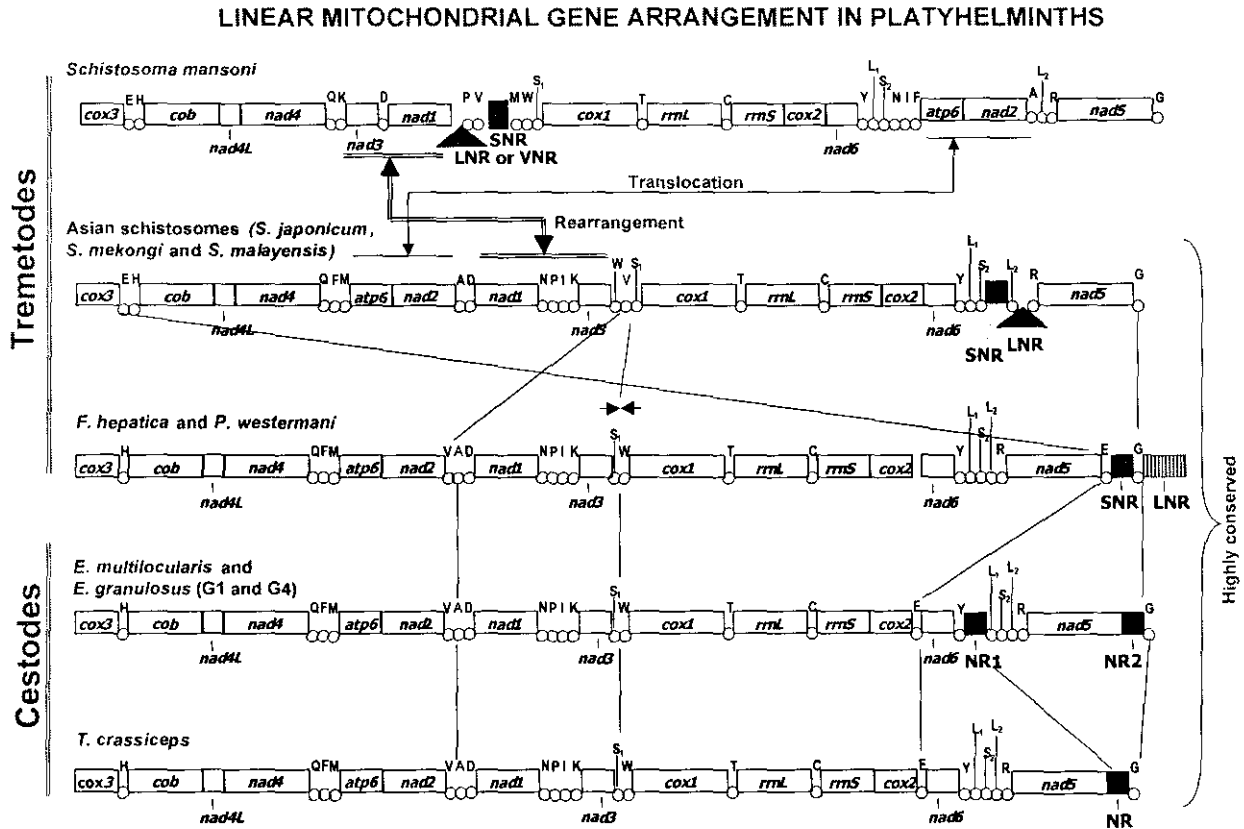


Figure 3. Linear gene arrangement in platyhelminths.

A major finding was the substantial difference in gene order in *S. mansoni* relative to other flatworms including other *Schistosoma* spp. (Figure 3). Two blocks of protein-coding genes are in different positions and a number of tRNAs have translocated. The long non-coding regions are also in different places. The magnitude of the differences in mt gene order between the African and Asian schistosomes is unprecedented among metazoans belonging to the same genus. This result is, nevertheless, consistent with the deep phylogenetic divide between these groups of schistosomes inferred previously from nucleotide sequences. The possibility of major changes occurring even within a single genus indicates that studies using mt gene order for phylogenetic inference should include as diverse a sampling of species within each major taxon as possible.

V. CODON USAGE

Patterns of nucleotide and amino acid codon usage for protein-encoding genes in the mt genomes of selected species in the phylum Platyhelminthes were analysed. Species for which complete or near complete mt genomes were available included *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. malayensis*, *S. haematobium*, *Fasciola hepatica*, *Paragonimus westermani*, *Echinococcus granulosus* (G1 and G4 genotypes) and *Taenia crassiceps*. The available protein-encoding genes for the cestode *E. multilocularis*, and for the two parasitic nematodes, *Ascaris suum* and *Onchocerca volvulus*, were used for comparative analysis. Reassignment of some codons confirmed that in the mt genetic code of platyhelminths, GTG is used as second initiation, TAA as second termination codon as well as ATA specifies isoleucine, AAA asparagine, TGA tryptophan, AGR serine as suggested in a number of other studies. Codons in platyhelminth species end commonly with T and rarely with C, except in *P. westermani*, which uses more C and less T in the third position. Schistosomes and taeniid cestodes are similar in base composition (45.5-50.5% T, 6.7-8.1% C, 18.4-24.4% A and 18.9-24.0% G), with the T+A

content of about 70%, whereas *F. hepatica* and *P. westermani* use less T+A (only 63.5% and 51.5%, respectively). In all species, Phe, Leu, Ser, Val are the most (total about 17% each in each species) and Gln (<1%), His (~1.5%), Lys (1.3-1.8%) and Arg (~1.5-2.1%) are the least frequently used amino acid codons. Some species (*S. mekongi*, *T. crassiceps*, *E. multilocularis*) use no CTC (Leu). Codons for ACC (Thr), GCC (Ala), CCC (Pro) and AAC (Asn) occur very rarely in most species. Schistosomes and taeniid cestodes have a similar pattern of codon usage, but this is different from that in *F. hepatica* and *P. westermani*.

A Leucine-Zipper protein of mitochondrial origin

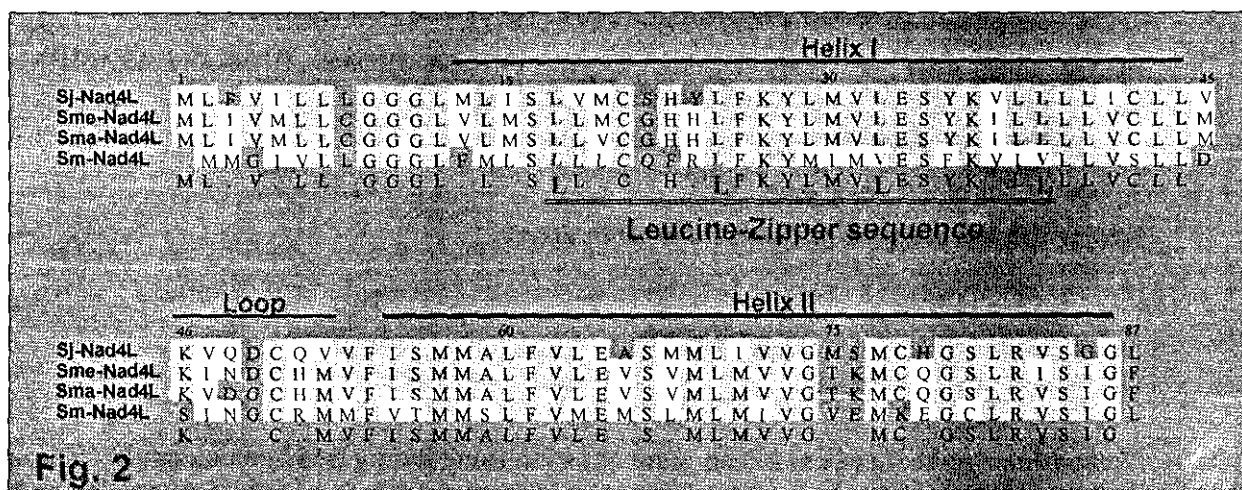


Figure 4. Conserved Leucine-Zipper sequence in Nad4L of human schistosomes

A major finding was the first time identification of the Leucine-Zipper (L-Zip) structural motif, as mitochondrial in origin, in the nicotinamide dehydrogenase subunit 4L (Nad4L) (Figure 4). The L-Zip proteins serving for DNA-binding are defined by a pattern of at least four leucine (L) residues repeated every seventh amino acid that mediates protein dimerization through the formation of parallel α -helical dimers. Usually, the zipper is incorporated into a helix-loop-helix conformation called the basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH/Zip). All of the several hundred proteins hitherto reported as containing the L-Zip and/or bHLH/Zip motifs were nuclear-encoded. L-Zip first identified in *Schistosoma* spp., but subsequently showed that this is a common feature in other eukaryotes as well. Therefore, in addition to their well recognized role in oxidative phosphorylation, Nad4L proteins may be pivotally involved in a range of other biological processes such as transcription and/or replication activation or as signal transmitters in communication with the nucleus and other cellular organelles. This may indicate a link between transcription regulation and respiration in mitochondria. The L-Zip-like motifs in *nuoK*, the prokaryotic equivalent of the Nad4L mitochondrial protein were also identified.

VI. CONCLUSION

The availability of these complete or near complete mt sequences provides an extremely rich and valuable source of genetic markers for phylogenetic analysis and study of genetic variability as well as research aspects for proteomics in the parasitic flatworms. The data will also facilitate studies on the processes of evolution influencing the mt genomes and genes themselves, and may provide new insights into mt function in parasitic flatworms leading to, for example, the identification of more effective drug targets.

SỰ ĐÚT ĐOẠN CỦA HAI NUCLEOTIT Ở ĐẦU 5' GEN CAG A CỦA VI KHUẨN *HELICOBACTER PYLORI*, CHÚNG VIỆT NAM.

TRẦN QUỲNH HOA¹, LÊ BĂNG SƠN¹, NGUYỄN THỊ LỢI¹,
HOÀNG TUẤN ANH¹, NGUYỄN THỊ NGUYỆT¹, BÙI PHƯƠNG THUẬN¹, ĐẶNG ĐỨC TRẠCH² VÀ
NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH¹

1- Viện Công nghệ Sinh học - Trung tâm KHTN&CNQG

2- Viện Vệ Sinh dịch tễ Trung ương

3- Khoa Sinh học, trường đại học Khoa học Tự nhiên, Hà nội

I. MỞ ĐẦU

Helicobacter pylori là các vi khuẩn gram âm sống trong đường tiêu hoá của người. Chúng được xếp vào hai nhóm: nhóm I gồm các chủng *H. pylori* mang một đảo bệnh lý có tên là cagA. Trong khi đó, vi khuẩn của nhóm II không mang đảo bệnh lý này.

Hơn 70 % vi khuẩn *H. pylori* tìm thấy ở bệnh nhân bị viêm loét, ung thư dạ dày cũng như hành tá tràng chứa đảo bệnh lý cag - một đoạn ADN dài khoảng 40 kb trong bộ gen của mình [1]. Vi khuẩn *H. pylori* có thể mang một hay nhiều bản sao của cagA trong bộ gen của mình. Nhiều nghiên cứu cho thấy, đảo bệnh lý cag này hiếm gặp trong các quần thể vi khuẩn phân lập từ những bệnh nhân không thể hiện các triệu chứng rối loạn tiêu hoá.

Trong vô số các gen chứa trong đảo bệnh lý, cagA được nghiên cứu nhiều vì nó mã hoá cho một yếu tố bệnh lý quan trọng của vi khuẩn. Protein cagA có phân tử lượng khoảng 112 kDa và được phốt-pho hoá trong tế bào biểu mô dạ dày [2,3,4,5].

Các rối loạn về tiêu hoá do *H. pylori* ở Việt nam được đề cập, nghiên cứu từ một vài năm gần đây. Cũng như ở nhiều nước trên thế giới, các viêm nhiễm do vi khuẩn *H. pylori* là vấn đề lớn với sức khoẻ cộng đồng của Việt nam [6,7]. Tuy nhiên, rất ít nghiên cứu được tiến hành để tìm hiểu các yếu tố bệnh lý của vi khuẩn.

Trong công trình nghiên cứu này, chúng tôi thông báo kết quả nghiên cứu gen cagA của vi khuẩn *H. pylori* ở người bệnh Việt nam. 460 đôi bazơ của đoạn đầu 5' của gen cagA đã được khuyết đại thành công bằng phương pháp PCR từ ADN sinh thiết của người bệnh bị viêm dạ dày. Đoạn gen nhân lên được tạo dòng và giải trình tự.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu và chọn bệnh nhân: Các bệnh nhân đến khám tại bệnh viện Bưu Điện (Hà nội) sau khi xác định sơ bộ có viêm dạ dày được lấy sinh thiết bằng phương pháp nội soi. Sau khi lấy, sinh thiết được đưa vào dung dịch vận chuyển (theo Seliger H.P.J) i- Dung dịch A: NaCl 8.66 g; KH₂PO₄ : 1.14 g NaHPO₄·2H₂O : 1.6 g; pha trong nước cất, pH=7.3. ii- Dung dịch B : Glucoza 1.5%. Trộn 75ml dung dịch A với 25ml dung dịch B) và bảo quản ở -80°C cho đến khi dùng.

2.2 Phương pháp nghiên cứu.

Tách ADN tổng số từ sinh thiết: Mảnh sinh thiết của bệnh nhân được nghiền tan hoàn toàn trong dung dịch lysis I (10mM Tris-HCl, 50mM EDTA, 0,5% Tween 20) có bổ sung proteinase K. ADN được làm sạch bằng phenol và rửa bằng cồn. Nồng độ và độ sạch của chế phẩm ADN được kiểm tra bằng máy quang phổ ở hai bước sóng 260^{nm} và 280^{nm}, ngoài ra chế phẩm ADN còn được kiểm tra điện di trên gel agarose 0,8%. Chế phẩm ADN được dùng để nhân đoạn gen *cagA*.

Nhân đoạn gen *cagA* bằng kỹ thuật PCR: cặp mồi đặc hiệu U₁, U₂ cho đoạn gen *cagA* được thiết kế dựa trên trình tự gen HPY269870 của vi khuẩn *H. pylori* (Thái lan) đã được các tác giả công bố.

Trình tự của các cặp mồi như sau:

U₁: 5'-ACCATTGATCAAACAACAACACC-3' (từ 13-35)

U₂: 5'-AGGGGGTTGTATGATATTTTCCAT-3' (từ 438-461)

Chu trình nhiệt để tiến hành PCR gồm:

95°C - 5 phút

58°C - 2 phút

72°C - 1 phút

94°C - 1 phút 35 vòng

58°C - 30 giây

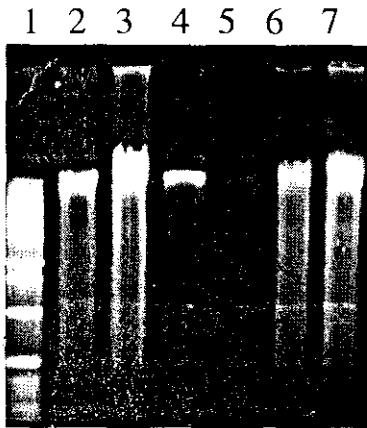
Tạo dòng phân tử ADN: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%. Băng ADN được cắt ra khỏi gel, làm sạch và gắn vào vector pUC 18 bởi T4 ligase. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E.coli* chủng *DH5α* (φ80dlacZΔM15, recA1, endoA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, sup E44, rel A1, deo R, Δ(lac ZYA-arg F) U19) bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C, 2 phút. Sau đó các tế bào được nuôi cấy trên môi trường thạch LB chọn lọc có bổ sung ampicilin 100μg/ml, IPTG 0.1mM, X-Gal 40μg/ml.

Sàng lọc các khuẩn lạc *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp: Các khuẩn lạc *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp có màu trắng được nuôi riêng rẽ trong môi trường LB có ampicillin 100μg/ml. Các plasmid được tách chiết theo phương pháp đã được miêu tả [8]. Sự có mặt của đoạn gen *cagA* được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR theo như đã miêu tả ở trên.

Giải trình tự đoạn gen *cagA*: Trình tự của đoạn gen *cagA* được xác định bằng phương pháp của Sanger [9] có sử dụng đoạn mồi gắn huỳnh quang và phân tích trên máy xác định trình tự tự động MegaBACE 1000. Các chương trình P/C GENE và Blast được sử dụng để phân tích kết quả.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

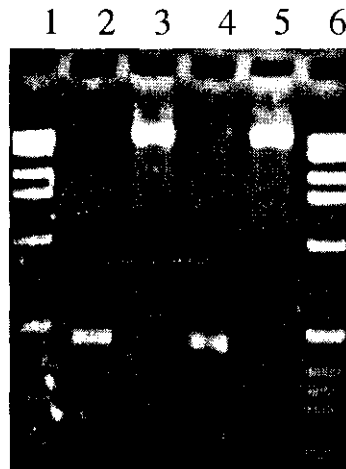
3.1 Nhân gen *cagA* bằng kỹ thuật PCR: Chúng tôi đã tiến hành tách ADN tổng số từ sáu mẫu sinh thiết của bệnh nhân bị viêm, loét dạ dày. Chế phẩm ADN có độ tinh khiết cao và được sử dụng để nhân phần 5' bảo thủ của gen *cagA* bằng kỹ thuật PCR (hình 1)



Hình 1- Điện di đồ chế phẩm ADN tách từ sinh thiết.

1: Marker 1.0 kb ADN ladder
2-7: Chế phẩm ADN tách từ sinh thiết của sáu bệnh nhân

Với cặp mồi đặc hiệu U_1 và U_2 chúng tôi đã nhân thành công đoạn gen *cagA* từ hai trong số sáu mẫu ADN tách chiết từ sinh thiết của người bệnh. Hình 2 cho thấy, chỉ có một băng ADN duy nhất với kích thước khoảng 0,46 kb là được thấy trên gel agarose 0.8%, chứng tỏ đoạn gen *cagA* của vi khuẩn *H. pylori* được nhân một cách đặc hiệu bằng kỹ thuật PCR.



Hình 2: Điện di đồ sản phẩm PCR của gen *cagA*⁺

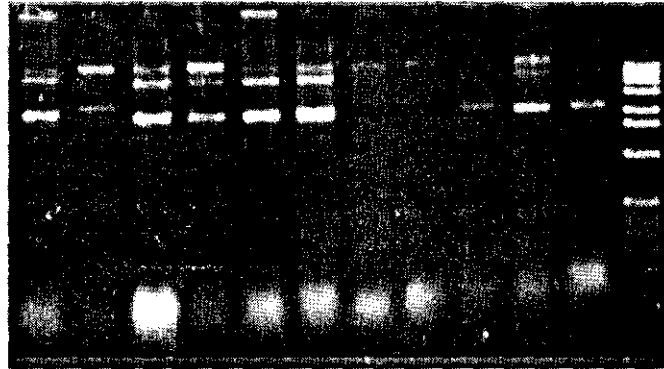
1,6: Marker 1.0 kb ADN ladder
2,4: Sản phẩm PCR từ hai chế phẩm ADN
3,5: Chế phẩm ADN tách từ hai bệnh nhân bị viêm dạ dày.

3.2 Tạo dòng phân tử gen *cagA*: Sản phẩm PCR của gen *cagA* được tách ra khỏi gel, làm sạch, gắn vào vector pUC 18 và biến nạp vào tế bào *E.coli DH5 α* .

Chúng tôi đã nhận được các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chọn lọc LB (ampicilin 100 μ g/ml, 0,1mM IPTG, X-Gal 40 μ g/ml). Các plasmid tách từ các lạc khuẩn nói trên được kiểm tra xem có chứa đoạn ADN bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu U_1 và U_2 (hình 3).

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2%. Một băng ADN có kích thước khoảng 0,46 kb được nhân bản từ ADN plasmid, chứng tỏ đoạn gen *cagA* đã được tạo dòng.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M



Hình 3- Các plasmids được tách chiết từ 11 lạc khuẩn màu trắng sau khi được biến nạp. M: 1kb ADN chuẩn.

3.3 Giải trình tự của đoạn 0.46 kb: Trình tự của đoạn đầu 5' của gen *cagA* với vị trí của mỗi U2 (hình 4) cũng như trình tự suy diễn của protein *cagA* (hình 5) được trình bày dưới đây. Cần lưu ý rằng chúng tôi chỉ nhận được một phần trình tự đoạn gen *cagA* đã tạo dòng. 50 đôi bazơ của phần đầu 5' với mỗi U1 đã bị mất. Nguyên nhân của hiện tượng chưa rõ. Có thể, *cagA* là một protein bất lợi đối với *E.coli*. Do vậy, vi khuẩn đã vô hiệu hoá tác dụng của *cagA* bằng cách làm mất 50 đôi bazơ khỏi đầu 5' và làm đoạn *cagA* lệch khỏi khung mã hoá protein.

U2

AGGGGGTTGTATGATATTTTCCATAAAAATTCGATTTGTTGGGTGTTGATTTTAGACGG
 ATCTTTTTGAAGAGACACCCAACCTCGTAAAGATTGGTAACGCTGATCCCCAAATTTCTT
 AAAGCTATCTATGGAAGAATCTACAGCAATGAGATTGTCTTTGTTGATCAAATCATTGCT
 CTTATTGATAAAGTCTGAAAAATACTGATTCTTTTTGGCAGGATTTTGATCGCTTTATT
 GGCGTATTCTTCCCTTAATTGCGAGATTTTCTCAAAGCTTGCCTGTTATCCTTATCATT
 CTTATCAACGATTGGTTTTTGATCAGGATCAAATGAAGCGACAGCGTTATCAACTTTAAT
 AAAAGCTACTTGAAGATTATTGATAAATCGTTGCGGAACAAAATC.

Hình 4-Trình tự ADN của đoạn đầu 5' gen *cagA*

Phân tích trình tự của đoạn gen *cagA* bằng Blast: *H.pylori* là một trong các vi khuẩn siêu biến do các thông tin di truyền chứa trong hệ gen của chúng có thể thay đổi ở các chủng i) có nguồn gốc địa lý và ii) được phân lập từ các dân tộc khác nhau.

Điều đó thấy rất rõ khi chúng tôi so sánh trình tự của gen *cagA* Việt nam với gen *cagA* của các chủng vi khuẩn *H.pylori* từ nhiều vùng trên thế giới như chủng Thái lan HPY269870(a) của Mỹ HPY269887(b) dưới đây. Lưu ý chủng Việt nam bị thiếu hụt hai nucleotit.

a) So sánh trình tự của gen *cagA* Việt nam với gen *cagA* của chủng vi khuẩn *H.pylori* của Thái lan (HPY269870) .

```
aggggggttgatgatatccccataaaaattc--gatttggtgggtggtgattttaga
|||||
aggggggttgatgatatccccataaaaattcgggatttggtgggtggtgattttaga
```

```
cggatcttttgaagagacaccaactcgtaaagatttggtaacgctgatccccaaa
|||||
cggatcttttggatgggacaccaactcgtaaaaatttggtaacgctgatccccaaa
```

```
tttcttaaagctatctatggaagaatctacagcaatgagattgtctttggtgatcaa
|||||
tttcttaaagctatctacggaagaatctacagcaatgagattgtctttggtgatcaa
```

```
atcattgctcttattgataaagtctgaaaaatactgattcttttggcaggattttt
|||||
atcattgctcttattgatgaagtctgaaaaatactgattcttttggtaggattttt
```

```
gatcgctttattggcgattcttcccttaattgcgagattttctcaaaagcttgctt
|||||
gatcgctttattggcgattcttcccttagttgcgagattttctcaaaagcttgctt
```

```
ggtatccctatcattcttatcaacgattgggttttgatcaggatcaaatgaagcgac
|||||
ggtatccctatcattcttatcaacgattgggttttgatcaggatcaaatgaagcgac
```

```
agcgttatcaactttaataaaagctacttgaagattattgataaatcgttgcggaacaaaatc
|||||
agcactatcaactttaaggaaagccacttgaagattattgataaatcgttgcggaacaaaatc
```

b) So sánh trình tự của gen *cagA* Việt nam với gen *cagA* của chủng vi khuẩn *H.pylori* của Mỹ (HPY269887) .

```
aggggggttgatgatatccccataaaaattc--gatttggtgggtggtgattttagacgg
|||||
aggggggttgatgatatccccataaaaattcgggattcgatcgggtggtgattttagacgg
```

```
atcttttgaagagacaccaactcgtaaagatttggtaacgctgatccccaaatttctt
|||||
atcgtttggatgggacaccaacttgtgaaaattcggtaacgctgatccccaaatttctt
```

```

aaagctatctat jgaagaatctacagcaatga jattgtct tgttgatcaaatcattgct
||||| | | | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
aaagctctttgt jgaagattctacatcaatga attgtc ttgttgattaaatcattgct

cttattgataaagtctgaaaaatactgattctttttggcaggatttttgatcgctttatt
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
cttattgataaagtctgaaaaatactgattctttttggtaggatttttgatcgctttatt

ggcgtattcttccttaattgcgagattttctcaaagcttgctgttatccttatcatt
|| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
ggagattcttccttaattgcgagattccatcaaagcttgctgttatccttatcggt

cttatcaacgattggtttttgatcaggatcaaagaagcgacagcgttatcaacttaat
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
cttatcaatgattggtttttgatcaggatcgatgaagcgacagcgttatcaacttaag
    
```

Mức độ tương đồng của gen *cagA*, chủng Việt nam với *cagA* của các chủng *H. pylori* từ nhiều vùng khác nhau trên thế giới được chỉ ở bảng 1 dưới đây.

Bảng 1- So sánh trình tự nucleotit của gen *cagA*, chủng Việt nam với một số chủng trên thế giới.

chủng	Nguồn gốc	Mã số trên GenBank	Độ tương đồng nucleotít
	HongKong	AJ269858	98%
	Thailand	AJ269863	97%
	China	AJ269859	97%
	Australia	AJ269857	97%
	The Netherland	AJ269885	92%
	Peru	AJ269873	91%
	USA	AF125214	87%

Như đã chỉ ở trên, gen *cagA*, chủng Việt nam tương đồng về trình tự nucleotit với gen *cagA* của nhiều chủng vi khuẩn *H. pylori* từ nhiều vùng trên thế giới. Sự tương đồng trong trình tự giữa chủng Việt nam với chủng Thái lan, Trung quốc, Úc là 97%, trong đó với chủng của Mỹ là 87% . Các đột biến điểm, trong đó sự thay đổi từ g-a., a-c., t-c., a-g., t-g., a-g., g-a...trong trình tự của gen được ghi nhận.

Đặc biệt, khi so sánh gen *cagA* của Việt nam với tất cả các gen chủng nước ngoài, chúng tôi nhận thấy chúng khiếm khuyết hai nucleotid cg do đứt đoạn (hình 4). Điều đó sẽ dẫn đến sự lệch khung mã hoá protein với một vài hậu quả như sau:

- i) xuất hiện stop codon và protein *cagA* sẽ ngắn hơn
- ii) không tạo nên stop codon nhưng protein sẽ có thành phần khác trước do khung dịch mã đã thay đổi.

Trình tự axit amin suy diễn của đoạn gen *cagA*, chủng Việt nam được trình bày ở phía dưới. Như đã thấy, quá trình đứt đoạn của hai nucleotit cg đã không dẫn đến sự xuất hiện của stop codon. Tuy nhiên, nó đã làm xê dịch khung dịch mã protein của gen *cagA* (hình 5)

DFVPQRFINN LQVAFIKVDN AVASFDPDQK PIVDKNDKDN RQAF EKISQL REEYANKAIK NPAKKNQYFSDFI
NKSNDLINKDNLIAVDSSIDSFKKFGD QRYQIFTSWVSLQKDPSKINTQQIEFYGKYHTTP

Hình 5- Thành phần suy diễn của protein *cagA*, chủng Việt nam. Các axit amine gạch dưới được xuất hiện do thay đổi khuôn dịch mã protein do đứt đoạn của hai nucleotit.

So sánh trình tự axit amin suy diễn của đoạn gen *cagA* chủng *H. pylori* ở Việt nam với trình tự tương ứng ở các chủng khác trên thế giới cho thấy, protein *cagA* của chủng Việt nam mang một số axit amine khác lạ EFY GKY HTTP so với RNF MEN IIQPP là những axit amine rất bảo thủ ở nhiều chủng nước ngoài (hình 6)

1. DFVPQRFINN LQVAFIKVDN AVASFDPDQK PIVDKNDRDN RQAF EKISQL REEYANKAIK
NPAKKNQYFS
2. DFVPQRFINN LQVAFIKVDN AVASFDPDQK PIVDKNDRDN RQAF EKISQL REEYANKAIK
NPAQKNQYFS
3. DFVPQRFINN LQVAFIKVDN AVASFDPDQK PIVDKNDKDN RQAF EKISQL REEYANKAIK
NPAKKNQYFS
4. DFVPQRFINN LQVAFIKVDD AVASFDPDQK PIVDKNDRDN RQAF EKISQL REEYANKAIK
NPTKKNQYFS
5. DFVPQRFINN LQVAFIKVGN VVASFDPDQK PIVDKNDRDN RQAF EKISQL REEYANKAIK
NPTKKNQYFS
6. DFVPQRFINN LQVAFIKVDN AVASFDPDQK PIVDKNDRDN RQAF EKISQL REEYANKAIK
NPTKKNQYFS
7. DFVPQRFINN LQVAFLKVDS AVASFDPDQK PIVDKNDRDN RQAF EKISQL REEYANKAIK
NPTKKNQYFS
- 8 . FINN LQVAFLKVDN VVASFDPNQK PIVDKNDRDN RQAFD GISQL REEYANKAIK
NPTKKNQYFS
- 9 . PQRFINN LQVAFLKVDA VA-SYDPDQK PIIDKNDRDN RQAFD GISQL REEYANKAIK
NPTKKNQYFS

DFINKSNDLI NKDNRIAVDS SVDSFEKFGD QRYQIFTSWV SLQKDPSKIN TQQTRNFMEN IIQPP
DFINKSNDLI NKDNLIAVDS SVDSFKKFGD QRYQIFTSWV SLQKDPSRIN TQQIRNFMEN IIQPP
DFINKSNDLI NKDNLIAVDS SIDSFKKFGD QRYQIFTSWV SLQKDPSKIN TQQIEFYGKY HTTP
Phần khác biệt
DFINKTNDLI NKDNLIAVDS SVESFKKFGD QRYQIFTSWV SLQKDPSKIN TQQIRNFMEN IIQPP
DFINKTNDLI NKDNLIAVDS SVESFKKFGD QRYQIFTSWV SLQKDPSKIN TQQIRNFMEN IIQP
DFINKTNDLI NKDNLIAVDS SVESFKKFGD QRYQIFTSWV SLQKDPSKIN TQQIRNFMEN IIQPP
DFINKSNDLI NKDNLIAVDS SVDSFKKFGD QRYQIFTSWV SHQKDPSKIN TQQIRNFMEN IIQPP
DFINKSNDLI NKDNLIAVDS SVDSFKKFGD QRYQIFTSWV SHQNDPSKIN TRSIRNFMEN IIQPP
DFINKSNDLI NKDNLIAVDS SVDSFKKFGD QRYRIFTSWV SHQNDPSKIN TRSIRNFMEN IIQPP

Hình 6- So sánh trình tự suy diễn của protein cagA+ chủng Việt nam (3) với các chủng 1 (Úc), 2 (Hong Kong), 4 (Trung Quốc), 5, 6 (Nhật), 7 (Thái Lan), 8 (Hà Lan) và 9 (Mỹ). Phần khác biệt về axit amin EFYGYKY HTTP của chủng Việt nam so các RNFMEN IIQPP của chủng nước ngoài do quá trình đứt đoạn của hai nucleoit được gạch dưới.

CagA là một yếu tố bệnh lý của vi khuẩn *H. pylori* với những chức năng chưa biết hết. Một vài phòng thí nghiệm trên thế giới đã đưa ra những chứng cứ về việc cagA gắn liền với quá trình viêm nhiễm dạ dày do có khả năng làm hoạt hoá promoter của gen IL-8 của tế bào biểu mô dạ dày. Các bệnh nhân bị nhiễm *H. pylori* mang cagA+ status thường có xu hướng bị bệnh nặng hơn so với cagA- status [10].

Việc phát hiện lần đầu các chủng *H. pylori* Việt nam mang gen cagA bị đứt đoạn hai nucleoit đi đôi với sự xuất hiện của protein cagA có thành phần khác biệt đặt cho các nhà khoa học Việt nam nhiều vấn đề phải suy nghĩ và nghiên cứu tiếp. Đặc biệt, mối liên quan của hiện tượng vừa tìm thấy và ảnh hưởng của nó tới sự biểu hiện và phát triển bệnh ở người Việt nam cần được làm sáng tỏ.

IV. KẾT LUẬN

1- Chúng tôi đã nhân thành công gen cagA từ ADN sinh thiết của người bệnh Việt nam bị viêm dạ dày có nhiễm vi khuẩn *H. pylori*.

2- Đoạn gen cagA nói trên đã được tạo dòng trong vi khuẩn *E. coli*.

3- Trình tự của đoạn đầu 5' của gen cagA đã được giải mã và so sánh với các chủng nước ngoài bằng chương trình Blast. Sự đứt đoạn của hai nucleoit của đoạn gen dẫn đến sự xuất hiện của một protein cagA có thành phần rất khác biệt đã được phát hiện.

* Chúng tôi tiến hành nghiên cứu vi khuẩn *Helicobacter pylori* - căn nguyên của các rối loạn đường tiêu hoá của người. Phần đầu 5' của gen cagA bao gồm 460 đôi bazơ đã được nhân lên và tạo dòng từ ADN tách từ sinh thiết bệnh nhân Việt nam bị viêm dạ dày. Phân tích trình tự của gen cagA cho thấy, sự đứt đoạn hai nucleoit ở đầu 5' của gen cagA, vi khuẩn *H. pylori*, chủng Việt nam dẫn đến sự xuất hiện của protein cagA có thành phần khác biệt.

The deletion of two nucleotides from the 5' end of the cagA gene in the genome of *Helicobacter pylori*, Vietnamese strain.

Abstract

We amplified a 460 bp DNA fragment from the 5' end of cagA gene coding for a virulent factor of *Helicobacter pylori*. In the experiment, DNA extracted from the biopsy of a Vietnamese patient was used as DNA template. The expected PCR product was cloned and sequenced. It was shown that the deletion of two nucleotides from the 5' end of the cagA gene led to the formation of a cagA protein with new composition

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1-Covacci, A and Rappuoli, R (1998) *Helicobacter pylori* : Molecular evolution of a bacterial quasi-species. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 96-102.
- 2-Odenbeit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. and Haas, R (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* cagA into gastric epithelial cells by types IV secretion. *Science* 287: 1497-1500.
- 3-Asahi, M., Azuma, T., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., et al (2000) *Helicobacter pylori* cagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp. Med* 191: 593-602.
- 4-Odenbreit, S., Gebert, B., Puls, J., Fischer, W and Haas, R (2001) Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes : role of the cag pathogenicity island and translocation , phosphorylation and processing of CagA. *Cellular Microbiol.* 3: 21-31.
- 5-Stein, M., Rappuoli, R and Covacci, A (2000) Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* cagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1263-1268.
- 6-Trịnh Tuấn Dũng và cs [1997]
Loét dạ dày và *Helicobacter pylori*. Đặc điểm nội soi, mô bệnh học và siêu cấu trúc. *Nội khoa.* 1: 69-73
- 7-Nguyễn Hoà Bình và CS [1997]. Góp phần nghiên cứu vấn đề nhiễm *Helicobacter pylori* trong bệnh viêm dạ dày mạn. *Nội khoa.* 2: 28-32.
- 8-Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual, *Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- 9- Sanger, F., Nicklen, S and Coulson, A.R (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Aca. USA*, 74: 5463-5467.
- 10- Perez-Perez G.I., Peek, R.M., Legath, A.J., Heine, P.R and Graff, L.B (1999) The role of cagA status in gastric and extragastric complications *Helicobacter pylori*. *J. Physiol Pharmacol* 50: 833- 847

ĐẶC ĐIỂM TOPOLOGY YẾU TỐ TỪ TRƯỜNG SINH THỂ VÀ KHẢ NANG NHẬN BIẾT CHÚNG QUA DẤU HIỆU CẤU TRÚC CHỨC NĂNG CỦA THẦN KINH

NGUYỄN NGUYỄN HY

*Viện Vật lý Ứng dụng và Thiết bị Khoa học
Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phản ứng của cơ thể động vật đối với tác động của từ trường là một vấn đề đặt ra từ xa xưa và tiếp tục được ghi nhận đến ngày nay với nhiều loại biểu hiện rất phong phú và rất tinh tế, đến mức kì diệu... Nhưng cơ chế ảnh hưởng từ trường tới hệ thần kinh vẫn chưa được lí giải rõ ràng, môn từ học thần kinh (neuromagnetics) với các từ kế siêu nhạy sau nhiều thập kỉ thám sát không gian não bộ tuy có ghi nhận được véc tơ từ trường ở bề mặt và cả ở sâu của não bộ... vẫn chưa xác định được nguồn gốc sinh ra chúng và qui luật chi phối sự phân bố của chúng, khiến cho nhiều lĩnh vực sinh học và y học liên quan tới ảnh hưởng của từ trường bị đình trệ. Nguyên nhân hiển nhiên ở đây là còn thiếu những phương pháp luận nhất quán và đủ mạnh.

Bài này thảo luận các phương pháp luận nghiên cứu cấu trúc và chức phận thần kinh khả dĩ cho phép nhận thức quá trình tương tác giữa yếu tố từ tính (vật lí) của cơ thể với các tác nhân (γ -sinh học). Về mặt vật lí thì dựa vào mô hình mô men từ vĩ mô (pico Tesla, tương ứng đơn vị tín hiệu điện - thần kinh 1-1000 micro Amper) trong môi trường plasma dịch thể tế bào: Trong điều kiện đó thì cấu trúc không gian và biến đổi thời gian của từ trường sinh thể - topology và evolution - của các mô men từ (luồng cực từ với các thể (state) khác nhau: ring-dipole, planar-dipole, solenoid-dipole, curved-solenoid-dipole (semi-toroid-solenoid dipole..., và biến thể toroidal, poloidal, quadrupoloidal, romboidal, coloidal ...) có thể được phân biệt cả về cấu trúc lẫn tính năng tác dụng. Về mặt γ -sinh học thì dựa vào các định đề coi cơ chế sinh học (từ học thần kinh) luôn là lời giải tối ưu theo một mục tiêu chức phận cụ thể. Như vậy thì trong số các phương án của bài toán vật lí người ta có thể lựa chọn lấy một miền là làm rõ được chức năng sinh lí - bệnh lí của yếu tố hay quá trình ấy.

Trên cơ sở điều chỉnh có tính phương pháp luận như thế người ta có thể sử dụng những mô hình máy tính để tiếp cận bài toán từ học thần kinh, và tiến tới việc đánh giá từ trường của sinh thể, thiết kế các phương pháp tác động từ trường lên sinh thể, đẩy nhanh việc hoàn thiện các nghiên cứu và ứng dụng vật lí- γ - sinh học nói chung.

II. NHỮNG ĐIỀU NGHỊCH LÍ - TÍNH KHÔNG TƯƠNG ỨNG CỦA SINH HỌC TỪ TRƯỜNG (MAGNETO-BIOLOGY) VÀ TỪ HỌC SINH THỂ (BIOMAGNETICS)

Về đại thể ta có thể hình dung rằng cơ thể sinh vật đặt trong từ trường cực mạnh, tới 100 Tesla và/hoặc đặt trong thành phần từ của sóng điện từ mạnh - liên tục như gôn đài phát (và mobiphone, điện công nghiệp...) sóng vô tuyến 0,5 kHz-19 MHz, công suất bức xạ 0,5 MW sinh điện thế không khí tới 0,02 V/cm, với thành phần từ trường 0,1 T... người ta không quan sát thấy hiệu quả sinh lí rõ rệt nào. Người ta có quan niệm chung rằng cấu tạo cơ thể về cơ bản là các chất nghịch từ với độ từ cảm (susceptibility) rất bé - cùng cỡ của chân không và của nước tinh khiết, đều là âm (-20) 10^7 . Nghĩa là về mặt từ hoá học (magnetochemistry) sinh thể hầu như “trơ” với từ trường ngoài. Còn về sinh học người ta giải thích hiện tượng ấy là biểu hiện của khả năng

che chắn hay loại trừ ảnh hưởng các tác nhân “phi sinh học”, hình thành trong lịch sử tiến hoá/thích nghi của cơ thể.

Trong khi đó thì ai cũng biết tới những gia tăng triệu chứng bệnh lí thần kinh- động kinh, tiền đình hay bệnh tim mạch, huyết áp... của một bộ phận cư dân Thế giới do nhiễu loạn điện từ khí quyển nguồn gốc bão từ Mặt trời công suất bức xạ nhỏ $1-10 \text{ W/cm}^2$, sinh điện thế không khí chỉ vài mV/m và từ trường xung rất nhỏ cỡ $0,01-0,05 \text{ mT}$ trong vài giờ/ ngày. Vào những năm 1960 người ta quan niệm tác dụng sinh lí của từ trường/điện từ trường là do dao động hồi qui (relax) phi nhiệt của các phân tử trong mô-dịch thể, do hấp thụ cộng hưởng dẫn đến gia tăng phản ứng oxy hoá - khử trong mô sống, hoặc relax cấu trúc làm biến đổi phân cực điện-sinh lí trong mô-cơ. Những năm 1970 (Ia.Dorphman, 1971) đưa thêm các cơ chế khả dĩ trong sinh học tác dụng từ: Sự hãm từ thuỷ động đối với tuần hoàn và dịch thể; Sự chấn động đàn hồi vi sợi mô- thần kinh đang dẫn truyền xung điện sinh lí, gây méo hay trễ các xung đó; Sự di chuyển từ thuỷ động của các vi phân tử thành phần thể dịch, làm biến thiên các quá trình hoá lí, sinh hoá...

Còn một luận điểm (của nhà vật lí siêu dẫn F.W.Cope-1976) giải thích phản ứng phi nhiệt đối với sóng vi ba: Cơ thể tiếp nhận từ trường theo kiểu hiệu ứng Josephson, kích chuyển phân cực từ vi thể tần số vô tuyến thành điện thế Volt và ngược lại Volt thành sóng vô tuyến và/hoặc từ trường không đổi DC (như kĩ thuật ngày nay đã đạt được) - nghĩa là đã mặc nhiên giả định “tính siêu dẫn của dịch thể mô cơ và thần kinh” trong sinh thể.

Phương hướng sử dụng các đầu dò nhạy từ để tìm cho ra các yếu tố từ trường của sinh thể (môn biomagnetics) khởi đầu từ năm 1832 khi J.Devy gây từ hoá một cây kim thép bằng cú phát của cá điện: Từ những phát hiện nam châm nguồn gốc sinh học của vài thứ khuẩn Magnetotactic bacteria (R. Blackmore - 1975); Người ta tìm thấy chất sắt từ trong đầu chim bồ câu, vài loài chim di trú khác, vài loài cá di trú, rùa biển, cá delphin, ở máu tàn dư xương đầu - cổ vài giống khỉ và một số người... Người ta xác định được vết của nhiều loại tác nhân sắt từ trong phổi người liên quan môi trường và nghề nghiệp. Kĩ thuật nghiên cứu các dấu vết chất từ của sinh thể thuộc phương hướng một ngành riêng là “Tích nạp chất từ (magneto-reception)” Xuất hiện quan điểm mới (J.L. Kirschvink-1981) cho rằng các trạng thái từ và chất từ định xứ trong cơ thể là một phương tiện giúp cho cơ thể thích ứng với tác nhân trường địa từ bên ngoài.

Kĩ thuật đo từ cực nhạy được phát triển từ những năm 1960 - từ kế gương treo- bơm quang học, từ kế cảm ứng-cuộn nhiều vòng có lõi từ mềm, đầu dò giao thoa lượng tử siêu dẫn SQUID dùng hiệu ứng Josephson, Từ kế lượng tử khung quang học... kết hợp buồng phi từ, bù trừ vi sai đo gradien, các kĩ thuật quét (scanning) và xử lí máy tính ... đạt ngưỡng độ nhạy 10^5-10^1 fT (femto Tesla $=10^{-15} \text{ T}$) tức $10^{-10}-10^{-14} \text{ T}$, người ta xác định được từ trường sinh thể (BM) của nhiều cơ quan nội tạng người: mắt đạt 10^5 fT , não 10^3 fT , mô cơ tim: $5-6 \cdot 10^3 \text{ fT}$... Lĩnh vực từ học thần kinh (neuromagnetics) được đặc biệt phát triển: Đo được phong khí ngủ hay ngất, bị thôi miên từ não đồ vùng thùy đạt 10^3 fT . Vùng đồi thị, thị giác: 10^4 fT , vùng thính giác và mô cơ tim: 10^2 , Từ trường của xung điện thần kinh trung bình là cỡ $20 \cdot 10^6 \text{ fT}$ (20 pT) và tần số 12-40 Hz. Bình quân các pic BM của tín hiệu thần kinh chi trên (như cơ cánh tay, ngón tay) là 10 pT tần số 30 Hz, ở mắt khi điện thế thụ cảm chớp sáng 100 mV thì đo được 10 pT ...

Người ta đặc biệt xác định được rằng từ trường ghi được ở não người hầu như chỉ sinh ra bởi vài dạng thế hiệu điện não sau xinap. Hình ảnh dòng điện não được xác định là một lưỡng cực dòng - một đoạn dẫn dòng cong chứ không thẳng, nằm trong lớp mỏng kích thước vách bán thấm của tế bào xinap (còn gọi là dòng ngang, đúng như đoán nhận của Leontovit từ năm 1933 và chứng minh của A.M. Gutman năm 1977 rằng nguồn từ trường não là các dòng điện thần kinh cong kiểu solenoid, tác dụng truyền dẫn theo kiểu phân cực - lưỡng cực, chứ không phải dòng điện dọc chạy dài theo tuyến sợi thần kinh). Mỗi đơn vị solenoid sinh từ trường lưỡng cực ra xung quanh theo định lí Biot-Savart, giảm theo hàm mũ với khoảng cách $1/r^2$. Hệ thống tín hiệu từ trường BM của hàng trăm tổ lưỡng cực như thế trên vỏ não /da đầu (scalp) khoảng 200 cm^2 làm thành một bản đồ topography từ tính của não. Cần để ý một điều: Người ta đo cơ lực tương

tác từ trường ngoại vi sát màng tế bào nhạy cảm - như các sợi Purkinje - neuron... nhưng không thể phát hiện được gì.

Đến đây, nhìn lại mấy con số đã đơn cử ở trên, ta có thể lấy làm lạ là vì sao có sự khác biệt rất lớn đến mức ấy: Từ trường ngoài đặt lên cơ thể với giá trị cực lớn, tới 20 T, lại không thể gây ra phản ứng gì ở những hệ thống sinh học vốn giao lưu bằng từ trường cực nhỏ, cỡ 10^{-14} T? Điều đó giống như điều nghịch lí.

Hơn 20 năm nay, từ những kết quả ban đầu về sinh học tác động từ trường (MB) cũng như nghiên cứu từ trường sinh thể (BM) và các đề xuất của F.W. Cope, 1976, về bản chất siêu dẫn của cơ chế từ thần kinh và của J. Wikswo, J. Barach, J. Freeman, 1980, về mô hình phân cực tụ điện của lan truyền xung từ điện thần kinh... đã có nhiều bước tiến về phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và thuận từ điện tử (EPR), về kĩ thuật giao thoa lượng tử siêu dẫn (SQUID)... được áp dụng vào nghiên cứu y- sinh học và khoa hình ảnh y học. Tuy nhiên vấn đề mô hình vật lí-sinh học của tương tác từ trường với sinh thể vẫn còn chưa được lí giải thoả đáng.

III. SỰ NHẬN CẢM TỪ TRƯỜNG VÀ SỰ LAN TRUYỀN TRONG CƠ THỂ

Tương tác của các yếu tố từ sinh thể (BM) và tác dụng sinh học của từ trường (MB) gắn với cơ chế và/hoặc cơ quan cảm thụ, tiếp nhận, mã hoá, phát và truyền tín hiệu - xung động thần kinh; Một cơ chế truyền sóng đàn hồi vận tốc âm trong môi trường plasma điện từ - sóng Anven, gắn gũi với mô hình truyền động kích thích từ-điện/đàn hồi về nguyên tắc gồm hai loại mode: sóng dọc vận tốc cao (âm nhanh) và sóng ngang vận tốc chậm, (âm trể). Trong vật lí plasma sóng Anven là sóng ngang của sức căng đàn hồi của môi trường bị co-giãn theo độ cong hay độ uốn của đường sức từ, khiến đường sức từ cong có xu hướng thẳng lại và lại bị cong đi khi gặp đỉnh sóng đàn hồi truyền tới. Vậy nên theo mô hình này, topology phổ đường sức từ trong môi trường plasma lan truyền kích thích từ đàn hồi là nhân tố mã hoá (code) cấu trúc - chức năng tín hiệu từ sinh học được sinh sản và truyền tải và có cơ sở để tìm thấy biểu hiện của chúng trong cấu trúc-chức năng của hoạt động thần kinh và não bộ.

Các sóng thực tế truyền dẫn theo dây thần kinh được mô hình hoá theo cơ chế chuyển từ-điện qua từng cụm RLC ứng các tín hiệu đủ lớn và/ hoặc hiệu ứng tunnel Josephson từng số nguyên lần các lượng tử từ thông $\Phi_0 = h/2e = 2.07.10^{-15} \text{ Tm}^2$ ứng các tín hiệu cực nhỏ. Vùng giải tần số khả dĩ của các cơ chế dẫn truyền đó đều rất rộng, từ DC ($f=0 \text{ Hz}$) đến vi ba ($f=10 \text{ kHz}$) hay vô tuyến ($f=1 \text{ MHz}$)

Va chạm của các sóng đàn hồi âm nhanh với tiền đầu là sóng xung kích không va chạm thì nhiệt dao động vẫn tiêu tán rất nhanh thành các dao động bất ổn định của plas ma trong đới đầu sóng nhưng bảo toàn được exergy A (khả năng sinh công). Các sóng âm chậm thì chỉ có một con đường là tiêu tán thành nhiệt kèm theo sự tăng entropy S (sự hỗn loạn) và hạn chế khả năng sinh công. Ta có thể hình dung một tín hiệu nhận cảm dưới dạng một bó sóng từ trường $\mathbf{B}(\mathbf{r})$ - với topo không gian của hệ đường sức từ gây ra một bó sóng dao động đàn hồi của dịch thể ion hoá - plasma mật độ ρ (ví dụ khoảng $2\div 3 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$) thì vận tốc sóng từ động Anven sẽ bằng:

$$V_A \approx \mathbf{B} \sqrt{(\mu_0/\rho)} = 10\div 40 \text{ m/s}$$

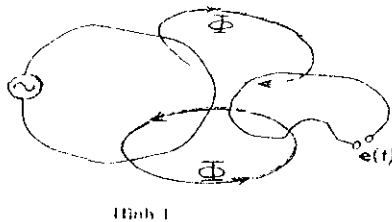
$$(\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ H/m là độ từ cảm của chân không})$$

Ta dễ dàng lặp lại điều kiện hấp thụ cộng hưởng và giao thoa - sóng đứng các sóng Anven lan truyền trong môi trường plasma để mô phỏng những hiện tượng đặc trưng cộng hưởng và giao thoa nhận cảm cho trường hợp truyền dẫn các xung thần kinh nói chung và tín hiệu từ thần kinh nói riêng.. Về định tính thì mô hình tạo tín hiệu cảm nhận từ trường và truyền dẫn sóng Anven đưa ra ở trên tỏ ra có đủ khả năng mô phỏng các quá trình từ học thần kinh, mà trước tiên là loại trừ những nghịch lí BM với MB đã tóm lược ở trên. Mô hình cũng tỏ ra tiếp cận thoả đáng các kết luận của S. Williamson (1981): Các trường BM ghi nhận được bên ngoài cơ thể là rất nhỏ bé so

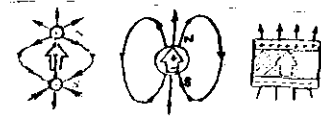
với những từ trường ngoài gây ra hiệu ứng sinh học từ trường MB, tuy giữa chúng có mối liên hệ logic và hữu cơ bằng cơ chế chưa được làm rõ; Trường BM có lẽ là một hình thái đã được làm yếu (với các yếu tố điện từ khép mạch gần kín) của các phản xạ cơ giác. Chỉ có điều ta chưa hiểu rõ được vai trò các yếu tố tham gia việc hoạch định chức năng cho chúng.

IV. MÔ HÌNH CÁC MẠCH TỪ LƯỢNG CỰC VÀ TOPO PHỔ ĐƯỜNG SỨC TỪ

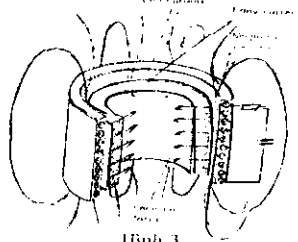
Mạch điện chảy thành vòng sinh thể từ vector \mathbf{A} và cảm ứng từ \mathbf{B} luôn bị rò rỉ sang một mạch dẫn C bên cạnh một sức điện động $e(t)$ bằng cảm ứng từ qua phổ đường sức Φ , như trên Hình 1. với : $e(t) = -d\Phi/dt = \int_C (d\mathbf{A}/dt) \cdot d\mathbf{S}$ (1)



Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

Dạng các hàm số $\Phi(r, t)$, $\mathbf{A}(r, t)$ có đặc trưng topo không gian và tiến trình thời gian do cấu trúc và chức năng hoạch định sẵn của hệ thống các vòng dẫn C_1, C_2, \dots qui định. Mạch từ chúng ta xây dựng làm mô hình trong từ học thần kinh gồm có các mô men từ là yếu tố lưỡng cực từ vi thể, mà theo chúng tôi là cần phải được đánh giá và lựa chọn từ những mẫu nguyên tố khá đa dạng, không thể chỉ sử dụng một lưỡng cực điểm như mô men spin hay mô men quỹ đạo của nguyên tử. Trên Hình 2 biểu thị ba mẫu đơn giản nhất của lưỡng cực từ: chông chát các trường của hai đơn cực từ điểm (a) một lưỡng cực điểm (b) hoặc lưỡng cực phẳng (c).

Sẽ là hợp lí nếu ta xây dựng mô hình các lưỡng cực solenoid của các sợi thần kinh dẫn điện dạng cong nhiều vòng dẫn điện với trục hình học có thể là một đoạn thẳng (như vẽ ở hình 3) hay là các đoạn cong, khiến solenoid có thể làm thành vòng kín, gần kín và hở...

Bài toán xác định phổ từ trường của mọi loại mô men từ dù có hình học phức tạp cũng đều giải được trong xấp xỉ môi trường liên tục.

Sự tương tác từng cặp của chúng cũng như tương tác của chúng với trường ngoài cũng đã là kinh điển. Vấn đề khó khăn không phải ở công cụ toán lí, mà có thể sẽ là ở lĩnh vực giải phẫu thần kinh. Cho đến nay còn chưa có những thực nghiệm cần thiết cho phép xây dựng và lựa chọn mô hình mô men từ của thần kinh và não bộ.

Một đặc điểm cần được tính đến khi xem xét bài toán tương tác từ trong môi trường plasma là sự chấp nối các đường sức từ (magnetic - vortex induced reconnection process), như mô tả trên Hình 4: Do tính không bền vững của môi trường, ở chỗ tiếp xúc hai lớp từ thông trung hoà - tương đồng có thể xảy ra khuếch tán từ (vùng trong hình chữ nhật trên hình vẽ; Các mũi tên

to bên ngoài chủ nhật chỉ hướng lực, khiến các lớp trung hoà hàn dính vào nhau, các “bề mặt” từ thông trung hoà sẽ lập tức co rút khiến các lớp di chuyển theo chiều hai mũi tên nhỏ)

Do hiện tượng này, các cấu trúc từ tính của môi trường plasma có thể có nhiều biến thể (state) dạng xuyên toroidal, dạng cực – poloidal, dạng tứ cực quadrupoloidal, rombo loidal... Phổ đường sức từ của từng biến thể cần được xây dựng và phân loại để sao cho có thể sử dụng một thứ “đại số học” giản đơn nhất cho việc đánh giá tương tác từng cặp và từng chuỗi của yếu tố từ, khả dĩ mô phỏng tốt các quá trình từ học thần kinh.

Bức tranh phổ đường sức từ, cả về không gian (topology) lẫn về tiến trình thời gian (evolution) của môi trường plasma, vì vậy, sẽ cung cấp một khả năng truyền sóng van Anven rất phong phú, bổ sung cho các mô hình đã biết của các quá trình điện thần kinh và trở thành phương tiện mạnh mẽ và nhất quán hơn nhiều trong việc mô hình hoá các bài toán từ học thần kinh.

V. NGUYÊN TẮC LỰA CHỌN MÔ HÌNH VÀ ỨNG DỤNG

Từ các kết quả của A.M Gutman (1971) về tính chất cong vòng xuyên của sợi thần kinh não bộ, tính dẫn điện khối (mà ở đây ta gắn với tính chất plasma) của não, bên cạnh tính nghịch từ toàn khối (trừ các tuyến dẫn hay điểm dị thường từ) trong não,... người ta đã xác định được những *nguyên tắc bổ sung lẫn nhau*, không lặp lại nhau của những tư liệu về điện não đồ (EEG) và từ não đồ (MEG) làm cơ sở cho phát triển mô hình ảnh y học những năm qua.

Như vậy là hầu hết các mô hình điện thần kinh cần được rà soát, xây dựng lại song song với các mô hình từ thần kinh: Từ neuron hạch cảm giác tiếp cận vỏ xám, đường cảm giác, đường phối hợp các đoạn tủy, neuron rễ vận động và rễ gai sống... đến các phản xạ cơ giác - cảm giác, các cơ chế ghi nhớ và học tập... các quá trình hoá-điện thần kinh đã tích lũy được nay cần bổ sung thêm bức tranh quá trình điện- từ thần kinh. Công việc đó hứa hẹn những ứng dụng to lớn như sự bổ sung MEG với EEG nói trên.

Trong những khả năng rất đa dạng của cấu trúc topo và tiến trình điện từ thần kinh khả dĩ mô hình hoá được, chúng ta đoán nhận rằng cơ thể thực tế sẽ chỉ chọn lấy phương án tốt nhất, nếu ta hiểu được “hàm mục tiêu” hay “chức năng” của từng quá trình được xét, và điều đó được xem như *nguyên tắc lựa chọn tối ưu* cần phải áp dụng vào việc thiết kế mạch từ điện thần kinh trên các mô hình.

Những tương tác từ - điện với hệ thần kinh ngoài kết quả thu được thông tin hoá sinh học vốn rất có ý nghĩa như đã thu được nhờ kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân NMR, thuận từ điện tử EPR và giao thoa lượng tử siêu dẫn SQUID, về nguyên tắc còn có thể dẫn đến các hiệu quả điều trị vật lý- lĩnh vực ngày càng được quan tâm do xu hướng giảm bớt lạm dụng thuốc (hoá dược)- nhưng còn chưa phát triển tương xứng với nhu cầu.

Tác giả báo cáo này đã tiến hành thực nghiệm thiết kế và sử dụng hàng loạt nam châm và máy từ trường (từ liệu pháp giúp an thần - hỗ trợ sức khoẻ, dùng trong y học phục hồi, dùng điều trị các triệu chứng đau...) và nhận thức rõ rằng lĩnh vực ứng dụng quan trọng này đặt ra nhiều yêu cầu về phương pháp nghiên cứu, về lý luận từ thần kinh học và công cụ mô hình hoá các quá trình tương tác trường điện-từ với hệ thần kinh. Bước đầu những phép gần đúng môi trường liên tục và sóng đàn hồi của plasma tỏ ra đáp ứng tốt yêu cầu của công việc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Giải phẫu thần kinh lâm sàng . André Gouazé, NXB Y học, 1994
2. Spectroscopie. Jean-Yves Lallemand , 1998

3. Mediko-biologicheskie Aspectur Primenhenhia metoda EPR (tiếng Nga), Ia.I.Ajipa, Moskva 1983
4. Magnitnuc polia biologicheskikh ob jectov (tiếng Nga) red. M.G. Airapetiani, 1987.
5. Neu robionic s, Ed. Hans-Werner Botthe, Madjid Samil, 1993.
6. Kết quả bước đầu sử dụng máy từ trường giao thoa điều trị chống đau ung thư. Báo cáo hội thảo Ung thư học, Hà nội 2000. TP HCM 2000.
Nguyễn Nguyên Hy, Đoàn Lực, Nguyễn Thanh Đạm, Nguyễn Duy Hương...

SUMMARY

TOPOLOGICAL CHARACTERS OF BIOMAGNETICS ELEMENTS AND IT'S RECOGNIZABILITY ON THE BASE OF NEURO-STRUCSTURAL AND FUNCTIONAL BEHAVIOURS

NGUYEN NGUYEN HY

In the paper there were discussed some achivevements of biomagnetics and magnetobiology to show that it's actual request to improve the methodologies in the field of neuromagnetics.

Biomagnetic moments and their fields and topology and evolutins in living medium have been demonstrated as ring/plancéolenoid dipole and curved solenoid dipole and /or their toroidal and poloidal, quadropoloidal and romboidal ...as another variable states in the approxymation of continuous medium.

Neuromagnetic signal impul transmits are hypothesized to imitate some kind of Anven waves in the plasma medium

It's can be make qualtatively well known effects of plasma physics over neuro - magnetics. It's capable to reconize biomagnetics effects on the base of the neuro-structural and functional behaviours.

f

SỬ DỤNG CLORAT KALI(KClO₃)

ĐỂ TĂNG NĂNG SUẤT VÀ CẢI THIÊN PHẨM CHẤT LÚA TRỒNG TRÊN ĐẤT NHIỄM MẶN VÀ CHUA MẶN.

NGUYỄN NHƯ KHANH, *Trường DHSPHN*

VÕ MINH THỨ, *Trường DHSP Qui Nhon.*

I. MỞ ĐẦU

Đất mặn làm giảm năng suất và phẩm chất cây trồng [3,6, 8]. Dọc theo bờ biển đất mặn đi đôi với đất phèn[1]. Theo Lê Văn Căn(1978), đất phèn còn có tên gọi là đất chua mặn, theo Đào Châu Thu(1998), ở Việt Nam có 1.272.246 ha đất mặn chiếm 4,1% đất cả nước và theo Vũ Cao Thái(1981) nước ta có 1,9 triệu ha đất bị nhiễm phèn, phân bố ở đồng bằng sông Cửu Long, sông Hồng và sông Thái Bình; Quảng Ninh là tỉnh có nhiều đất phèn [5]. Đất mặn làm giảm chiều dài bông, trọng lượng và phẩm chất hạt lúa [3,6,8]. Vấn đề nghiên cứu tìm các biện pháp làm giảm tác hại của mặn, tăng năng suất và phẩm chất cây trồng trên đất mặn và chua mặn là công việc cấp thiết.

Trong bài này chúng tôi trình bày kết quả thực nghiệm về việc sử dụng chất clorat kali(KClO₃) để làm giảm tác hại của mặn đối với các chỉ tiêu cấu thành năng suất, năng suất và phẩm chất của một số giống lúa trồng trên đất mặn và chua mặn.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng.

Đối tượng thực nghiệm của chúng tôi là một số giống lúa. *CR203* là giống không chịu mặn dùng làm đối chứng, giống lúa này được lấy tại Viện Di truyền Nông Nghiệp. Các giống lúa chịu mặn tốt *OM15*, *TH85* và giống kém chịu mặn *OM13* được Trung tâm giống cây trồng thuộc sở Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Bình Định cấp. Các giống *tám thơm*, *nếp Thái Bình*, *Hồng công* đã chịu được đất chua mặn ở huyện Yên Hưng[5], lấy ở Trung tâm khuyến nông thuộc phòng nông nghiệp và phát triển nông thôn huyện Yên Hưng, tỉnh Quảng Ninh.

2.2. Phương pháp thực nghiệm.

2.2.1. Thí nghiệm trồng lúa trong chậu sinh dưỡng trên đất không mặn(lấy tại Phú Tài, Qui Nhon), đất nhiễm mặn(lấy tại Phước Sơn, Tuy Phước, Bình Định) với 4 giống lúa

(*OM15*, *TH85*, *OM13* và *CR203*) qua 3 vụ: đông xuân 1995 -1996; đông xuân 1996-1997 và hè thu 1997; mỗi vụ nhắc lại 5 lần(5chậu), kích thước chậu: 30x30cm, mỗi chậu chứa

5kg đất và gieo sạ 12 hạt.

2.2.2. Thí nghiệm đồng ruộng được tiến hành tại 2 địa phương: trên đất mặn tại huyện Tuy Phước, Bình Định và trên đất chua mặn(phèn) tại huyện Yên Hưng, Quảng Ninh. Huyện Yên Hưng có diện tích đất chua mặn chiếm tới 60% trong tổng số 5.500 ha đất nông nghiệp của toàn huyện.

- Thí nghiệm ở Phước Sơn, Tuy Phước, Bình Định trong vụ hè thu 1996 và vụ đông xuân 1996-1997 với giống TH85; vụ hè thu 1998 với giống OM15. Lượng phân bón trong chậu cũng như ngoài đồng được sử dụng theo qui trình hướng dẫn của Trung tâm khoa học kỹ thuật tỉnh Bình Định. Diện tích: 300m²/giống/vụ, lặp lại 3 lần/ công thức/vụ, mỗi lần là 1 ô 60m².

- Thí nghiệm tại Trung tâm khuyến nông huyện Yên Hưng, Quảng Ninh. Toàn bộ công việc tiến hành chăm sóc thí nghiệm hoàn toàn do Trung tâm thực hiện trên nền đất chua mặn mới khai hoang ở thôn Động Linh, xã Minh Thành, huyện Yên Hưng, tỉnh Quảng Ninh theo qui trình chung của phòng nông nghiệp huyện. Thí nghiệm nhắc lại 3 lần, mỗi lần là 1 ô có diện tích 60m². Tiến hành thí nghiệm vào vụ thu năm 2000 và vụ đông xuân 2001. Xử lý bằng cách ngâm hạt bình thường trước khi gieo vào dung dịch clorat kali 50ppm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.

Xác định số bông trên cây, số hạt chắc trên bông, khối lượng 1000 hạt và năng suất hạt trong thí nghiệm trồng trong chậu cho thấy môi trường đất bị nhiễm mặn đã làm giảm số bông trên khóm đối với tất cả các giống lúa được thực nghiệm so với môi trường không mặn, nhưng mức độ giảm ở các giống lúa chịu mặn kém OM13 và không chịu mặn CR203 thể hiện ra mạnh hơn so với các giống chịu mặn tốt OM15 và TH85. Cụ thể, số bông trên cây ở giống TH85 qua các vụ thí nghiệm giảm 2,72; 2,34; 3,28%, ở giống OM15 giảm 4,38; 4,46; 4,55%, ở giống OM13 giảm 5,30; 6,63; 6,25% và ở giống CR203 giảm 6,46; 8,89; 8,20% so với lúa đối chứng trồng trên đất không nhiễm mặn.

Xử lý KClO₃ đã có tác dụng làm tăng số bông trên khóm(tăng 1,36 - 2,37% đối với giống TH85, tăng 1,49- 2,22% đối với giống OM15, tăng 0,64 - 2,33% đối với giống OM13, và tăng 1,04 - 3,34% đối với giống CR203) so với điều kiện đất mặn. Trên đất phèn, KClO₃ cũng tăng số bông trên khóm lên 12,96%; tăng chiều dài của bông lên 2,06%; tăng tổng số hạt trên bông lên 5,2%(bảng4).

Trên đất mặn số hạt chắc trên bông giảm mạnh so với đối chứng. Mức độ giảm số hạt chắc trên bông ở các giống không chịu mặn CR203 và kém chịu mặn OM13 thể hiện rõ hơn so

với các giống chịu mặn tốt OM15 và TH85. Đối với giống TH85 số hạt chắc trên bông qua các vụ giảm lần lượt là 13,08; 11,35; 9,445, ở giống OM15 giảm 16,44; 12,91; 11,70% so với đối chứng. Số hạt chắc trên bông ở giống OM13 giảm 16,09; 15,88; 14,86% và ở giống CR203 giảm tương ứng là 19,64; 21,48; 20,72% so với đối chứng(bảng 2).

Xử lý $KClO_3$ đã làm tăng khá rõ số hạt chắc trên bông của cây lúa sống trong môi trường mặn. Cụ thể, qua các vụ đông xuân 1995 - 1996, 1996 - 1997, vụ hè thu 1997 số hạt chắc trên bông ở giống lúa TH85 tăng lần lượt là: 12,87; 10,23; 10,78%, ở giống OM15 tăng 10,93; 9,95; 10,39% , ở giống OM13 tăng 10,58; 9,90; 7,14%, còn ở giống CR203 tăng 6,62; 4,16; 5,76% so với điều kiện mặn(bảng 2). Trên đất chua mặn $KClO_3$ cũng đã tăng số hạt chắc trên bông của tất cả 4 giống lúa thực nghiệm, ví dụ, chỉ số đó ở giống lúa tám thơm tăng lên 5,2%(bảng4).

Khối lượng 1000 hạt ở các giống khác nhau không giống nhau trong đó giống OM15 và OM13 có khối lượng 1000 hạt lớn hơn giống CR203 và TH85. Đất mặn và xử lý $KClO_3$ không ảnh hưởng nhiều đến chỉ số này, năng suất hạt chủ yếu phụ thuộc vào số hạt chắc trên bông.

Các thí nghiệm của chúng tôi cho thấy năng suất hạt của các giống lúa thí nghiệm đã bị giảm nhiều dưới tác động của đất mặn: năng suất bị giảm từ 12,0-13,96% đối với giống TH85, từ 13,80- 14,96% đối với giống OM15, từ 15,0 - 16,69% đối với giống OM13, từ 24,20- 25,65% đối với giống CR203 so với môi trường không mặn.

Xử lý $KClO_3$ đã tăng năng suất hạt lúa ở tất cả các giống được thực nghiệm so với đối chứng. Qua 3 vụ thí nghiệm, năng suất hạt ở giống TH85 tăng từ 11,70% - 12,98%; giống OM15 tăng từ 10,53% - 11,18%; giống OM13 tăng từ 7,15% - 8,84%; giống CR203 tăng từ 5,03% - 7,44% so với công thức mặn không xử lý $KClO_3$.

Kết quả của thí nghiệm đồng ruộng lần lượt được trình bày trên các bảng 1,2,3,4 cho thấy clorat kali đã có tác dụng tăng năng suất với mức độ khác nhau của tất cả các giống lúa được thực nghiệm cả trên nền đất mặn ở Tuy Phước, Bình Định cũng như trên đất chua mặn(đất phèn) mới khai hoang tại huyện Yên Hưng, Quảng Ninh với thời tiết khác hẳn nhau. Clorat kali ảnh hưởng tốt đến tất cả các chỉ tiêu cấu thành năng suất, nhưng chủ yếu là do tăng số hạt chắc trên bông(bảng 1,2,3,4). Điều đó đúng trong các thí nghiệm trong chậu với các thời vụ khác nhau trong các thí nghiệm đồng ruộng trên đất mặn ở ven biển

Bảng 1

Số bông trên cây(ở Phước Sơn, Bình Định với giống TH85 và OM15).

(Thí nghiệm đồng ruộng)

Công thức	Giống TH85				Giống OM15	
	Vu đông xuân 95-96		Vu đông xuân 96-97		Vu hè thu 1998	
	Số bông/cây	% so ĐC	Số bông/cây	% so ĐC	Số bông/cây	% so ĐC
ĐC (đất mặn)	2,45±0,06	100,00	2,56±0,07	100,00	2,51±0,05	100,00
T.N. (đất mặn + KClO ₃)	2,50±0,03	102,04	2,63±0,04	102,73	2,55±0,04	101,59

Bảng 2

Số hạt chắc trên bông(ở Phước Sơn, Bình Định với giống TH85 và OM15).

(Thí nghiệm đồng ruộng)

Công thức	Giống TH85				Giống OM15	
	Vu đông xuân 95-96		Vu đông xuân 96-97		Vu hè thu 1998	
	Số hạt/bông	% so ĐC	Số hạt/bông	% so ĐC	Số hạt/bông	% so ĐC
ĐC (đất mặn)	77,23±0,68	100,00	79,71±0,30	100,00	81,24±0,73	100,00
T.N. (đất mặn+ ClO ₃)	84,91±0,47	109,94	88,35±0,23	110,83	85,95±0,56	105,80

tỉnh Bình Định cũng như trong thí nghiệm trên đất phèn tại Yên Hưng Quảng Ninh.

Bảng 3

Năng suất hạt(ở Phước Sơn, Bình Định với giống TH85 và OM15)

(Thí nghiệm đồng ruộng)

Công thức	Giống TH85				Giống OM15	
	Vu đông xuân 95-96		Vu đông xuân 96-97		Vu hè thu 1998	
	Kg/m ²	% so ĐC	Kg/m ²	% so ĐC	Kg/m ²	% so ĐC
ĐC (đất mặn)	0,570±0,010	100,00	0,581±0,007	100,00	0,615±0,012	100,00
T.N (đất mặn + KClO ₃)	0,629±0,006	110,35	0,646±0,008	111,18	0,654±0,014	106,34

Thí nghiệm được lặp lại trên đất chua mặn(đất phèn) tại huyện Yên Hưng, tỉnh Quảng Ninh (bảng 4).

Phân tích hàm lượng các dạng nitơ trong cây lúa vào các thời kì sinh trưởng và phát triển cũng như trong hạt gạo cho thấy đất nhiễm mặn gây ra sự giảm khá rõ hàm lượng nitơ tổng số, nitơ protein trong cây ở thời kì cây mạ, đẻ nhánh, trổ bông và clorat kali đã có tác dụng hạn chế sự giảm sút đó như đã công bố trước đây [6]. Điều đó đã ảnh hưởng đến hàm lượng các dạng nitơ trong hạt gạo. Đất mặn đã giảm lượng nitơ tổng số, nitơ protein và protein trong hạt gạo của

tất cả các giống lúa nghiên cứu. Đối với giống TH85 lượng nitơ tổng số giảm 1,25% và protein giảm 2,59% so với điều kiện không nhiễm mặn

Tương tự như vậy, ở giống OM15 các chỉ số vừa nêu giảm lần lượt là 4,25% và 3,24%. Giống OM13 và CR203 có lượng nitơ tổng số và protein giảm xấp xỉ nhau(giảm 1,37% và 4,45% đối với OM13; giảm 1,31% và 4,86% đối với giống CR203 so với đất không mặn).

Bảng 4
Một số yếu tố cấu thành năng suất và năng suất thực thu^(*)/ô theo dõi
tại Hưng yên, Quảng Ninh

TT	Chỉ số theo dõi	Tám thơm		Nếp T. B. ⁽¹⁾		Hồng công		TH 85 ⁽²⁾	
		TN ⁽³⁾	ĐC	TN ⁽³⁾	ĐC	TN ⁽³⁾	ĐC	TN ⁽³⁾	ĐC
1	Chiều cao cây (cm)	150,40	147,8	138,9	136,2	104,2	106,7	51,56	42,41
2	Số bông/khóm	7,67	6,79	5,76	5,13	6,23	6,82	2,91	2,37
3	Chiều dài bông (cm)	28,36	27,08	23,25	21,5	24,13	23,4	13,52	13,21
4	Tổng số hạt/bông	177,37	168,25	117,47	112,14	152,85	156,642,15	42,15	35,76
5	Số hạt chắc/bông	152,6	145,25	107,76	105,05	138,56	132,23	13,68	8,23
6	Tỉ lệ lép(%)	13,97	13,67	8,27	6,33	9,35	15,56	67,54	76,98
7	Tỉ lệ bông hữu hiệu(%)	79,07	93,01	91,43	77,73	81,97	74,13	52,91	60,76
8	P. 1000 hạt(g)	18,32	18,02	25,08	24,63	19,46	19,18	20,50	20,10
9	Mật độ cây(khóm/m ²)	40	40	40	40	40	40	48	48
10	Năng suất thực thu(gam/m ²) % so với ĐC	372,50	328,50	344,50	332,50	426,80	411,00	28,90	19,10
		113,39	100,00	103,60	100,00	103,84	100,00	151,30	100,00

(*) (Thí nghiệm đồng ruộng trên đất chua mặn mới khai hoang tại thôn Động Linh, Minh Thành, Yên Hưng, Quảng Ninh, vụ mùa 2000. Số liệu do Thạc sĩ Đinh Đức Thành, Trường phòng NN & PTNT huyện Yên Hưng, tỉnh Quảng Ninh cung cấp).

⁽¹⁾ Nếp Thái Bình; ⁽²⁾TH85 gieo muộn bị chuột phá hoại do đó số liệu đối với giống lúa này chưa đáng tin.; ⁽³⁾TN - xử lý ngâm hạt trong dung dịch KClO₃ 50ppm trước khi gieo.

Các giống không chịu mặn CR203 và kém chịu mặn OM13 có lượng protein giảm nhiều hơn hai giống chịu mặn tốt TH85 và OM15.

Xử lý clorat kali đã có tác dụng tăng lượng nitơ tổng số, nitơ protein và protein trong hạt gạo so với lúa đối chứng(trên đất mặn). Dưới ảnh hưởng của KClO₃ lượng nitơ tổng số, nitơ protein và protein trong hạt gạo tăng lên. Chẳng hạn, lượng nitơ tổng số và nitơ protein tăng lên 1,21% đối với giống OM15, tăng 1,38% đối với giống OM13. Hàm lượng protein trong hạt gạo của cả 4 giống thí nghiệm trên đất mặn tại Bình Định đều tăng lên dưới tác động của clorat kali. Lượng protein trong hạt gạo tăng lên nhiều nhất ở giống OM13(tăng 7,76%), kể đến là là giống OM15 và giống TH85 tăng xấp xỉ nhau(1,33% và 1,32%), tăng ít nhất là ở giống CR203(tăng 0,74%) so với lúa trồng trên đất mặn không được xử lí KClO₃.

Để đánh giá phẩm chất hạt gạo, ngoài các dạng nitơ, chúng tôi đã phân tích hàm lượng các axit amin. Trong bảng 5 trình bày hàm lượng các axit amin trong hạt gạo giống TH85 thu

hoạch từ các công thức thí nghiệm trên đất không mặn(ĐC), đất mặn ở Tuy Phước Bình Định, và đất mặn có bổ sung $KClO_3$.

Số liệu trên bảng 5 cho thấy hàm lượng tổng số của 17 axit amin trong hạt gạo giống TH85 được trồng trên đất không nhiễm mặn là 5,88% chất khô. Chỉ số đó giảm xuống còn 5,78% dưới tác động của đất mặn nhưng lại tăng lên đến 6,32% nhờ xử lí $KClO_3$.

Trong hạt gạo giống TH85 lượng axit glutamic đạt trị số cao nhất như đã được Okazaki [1961] nhận xét đối với các axit amin trong protein của gạo và thấp nhất là methionine.

Dưới tác động của đất mặn hàm lượng một số axit amin không thay đổi: axit aspartic, axit glutamic, glycine, valine; nhiều axit amin giảm xuống: alanine, tyrosine, phenylalanine, isoleucine, leucine, arginine, lysine; nhưng một số axit amin lại tăng lên: serine, histidine, threonine, cystein + cystine, proline(bảng 5).

Bảng 5

Hàm lượng axit amin trong hạt gạo giống TH85(% chất khô)

Số TT	axit amin	ĐC	Đất mặn	Đất mặn + $KClO_3$
1	aspartic acid	0,65	0,65	0,69
2	Glutamic acid	0,97	0,97	0,96
3	Serine	0,32	0,33	0,34
4	Histidine	0,17	0,21	0,21
5	Glicine	0,22	0,22	0,28
6	Threonine	0,23	0,24	0,28
7	Alanine	0,35	0,34	0,39
8	arginine	0,51	0,45	0,51
9	Tyrosine	0,27	0,24	0,30
10	Cystein+Cystine	0,24	0,28	0,31
11	Valine	0,30	0,30	0,33
12	Methionine	0,13	0,16	0,15
13	Phenylalanine	0,28	0,25	0,31
14	Isoleucine	0,42	0,35	0,43
15	Leucine	0,18	0,13	0,17
16	Lysine	0,34	0,33	0,35
17	Proline	0,30	0,33	0,31
	Tổng số	5,88%	5,78%	6,32%

$KClO_3$ có tác dụng tăng hàm lượng tổng số các axit amin và tăng nhiều axit amin, chỉ có axit glutamic và proline là bị giảm so với môi trường đất mặn(bảng 5). Tăng hàm lượng lysine và protein dưới tác động của $KClO_3$ là rất có ý nghĩa vì 2 chỉ số đó nằm trong chỉ tiêu đánh giá chất lượng dinh dưỡng của hạt gạo trên thương trường thế giới[5,7].

III. KẾT LUẬN.

1. Đất mặn gây ra sự giảm năng suất, phẩm chất hạt gạo như giảm hàm lượng protein, giảm tổng lượng các axit amin và giảm hàm lượng một số axit amin không thay thế như arginine, phenylalanine, isoleucine, leucine, lysine.

2. Xử lý $KClO_3$ đã có tác dụng tăng năng suất với mức độ khác nhau (từ 3.6 - 13,39% so với điều kiện đất mặn) của tất cả các giống lúa được thử nghiệm trồng trên đất mặn tại ven biển Bình Định cũng như trên đất chua mặn tại Quảng Ninh.

3. Phẩm chất của hạt gạo (hàm lượng protein, hàm lượng các axit amin và hàm lượng nhiều axit amin không thay thế, trong đó có lysine) của lúa trồng trên đất bị nhiễm mặn đã tăng lên dưới tác động của $KClO_3$.

4. Có thể sử dụng dung dịch clorat kali với nồng độ 50ppm (1 kg $KClO_3$ giá khoảng 75.000 đồng, hoà trong 20.000 lít nước với nồng độ đã nêu) làm dung dịch ngâm thóc giống để tăng năng suất và cải thiện phẩm chất hạt gạo đối với lúa trồng trên đất mặn và chua mặn.

TÓM TẮT

Việt Nam có 1.272.246 ha đất nhiễm mặn chiếm 4,1% đất cả nước (Đình Văn Tĩnh, 1995) và 1,9 triệu ha đất chua mặn (đất phèn) (Vũ Công Thái và cộng sự, 1981).

Đất mặn đã giảm số bông/cây, số hạt chắc/cây và năng suất của tất cả các giống lúa được thực nghiệm đều bị giảm dưới tác động của đất mặn (năng suất giảm từ 24,2% - 26,65% đối với giống CR203; từ 15,0% - 16,69% đối với OM13; từ 13,8% - 14,96% đối với giống OM15; từ 12,0% - 13,86% đối với giống TH85). Như vậy giống chịu mặn tốt OM15 và TH85 bị giảm năng suất ít hơn so với các giống kém chịu mặn OM13 và giống không chịu mặn CR203. Đất mặn cũng giảm mạnh lượng nitơ tổng số, nitơ protein, protein và tổng lượng tất cả các axit amin của tất cả các giống lúa trong thí nghiệm.

Xử lý $KClO_3$ đã có tác dụng tăng số bông/cây, số hạt chắc/cây và năng suất lúa của tất cả các giống được thực nghiệm tại Tuy Phước, Bình Định trên đất nhiễm mặn và tại Yên Hưng, Quảng Ninh trên đất chua mặn (đất phèn). Hàm lượng nitơ tổng số, protein, tổng lượng các axit amin (trên đất không mặn tổng các axit amin bằng 5,88%; trên đất nhiễm mặn trị số đó chỉ còn bằng 5,78%, còn trên đất nhiễm mặn nhưng được xử lý $KClO_3$, tổng lượng các axit amin tăng lên đến 6,32% so với chất khô của hạt gạo. Đất mặn giảm nhiều axit amin không thay thế như arginine, phenylalanine, isoleucine, leucine, lysine; ngược lại, $KClO_3$ không chỉ tăng tổng các axit amin mà còn tăng một số axit amin không thay thế vốn đã bị giảm dưới tác động của đất mặn, đồng thời tăng hàm lượng nhiều axit amin thay thế và không thay thế so với môi trường đất không mặn.

Abstract

THE USE OF $KClO_3$ FOR INCREASING THE YIELD AND THE SEED QUALITY OF RICE CULTIVATED ON SALINE AND ON SALINE-ACID SULFATE SOILS.

NGUYỄN NHƯ KHANH, *Hanoi University of Education.*

Võ Minh Thư, *Qui nh-n teacher training College.*

The saline (at Tuy Phước district along the sea-coast of Binhđinh province of Center) and the saline- acid sulfate (at Yên Hưng district along the sea-coast of Quangninh province of North) of Vietnam decreased the yield and the rice grain quality (the content of protein and of aminoacid).

Addition of $KClO_3$ increased the yield of rice varieties (CR203 OM13, OM15, TH85, tám thơm, hồng công, nếp Thái Bình) from 3,60% to 13,39%, mainly, thanks to the increasing of the compact seed quantity. The $KClO_3$ speed up also the quality of the grain of rice, specially, the content of protein. The analysis of the aminoacid component of the grain of TH85 by the gas-liquid chromatography indicated that the total of aminoacids and the content of the unchangeable aminoacids as threonine, arginine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine and lysine increased under the action of $KClO_3$ in comparison with one of the rice cultivated on non-saline soil and on saline soil without an addition of this composite. The question that $KClO_3$ speed up the production of tám thơm variety to 113,9% in comparison with one on saline-acid sulfate soil without treatment by this composite and increased the content of protein and of unchangeable aminoacid lysine that is evaluated as the alimentary criteria of the grain of rice has the significance.

TÀI LIỆU THAM KHẢO.

Bùi Huy Đáp. Lúa Vietnam trong vùng lúa Nam và Đông Nam châu á. NXB Nông nghiệp. Hà Nội, 1978.

Nguyễn Văn Hiến. Luận án PTS khoa học nông nghiệp. ĐHNLI. Hà Nội, 1992.

Nguyễn Hữu Tê (chủ biên). Giáo trình cây lương thực (cây lúa). NXB Nông nghiệp. Hà Nội, 1997.

Đinh Văn Tinh. Các biện pháp hạn chế độ mặn của đất phèn để thâm canh lúa có tiềm năng năng suất cao - yếu tố dinh dưỡng hạn chế năng suất và chiến lược quản lý dinh dưỡng cây trồng. NXB Nông nghiệp. Hà Nội, 1995.

Đinh Đức Thành. Nghiên cứu khả năng phát triển lúa tám thơm trên đất chua mặn ven biển Yên Hưng, Quảng Ninh. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp. Hà Nội, 1999.

Võ Minh Thứ, Lê Dụ, Nguyễn Như Khanh. ảnh hưởng của NaCl và $KClO_3$ đến sự tích lũy các nguyên tố khoáng, hàm lượng nitơ và năng suất của giống lúa TH85. Tạp chí Sinh học, 1/1998, 50-53.

Viện Công nghệ sau thu hoạch. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Báo cáo đề tài: Nghiên cứu chất lượng gạo của một số giống lúa trong sản xuất (1997- 1998). Hà Nội, 1998.

Flowers T. J. and Yeo A.R. Effect of salinity on plant growth and crop yields. J. exp. Bot. 42/ 1998, 1442- 1445.

XÁC ĐỊNH TYP HLA-DR BẰNG KỸ THUẬT PCR-SSP

PHẠM ĐĂNG KHOA, VŨ TRIỆU AN

Bộ môn Miễn dịch-Sinh lí bệnh, Trường Đại học Y khoa Hà nội

(Với sự tham gia kỹ thuật của TẠ THỊ MẾN, PHAN MAI HOA)

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xác định typ HLA có vai trò quan trọng trong ghép tạng, bệnh lí gen học, khoa học hình sự, nhân chủng học. Việc định typ HLA được thực hiện nhờ 2 nhóm kỹ thuật chính: nhóm dùng các kỹ thuật huyết thanh và nhóm dùng các kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction). Xu hướng trên thế giới hiện nay là chuyển dần từ nhóm kỹ thuật huyết thanh sang nhóm kỹ thuật PCR, vì kỹ thuật PCR cho kết quả chính xác hơn. Nhóm kỹ thuật PCR bao gồm: PCR-SSP (PCR- sequence specific primer), PCR-SSO (PCR- sequence specific oligonucleotide), PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism)... , mỗi kỹ thuật đều có những ưu, nhược điểm riêng.

Ở Việt nam, việc định typ HLA mới được đặt ra trong những năm gần đây và cũng chỉ áp dụng nhóm kỹ thuật huyết thanh. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả thu được ban đầu về việc định typ HLA-DR bằng kỹ thuật PCR-SSP trên một nhóm người khoẻ mạnh, với mục đích hoàn chỉnh kỹ thuật để có thể áp dụng rộng rãi hơn trong tương lai.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng: 11 người khoẻ mạnh (nhân viên bộ môn Miễn dịch-Sinh lí bệnh và những người cho máu tại Viện Huyết học và Truyền máu).

Phương pháp: Chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR-SSP để xác định typ HLA-DR. Nguyên lí kỹ thuật: Khuếch đại một đoạn gen nhờ một cặp mồi đặc hiệu (primer), mỗi cặp mồi đặc hiệu cho một typ HLA. Quá trình khuếch đại được thực hiện qua nhiều chu kì, mỗi chu kì gồm 3 bước như sau:

- Bước 1: Tách chuỗi xoắn kép của ADN thành hai chuỗi đơn
- Bước 2: Gắn cặp mồi đặc hiệu vào một trong hai chuỗi đơn
- Bước 3: Kéo dài chuỗi dựa trên khuôn mẫu là một trong hai chuỗi đơn với nguyên liệu là các nucleotit.

Kết quả của quá trình khuếch đại là tạo ra được một lượng rất lớn đoạn gen đặc trưng cho từng typ HLA, làm cơ sở cho việc xác định typ bằng kỹ thuật điện di.

Kỹ thuật PCR-SSP bao gồm các khâu chính như sau:

1. Chiết tách ADN từ bạch cầu máu ngoại vi:

- Bạch cầu máu ngoại vi được phân lập từ 5ml máu nhờ li tâm phân lớp qua Ficoll.
- Bạch cầu được rửa với PBS (phosphate-buffered saline) 0,15M, pH7,2 rồi được xử lí với proteinase K ở 37° C qua đêm.
- Hỗn dịch được xử lí với dung dịch NaCl bão hoà để làm tủa protein, tủa protein được loại bỏ bằng li tâm.
- ADN có trong dịch nổi được làm tủa bằng ethanol 96%, rồi được tái hoà tan trong đệm TE (10mM Tris-HCl, 0,2mM EDTA, pH7,5).

2. Khuếch đại các gen đặc hiệu trong ADN

Khuếch đại các gen đặc hiệu trong ADN bằng các cặp mồi đặc hiệu, qui trình như đã được mô tả trước đây (1). Tóm tắt qui trình: 94°C trong 5 phút để hoạt hoá Ampli Taq Gold; sau đó là 40 chu kì: 94°C trong 1 phút, 60°C (với DR1 và DR10 là 58°C) trong 2 phút, 72°C trong 1

phút; cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Sản phẩm khuếch đại được chạy điện di để xác định typ HLA.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả định typ HLA-DR được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả định typ HLA-DR

Mẫu số	Typ HLA-DR
1	DR2/DR5
2	DR9
3	DR2/DR4
4	DR3/DR8
5	DR6/DR7
6	DR5/DR9
7	DR9
8	DR4/DR8
9	DR2/DR8
10	DR4/DR6
11	DR9

Trong tổng số 11 mẫu trên, mẫu số 1 (heterozygous: DR2/DR5) được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR-SSO tại phòng thí nghiệm quốc gia về hoà hợp mô, Bệnh viện Saint-Louis, Paris, Pháp và mẫu số 11 (homozygous: DR9) được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR-RFLP tại phòng thí nghiệm miễn dịch học, Khoa vi sinh và miễn dịch, Trường Đại học Y khoa Aichi, Nhật bản. Kết quả kiểm tra phù hợp với kết quả chúng tôi thu được bằng kỹ thuật PCR-SSP.

Bảng 2. So sánh tần xuất HLA-DR với một số tác giả khác

Tác giả	P.Đ.Khoa	V.T.An	B.K.Hoà
Typ HLA	(PCR-SSP) %	(PCR-SSO) %	(KT HT) %
DR1	0	0	8,6
DR2	15,78	14	14,6
DR3	5,26	0	9,4
DR4	15,78	8	24,8
DR5	10,52	31	12,7
DR6	10,52	9	9,4
DR7	5,26	5	4,6
DR8	15,78	5	4,6
DR9	21,05	14	3,8
DR10	0	4	15,3

Ghi chú: KT HT: kỹ thuật huyết thanh

Tuy mới chỉ khảo sát trên một số lượng nhỏ (11 mẫu), nhưng về cơ bản, kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của Vũ Triệu An (2), là những số liệu đã thu được bằng kỹ thuật PCR-SSO tại phòng thí nghiệm quốc gia về hoà hợp mô, Bệnh viện Saint-Louis, Pháp. Trong

bảng 2 đã cho thấy, tần xuất cao của DR2,5,9 và tần xuất thấp của DR1,3,7,10 được thấy ở kết quả của chúng tôi và của Vũ Triệu An. Kết quả của chúng tôi có một số điểm không phù hợp với Bạch Khánh Hoà (3), ví dụ như Bạch Khánh Hoà thấy tần xuất cao ở DR4,10, và thấp ở DR9. Điều này theo chúng tôi có lẽ do Bạch Khánh Hoà đã sử dụng kĩ thuật huyết thanh và có thể có sự khác nhau khi chọn mẫu ngẫu nhiên.

So với kĩ thuật PCR-RFLP hoặc PCR-SSO, kĩ thuật PCR-SSP không đòi hỏi các endonuclease, là các enzym đắt tiền, hoặc đòi hỏi màng nitrocellulo có gắn các nucleotit đặc hiệu, nhưng lại có hạn chế là chỉ dừng lại ở việc xác định các typ huyết thanh. Muốn xác định chính xác tới mức alen, như trong kĩ thuật PCR-RFLP hoặc PCR-SSO, thì kĩ thuật PCR-SSP cần rất nhiều cặp mỗi đặc hiệu, đây cũng là một hạn chế của kĩ thuật PCR-SSP.

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã hoàn chỉnh được kĩ thuật PCR-SSP, và lần đầu tiên ở Việt nam, đã áp dụng kĩ thuật PCR để xác định typ HLA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Qui Changchun và CS. Rapid HLA-DRB1 generic typing by PCR-SSP method. Chinese medical sciences journal 1995, 10 (1), 34-37.
2. A. Vu Trieu và CS. HLA-DR and -DQB1 DNA polymorphisms in a Vietnamese Kinh population from Hanoi. European journal of Immunogenetics 1997, 24, 345-356.
3. Bạch Khánh Hoà. Góp phần tìm hiểu bộ kháng nguyên bạch cầu ở Việt nam, kĩ thuật phát hiện và một số ứng dụng. Luận án Phó tiến sĩ y học, Hà nội 1990.

SUMMARY

DETERMINATION OF HLA-DR TYPE BY PCR-SSP

Determination of HLA (human leukocyte antigen) type kept an important role in organ transplantation, genetic diseases, forensic medicine, bioanthropology. HLA typing can be performed by sero-techniques and PCR (polymerase chain reaction) techniques. In Vietnam, it was carried out some years ago but by sero- technique. In this paper, we presented preliminary results of HLA-DRB1 typing by PCR-SSP (PCR- sequence specific primer) technique on 11 healthy subjects. Two of them were controlled by PCR-SSO (PCR- sequence specific oligonucleotide) or by PCR-RFLP (PCR- restriction fragment length polymorphism) techniques done in abroad laboratories (France and Japan). The results were discussed.

NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ GHÉP TRONG SẢN XUẤT RAU ĂN QUẢ VÀ CÂY ĂN QUẢ

TRẦN VĂN LÀI, LÊ THỊ THUỶ, PHẠM NGỌC LÝ

Viện Nghiên cứu Rau quả

I. MỞ ĐẦU

Rau quả có vị trí quan trọng trong đời sống con người. Nó cung cấp vitamin, muối khoáng, năng lượng cho con người. Đó cũng là yếu tố để đo chất lượng cuộc sống của chúng ta. Mức tiêu thụ quả của Việt Nam mới đạt 38-40 kg/người/năm, trong khi đó, các nước Châu Á đạt 62 kg/người/năm, Châu Phi đạt 77kg/người/năm. Ở Châu Mỹ La tinh đạt 169kgquả/người/năm. Mức tiêu thụ rau của Việt Nam mới đạt 64.5kg rau/người/năm (1); trong khi đó Trung Quốc đạt 250kg rau/người/năm; Nga đạt 203kg rau/người/năm; và mức trung bình của thế giới là 90kg rau/người/năm. Để thoả mãn nhu cầu nội tiêu là 8 triệu tấn rau, 6 triệu tấn quả và tạo mặt hàng xuất khẩu 3 triệu tấn rau quả và 1 tỷ đô la, đề án phát triển rau - hoa - quả năm 1999-2010 đã được Chính Phủ phê duyệt. Để góp phần đạt mục tiêu chiến lược trên, Viện Nghiên cứu Rau quả và 3 Trung tâm trực thuộc đã nghiên cứu thành công công nghệ ghép cây ăn quả và rau mang quả nhằm cung cấp cây giống tốt, chống chịu với điều kiện bất lợi của môi trường.

II. VẬT LIỆU, NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu công nghệ ghép cho tất cả các loại cây ăn quả có ở Việt Nam, đặc biệt chú trọng 2 loại cây khó ghép nhất là vải và nhãn.

- Vải: dùng vải chua, vải nhỡ, vải thiều
- Nhãn: dùng nhãn nước, nhãn thóc, nhãn lồng làm gốc ghép
- Mát ghép: dùng vải Thanh Hà đã thi tuyển chọn, nhãn lồng Phố Hiến chọn lọc làm mát ghép.

- Dụng cụ ghép là dao, kéo, dây buộc bán tự hoại dây 0,01mm

2. Nội dung nghiên cứu

Mùa vụ, kỹ thuật, tuổi cành ghép, vị trí cành ghép, độ dài, thời gian cành ghép,...

- Về rau ăn quả: Giống cà tím (*Solanum melongena* L.) chọn làm gốc ghép là các giống:
 - + Giống EG 203; EG 219 do Dr. Hubert de Bon mang từ AVRDC về năm 1999.
 - + Giống cà tím Ping Tung Long: là giống F1 của Công ty Chia Tai
 - + Giống cà tím địa phương: chống bệnh héo vi khuẩn
- Các giống cà chua dùng làm ngọn ghép là:
 - + XH2: Giống cà chua chịu nhiệt chọn lọc từ tập đoàn của Viện Nghiên cứu Rau quả
 - + VR2: Giống cà chua quả nhỏ chịu nhiệt, là giống quốc gia
- Công cụ ghép gồm: Xa lam, van cao su (van xe đạp) và một số dụng cụ khác.
- Cả gốc ghép và ngọn ghép được gieo vào khay nhựa 4 x 6 cm. Cây có đường kính cây bằng nhau.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu ghép trên cây ăn quả

1.1. Sử dụng gốc ghép của vải và nhãn trong công nghệ ghép

Kết quả theo dõi tỷ lệ sống của vải và nhãn là 2 loại cây khó ghép nhất vì có hàm lượng tananh cao. Kết quả thu được ở Bảng 1.

Bảng 1. Sử dụng gốc ghép trên vải và nhãn trong công nghệ ghép

Loại gốc ghép	Tỷ lệ ghép sống (%)	Tỷ lệ xuất vườn (%)
Cây vải		
Vải thiều	79,00	71,67
Vải nhỡ	78,33	70,33
Vải chua	75,67	69,33
CV%	3,63	-
Cây nhãn		
Nhãn lông	85,33	79,67
Nhãn nước	89,00	82,67
Nhãn thóc	86,67	81,00
CV%	3,21	-

Nói chung, các vật liệu chọn làm gốc ghép đều đạt tỷ lệ sống thấp nhất 75,67% và cao nhất là 89,0% và tỷ lệ cây đạt tiêu chuẩn xuất vườn 70-82,67%.

1.2. Thời vụ ghép

Tỷ lệ sống phụ thuộc vào nhiệt độ, độ ẩm, và cường độ ánh sáng mặt trời. Ở Việt Nam có thể ghép cả 12 tháng trong năm, nhưng 2 mùa có tỷ lệ sống cao và tỷ lệ xuất vườn cao là vụ xuân vào tháng 3 và tháng 4; vụ thu là tháng 9 và tháng 10 (Bảng 2). Trong sản xuất cây giống, muốn nâng cao chất lượng và hạ giá thành chúng ta cần chuẩn bị mọi điều kiện để đến mùa vụ có đủ và ghép tốt.

Bảng 2. Tỷ lệ ghép sống của vải và nhãn các tháng trong năm

Chỉ tiêu Tháng	Tỷ lệ ghép sống (%)		Tỷ lệ xuất vườn (%)		Thời gian ở vườn (tháng)	
	Vải	Nhãn	Vải	Nhãn	Vải	Nhãn
1	-	45,00 a	-	33,67 a		>22
2	38,00 a	51,67 b	29,67 a	44,33 b	>25	>22
3	75,67 c	82,33 c	69,33 c	72,67 c	14-18	10-15
4	77,00 c	84,67 c	70,33 c	75,33 c	14-18	10-15
5	60,33 b	70,67 b	51,67 b	69,67 b	14-18	10-15
6	58,00 b	68,00 b	49,67 b	61,33 b	14-18	10-15
7	56,00 b	65,33 b	42,33 b	58,67 b	14-18	10-15
8	54,33 b	66,67 b	40,33 b	58,33 b	14-18	10-15
9	78,67 c	86,00 c	70,00 c	78,67 c	21-25	18-21
10	80,00 c	87,33 c	74,00 c	81,00 c	21-25	18-21
11	64,67 b	70,67 b	55,67 b	62,00 b	21-25	18-21
12	32,67 a	42,00 a	24,67 a	35,00 a	21-25	18-21
CV	6,62	5,60	7,21	6,30	-	-

1.3. Kiểu ghép

Trên thế giới, người ta áp dụng nhiều phương pháp để ghép cho cây ăn quả như ghép nêm, ghép đoạn cành, ghép áp, ghép mắt, và ghép cửa sổ. Ở Viện Nghiên cứu Rau quả và 4 Trung tâm có nghiên cứu cả 4 kiểu ghép, trong 2 vụ thuận lợi nhất là vụ xuân và vụ thu. Kết quả như ở bảng 3. Phương pháp ghép nêm, ghép đoạn cành ở cả hai cây vải và nhãn cho tỷ lệ sống cao nhất, sau đó đến ghép mắt, ghép cửa sổ, và thấp nhất là ghép áp.

Bảng 3. Tỷ lệ ghép sống của các kiểu ghép trên vải và nhãn

Kiểu ghép	Vụ ghép	Tỷ lệ ghép sống (%)	Tỷ lệ xuất vườn (%)	Thời gian vườn ươm (tháng)
Cây vải				
Ghép nêm	Vụ xuân	75,67	69,33	14
Đoạn cành	Vụ thu	78,67	70,00	21
Ghép áp	Vụ xuân	27,33	14,19	17
	Vụ thu	35,00	21,07	26
Ghép mắt	Vụ xuân	54,50	45,00	17
Ghép cửa sổ	Vụ thu	52,67	45,67	26
Cây nhãn				
Ghép nêm	Vụ xuân	84,67	75,33	11
Đoạn cành	Vụ thu	87,33	81,00	18
Ghép áp	Vụ xuân	30,33	25,67	15
	Vụ thu	37,00	29,33	26
Ghép mắt	Vụ xuân	67,00	58,00	15
Ghép cửa sổ	Vụ thu	67,67	60,00	26

1.4. Tuổi cành ghép

Tuổi cành ghép có ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sống. Nếu cành quá non, hoặc quá già tỷ lệ sống đều thấp. Tốt nhất là cành bánh tẻ, tức là tuổi cành từ 4-6 tháng tuổi. Cành này ghép cho tỷ lệ sống cao nhất cả vụ thu và vụ xuân (Bảng 4)

Bảng 4. Ảnh hưởng của tuổi cành ghép đến tỷ lệ ghép của vải và nhãn

Vụ ghép Tháng tuổi	Vụ xuân		Vụ thu	
	Tỷ lệ ghép sống (%)	Tỷ lệ xuất vườn (%)	Tỷ lệ ghép sống (%)	Tỷ lệ xuất vườn (%)
Trên cây vải				
2-3	37,33	21,67	71,00	65,67
4-6	77,00	70,33	78,67	70,00
>6	70,33	43,00	62,33	40,67
CV%	8,26	-	7,80	-
Trên cây nhãn				
2-3	79,67	70,00	81,67	76,33
4-6	84,67	75,33	87,33	81,00
>6	66,33	69,00	69,00	55,00
CV%	5,82	-	5,20	-

1.5. Vị trí cành ghép

Trong cây có 2 loại cành có thể lấy để ghép đó là cành trong tán cây, và cành ngoài tán cây. Ở cây nhãn và cây vải cũng như các loại cây ăn quả khác, cành ngoài tán đủ ánh sáng quang hợp, tích lũy dinh dưỡng cao hơn, nên tỷ lệ sống cao hơn cành trong tán (Bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của vị trí cành ghép đến tỷ lệ sống

Vị trí cành	Tỷ lệ ghép sống vải (%)	Tỷ lệ ghép sống nhãn (%)
Trong tán	61,67	67,42
Ngoài tán	78,67	85,50

1.6. Độ dài cành ghép

Độ dài cành ghép sẽ mang mắt ghép, đoạn cành càng dài, thì mắt ghép càng nhiều. Tuy nhiên xét về góc độ kinh tế và kỹ thuật thì độ dài cành ghép nên có 2-3 mắt là vừa, một mắt thì quá ít, không đảm bảo, mà 4-5 mắt sẽ không kinh tế (Bảng 6).

Bảng 6. Ảnh hưởng độ dài cành ghép đến tỷ lệ sống của vải

Độ dài cành ghép (mắt)	Tỷ lệ ghép sống (%)
1	54,67
2-3	79,67
4-5	80,33
>5	71,00

1.7. Thời gian bảo quản cành ghép

Cành ghép cắt khỏi cơ thể, nguồn cung cấp nước và dinh dưỡng bị gián đoạn. Nếu nhiệt độ càng cao, sự bốc hơi nước càng lớn và hô hấp càng cao, tiêu hao nước và năng lượng, càng chống khô và tỷ lệ sống càng thấp.

Cành ghép được buộc nilông và giữ trong điều kiện nhiệt độ thấp 4-5⁰C và độ ẩm 90-95%. Điều kiện này có thể để 2-3 tuần. Nếu không có điều kiện cất giữ tốt thì nên ghép trong ngày, để sang ngày thứ 2 và thứ 3 tỷ lệ sống giảm dần (Bảng 7).

Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản cành ghép đến tỷ lệ sống

Thời gian bảo quản	Tỷ lệ ghép sống vải (%)	Tỷ lệ ghép sống nhãn (%)
1 ngày	86,47	85,67
2 ngày	74,33	76,75
3 ngày	60,00	64,33

1.8. Để lại gốc ghép

Thường khi ghép, gốc ghép cắt mất đoạn ngọn và ghép đoạn mắt ghép vào, ở đoạn gốc ghép thường không có lá gốc. Nếu có lá gốc, cây còn có tác dụng quang hợp và nuôi gốc ghép và mắt ghép, do vậy để lại gốc ghép tỷ lệ sống ở cả vải và nhãn cao hơn là dọn sạch lá gốc (Bảng 8).

Bảng 8. Ảnh hưởng của lá gốc đến tỷ lệ sống

Công thức	Tỷ lệ ghép sống trên vải (%)	Tỷ lệ ghép sống trên nhân (%)
Để lại lá gốc	79,50	86,67
Dọn sạch lá gốc	65,50	71,33

Kết quả nghiên cứu công nghệ ghép trên cây ăn quả đã ghép được hầu hết các loại cây và đã áp dụng thành công cho tất cả các tỉnh thành trong cả nước.

2. Công nghệ ghép cây rau ăn quả

Trong sản xuất rau, đặc biệt là rau ăn quả như cà chua, dưa chuột, dưa thơm, dưa hấu bị bệnh héo xanh vi khuẩn, Fusarium, phytophthora đe dọa. Mục đích của công nghệ ghép là để khắc phục bệnh hại và sản xuất rau quanh năm (Bảng 9).

Bảng 9. Mục đích của công nghệ ghép trong sản xuất rau ăn quả

TT	Giống ghép	Mục đích	Gốc ghép
1.	Dưa hấu	- Chống bệnh Fusarium - Chịu nhiệt độ thấp, chịu hạn hán - Tránh các bệnh rối loạn sinh lý	Bầu bí các loại
2.	Dưa chuột	- Giảm phần trên quả, chống bệnh Fusarium - Chịu nhiệt độ thấp, tăng sức đề kháng - Chống bệnh <i>Phytophthora melons</i>	Bí - bầu
3.	Dưa thơm	- Chống bệnh Fusarium, Phytophthora - Chịu nhiệt độ thấp - Tránh héo do rối loạn sinh lý	Bí - bầu
4.	Cà chua	- Chống bệnh héo vi khuẩn, Fusarium - Bệnh héo vàng <i>Pyrenochactalycopersici</i> - Tuyến trùng, mưa, ngập úng lụt	Cà tím
5.	Cà tím	- Chống bệnh héo vi khuẩn, Fusarium, tuyến trùng, bệnh <i>Verticillium alboatrum</i> - Chống nhiệt độ thấp và sức đề kháng	Cà pháo, cà bát

2.1. Tuổi cây ghép

Giống cà tím EG 203 làm gốc ghép và giống cà chua làm cây ghép. Khi cây cà chua đạt được 4 lá thật tức là 40 ngày sau khi gieo, cây đủ khoẻ, khả năng tiếp hợp cao và cho tỷ lệ sống cao (Bảng 10) và tỷ lệ cây đạt tiêu chuẩn trồng, chiều cao, và đường kính đều cao.

Bảng 10. Ảnh hưởng của tuổi cây ghép đến sinh trưởng và phát triển của cà chua ghép VR2/EG203

Công thức	Tỷ lệ cây sống (%)	Thời gian ghép đến		Tỷ lệ cây đạt tiêu chuẩn trồng %	Cao cây (cm)	Đường kính cây (mm)
		Hồi phục	Đem trồng			
2 lá thật (27 ngày)	38,5c	3	14	62,8b	5,4c	1,5c
4 lá thật (40 ngày)	92,6a	4	13	98,4a	9,4b	2,2c
6 lá thật (51 ngày)	59,6b	6	16	95,7a	11,5a	2,6a
CV%	5,43	-	-	3,09	2,78	6,2
LSD 0,05	6,84	-	-	6,23	0,53	0,5
LSD 0,01	-	-	-	10,30	0,87	0,7

2.2. Thời vụ ghép

Thời vụ ghép là vụ xuân và vụ thu. Cây trồng ra ruộng để đánh giá năng suất thực thu. Thời vụ ghép là vụ xuân trong tháng 2 và tháng 3 đã cho năng suất quả từ 18,6-22,0 tấn/ha (Bảng 11).

Bảng 11. Ảnh hưởng của thời vụ ghép đến các yếu tố năng suất và năng suất cà chua VR2/EG203 (1999)

T T	Thời kỳ ghép	Số hoa/cây	Tỷ lệ đậu quả (%)	Số quả/cây	Trọng lượng quả (g)	NS thương phẩm (t/ha)	NS thực thu (t/ha)
1.	15/2	256,7a	49,6b	127,3a	6,0b	18,1a	22,0a
2.	5/3	244,2b	40,3c	98,4c	6,5a	15,6b	18,6ab
3.	25/3	239,7b	30,5d	72,9e	6,3ab	6,3d	12,4c
4.	10/7	238,4b	37,5cd	89,4dc	5,0d	7,4cd	12,9e
5.	1/8	223,8c	42,8bc	95,8c	5,9bc	7,5cd	15,2bc
6.	20/8	193,7d	55,4a	108,4b	5,5c	9,1c	16,9b
	CV%	3,57	6,25	7,10	4,09	11,64	12,95
	LSD 0,05	10,66	4,69	7,97	0,44	2,26	3,85
	LSD 0,01	15,15	6,66	11,31	0,62	3,22	5,48

2.3. Chọn gốc ghép cho ngọn ghép cà chua

Trong các loại cà làm gốc ghép ở Việt Nam, giống cà tím làm gốc ghép, cà chua ghép trên gốc cà tím cho năng suất và yếu tố cấu thành năng suất cao nhất trong các loại cà làm gốc ghép (Bảng 12).

Bảng 12. Ảnh hưởng các loại gốc ghép đến NS và yếu tố NS cây cà chua (Vu hệ thu - 1999)

Công thức	Số chùm/cây	Tỷ lệ đậu quả (%)	Số quả/cây	TL trung bình quả (g)	Năng suất (t/ha)
Cà chua/cà tím	6,45a	41,0a	9,5b	137,1a	24,93a
Cà chua/cà pháo	2,80c	42,4a	6,2c	110,5b	12,81c
Cà chua/cà bát	4,70b	25,7b	8,3bc	115,6b	20,30b
Cà chua không ghép	7,10a	39,8a	11,7a	121,2b	25,10b
CV%	8,40	4,37	11,78	4,76	8,56
LSD 0,05	1,40	3,25	2,10	11,66	3,56
LSD 0,01	2,10	4,93	3,19	17,67	5,38

2.4. Khả năng chống chịu sâu bệnh của cà chua ghép VR2

Cà chua VR2 đã ghép lên 4 loại gốc ghép: cà tím EG203, EG219, Ping Tunglong và cà tím quả tròn. Kết quả ở bảng 13 cho thấy 2 giống cà tím có nguồn gốc AVRDC có khả năng chống chịu bệnh cao nhất.

Bảng 13. Ảnh hưởng của gốc ghép đến sâu bệnh hại cà chua ghép VR2

Công thức	Sâu đục quả (%)	Virus (%)	Héo vi khuẩn (%)	Héo Fusarium (%)
VR2/EG203	23,50	1,30	0,00	0,00
VR2/EG219	19,00	2,00	0,00	0,00
VR2/Ping Tung Long	19,34	0,00	2,40	3,50
VR2/cà tím quả tròn	28,10	1,10	6,70	0,00
VR2(cà chua không ghép)	17,20	2,10	7,70	2,6

2.5. Khả năng chống ngập úng của cà chua ghép VR2

Sau trận mưa rào đọng nước từ 3-5 ngày, cây cà chua không ghép VR2 đã chết với tỷ lệ là 13,6-14,2%. Trong khi đó, cây cà chua VR2/EG203 không chết cây nào (Bảng 14). Và do vậy năng suất cà chua ghép đã đạt 16,2 tấn/ha cà chua không ghép đạt 11,3 tấn/ha.

Bảng 14. Khả năng chống chịu sâu bệnh và chịu ngập úng của cà chua ghép VR2

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị	VR2/EG203	VR2
1.	Sâu đục quả	%	37,8	32,5
2.	Héo vi khuẩn	%	0,0	13,8
3.	Furasium	%	0,0	3,9
4.	Tuyến trùng	%	0,0	0,0
5.	Số cây chết sau mưa 3 ngày	cây	0,0	13,6
6.	Số cây chết sau mưa 5 ngày	cây	0,0	14,2
7.	Năng suất quả	t/ha	16,2	11,3

IV. KẾT LUẬN

Từ nghiên cứu công nghệ ghép trong sản xuất cây ăn quả và rau ở Việt Nam đã cho thấy:

1. Công nghệ ghép cây ăn quả ở Việt Nam, mới nghiên cứu và đưa vào sản xuất trong 5 năm lại đây và thu được kết quả tốt

Gốc ghép: Cây là gốc ghép là cây khỏe, chống chịu tốt, cây mắt ghép là cây năng suất cao, chất lượng tốt. Thời vụ ghép vào tháng 3, tháng 4 vụ xuân và tháng 9, tháng 10 vụ thu.

Kỹ thuật ghép: kiểu ghép nêm đoạn ngọn biểu hiện tính ưu việt về mọi mặt. Tuổi cành ghép từ 2-3 tháng tuổi, do tỷ lệ sống cao, riêng nhãn có thể non hơn một chút. Độ dài cành từ 2-5 mắt là phù hợp. Cành ghép ở vị trí ngoài tán tốt hơn ở trong tán và bảo quản 1-2 ngày cho tỷ lệ sống cao.

2. Công nghệ ghép cây rau ăn trái

Tuổi cành ghép 40 ngày lúc 4 lá thật là ghép tốt. Thời vụ ghép vào vụ xuân tháng 2-3 cho tỷ lệ sống cao. Gốc ghép tốt nhất là giống cà tím EG203, EG219. Cà chua ghép lên gốc cà tím chống bệnh tốt, chống úng tốt, cho năng suất cao, dùng để sản xuất rau quanh năm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. FAO, 1995. Demand and supply of vegetable and pulse in South Asia - Bangkok.
2. FAO, 1998. Crop diversification and export promotion project - Vietnam
3. Tran Van Lai, 1999. Development of vegetables and fruits - an important strategy in the agriculture.
4. Tran Van Lai, 1999. Peri-urban vegetable production in Vietnam. Regional meeting in Hanoi.
5. Penling-Wu-Jaw-Fen-Wang, 1999. Tomato seedling grafted with eggplant.
6. Phạm Ngọc Lý, 1998. Nghiên cứu nhân giống vải nhãn bằng phương pháp ghép. Trung tâm NC Rau quả Xuân Mai - Viện Nghiên cứu Rau quả.
7. Masayuki Oda, 1999. Grafting of vegetables to improve greenhouse production. Extension Bullentin 480
8. Lê Thị Thuý, 2000. Nghiên cứu ứng dụng phương pháp ghép trong sản xuất cà chua trái vụ. Luận án Thạc sỹ KHNN.

SUMMARY

Grafting technology of fruit crops and fruit vegetable crops supplies not only sufficient seedlings for production but also seedlings with good quality and resistance/tolerance to pests, diseases and unfavorable conditions. Over the past 10 years, the Research Institute of Fruits and Vegetables (RIFAV) has studied on grafting technology of fruit crops and fruit vegetable crops and obtained significant successes.

Regards to fruit grafting, we successfully studied on all fruit crops, especially 2 crops of litchi and longan which were difficultly grafted. A complete procedure on grafting technology of fruit crops (from rootstock utilization, grafting seasons, grafting types, scion age, scion position, scion length, to storage duration and scion) was given and largely applied in fruit production in Vietnam.

Fruit vegetable crops as tomato, cucumber, muskmelon, watermelon badly affected by bacterial wilt, Fusarium and Phytophthora. Grafting technology of fruit vegetable crops created seedlings were resistant/tolerant not only the above diseases but also the heat, which facilitates the off-season vegetable production in Vietnam conditions.

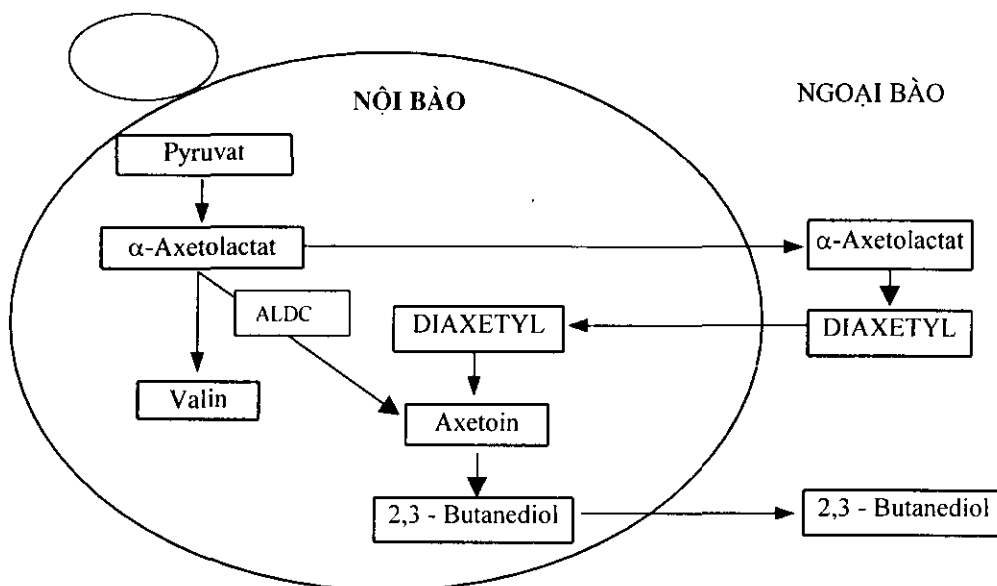
NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NẤM MEN ĐẾN HÀM LƯỢNG DIAXETYL TRONG QUÁ TRÌNH LÊN MEN BIA

THS. TRƯƠNG HƯƠNG LAN, TS. TRƯƠNG THỊ HÒA,
THS. NGUYỄN THU HÀ, KS. LẠI QUỐC PHONG
Viện Công nghiệp Thực phẩm

I. MỞ ĐẦU

Lên men bia là một quá trình sinh hóa vô cùng phức tạp. Dịch đường trích ly từ malt đại mạch và hoa houblon được nấm men chuyển hóa thành các sản phẩm chủ yếu là cồn, CO₂. Ngoài ra phải kể đến hàng loạt các sản phẩm phụ khác như rượu bậc cao, este, aldehyt, glycerin, cacbonyl, các hợp chất chứa sunfua, tạo nên cho bia một hương vị đặc trưng.

Diaxetyl là một sản phẩm phụ của quá trình lên men bia. Ngược lại với đa số các chất khác được hình thành trong quá trình tăng trổ thường làm tăng chất lượng của bia, diaxetyl lại là một chất gây ra mùi khó chịu cho bia với ngưỡng cảm nhận là 0,1mg/l[2,3,6,8]. Diaxetyl còn gây ra cảm giác đau đầu khi có mặt trong bia với nồng độ lớn. Cơ chế tạo thành và khử diaxetyl trong quá trình lên men bia như sau (hình 1).



Hình 1: Quá trình hình thành và khử diaxetyl của nấm men trong quá trình lên men bia

ALDC: enzym axetolactat decarboxylaza (chỉ có ở tế bào nấm men đã được chuyển gen mã hóa enzym axetolactat decarboxylaza từ vi khuẩn *Ent.aerogenes* sang).

Diaxetyl là sản phẩm phụ của con đường tạo thành valin. Axít α -axetolactat, chất trung gian của con đường tổng hợp valin được tiết ra ngoài môi trường lên men. ở đây diễn ra quá trình cacboxy-oxy hóa tự phát, chuyển axit α -axetolactat thành diaxetyl. Sau đó, diaxetyl được nấm men khử thành acetoin. Quá trình khử này kéo dài trong suốt cả quá trình lên men phụ cho đến khi nồng độ diaxetyl xuống dưới mức cảm nhận. Acetoin và 2,3-pentanediol là những chất có ngưỡng cảm nhận cao hơn diaxetyl rất nhiều và do vậy sản phẩm bia cuối cùng có hương vị chấp nhận được [5,6].

Rất nhiều nguyên nhân dẫn đến tình trạng bia có hàm lượng diacetyl cao, bao gồm kết cấu nguyên liệu chưa hợp lý, quy trình công nghệ chưa phù hợp, thiết bị không theo tiêu chuẩn [6].. trong đó nấm men bia là một nhân tố đóng vai trò quyết định[5,6,9,10].

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chủng giống vi sinh vật và nguyên liệu

- Các chủng nấm men *Saccharomyces carlbergensis* thuần khiết trong bộ sưu tập nấm men bia của Bộ môn Thực phẩm, Viện Công nghiệp Thực phẩm ký hiệu YCFD 11, YCFD 24, YCFD 29, YCFD 43, YCFD 66, YCFD 67, YCFD 70, YCFD 78.

Malt đại mạch Pháp, gạo IR 203 Việt Nam, hoa houblon Đức

2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp công nghệ: đường hóa với tỷ lệ gạo thay thế malt đại mạch là 30%.

- Phương pháp phân tích hóa học và vi sinh: hàm lượng diacetyl được xác định theo AOAC, 1995[1], nồng độ chất hòa tan, số lượng tế bào được xác định theo EBC, 1987[4].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. ảnh hưởng của chủng giống nấm men bia đến hàm lượng diacetyl trong lên men bia

Các chủng giống nấm men bia rất khác nhau về đặc tính sinh lý, sinh hóa như tỷ lệ nảy chồi, hiệu suất lên men, khả năng kết lắng. Khả năng tạo thành và khử diacetyl trong quá trình lên men là một trong những tính chất đặc trưng của từng chủng nấm men bia. Khả năng này cũng là một trong những chỉ tiêu để đánh giá chất lượng của chủng giống về mặt công nghệ. Xác định hàm lượng diacetyl sau khi kết thúc quá trình lên men chính của 8 chủng nấm men *Saccharomyces carlbergensis* trong sưu tập giống của Bộ môn Thực phẩm, Viện Công nghiệp Thực phẩm, chúng tôi thu được kết quả trình bày trong bảng 1 và hình 2.

Bảng 1. Hàm lượng diacetyl tạo thành và phân hủy diacetyl trong quá trình lên men của 8 chủng nấm men bia nghiên cứu

Ngày y	Hàm lượng diacetyl của các chủng nấm men (mg/l)							
	YCFD 11	YCFD 24	YCFD 29	YCFD 43	YCFD 66	YCFD 67	YCFD 70	YCFD 78
1	0,08	0,25	0,37	0,29	0,18	0,22	0,20	0,35
2	0,21	0,55	0,64	0,59	0,48	0,49	0,48	0,71
3	0,44	0,97	1,02	0,85	0,77	0,75	0,85	0,98
4	0,78	1,33	1,38	1,14	1,21	0,92	1,19	1,77
5	0,56	0,91	1,07	1,00	0,90	0,71	0,94	1,49
6	0,35	0,65	0,68	0,82	0,67	0,55	0,62	1,12
7	0,24	0,42	0,33	0,63	0,50	0,38	0,35	0,75
10	0,20	0,34	0,26	0,52	0,42	0,30	0,28	0,51
15	0,15	0,27	0,20	0,40	0,37	0,25	0,20	0,45
20	0,10	0,22	0,15	0,32	0,25	0,19	0,16	0,38

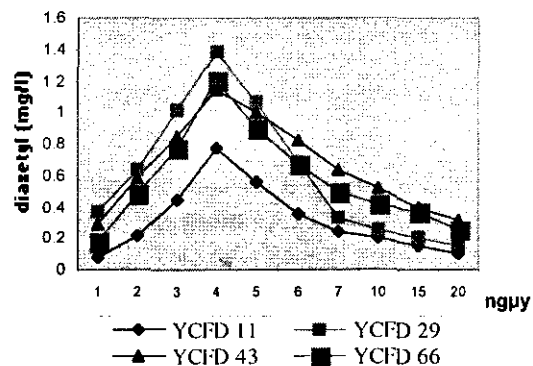
Ghi chú: Điều kiện lên men: nồng độ chất hòa tan ban đầu: 11°Bx; nhiệt độ lên men: 12°C; thời gian lên men chính: 7 ngày; thời gian lên men phụ: 13 ngày.

Kết quả trên bảng 1 và hình 2 cho thấy, các chủng nấm men bia khác nhau thì khả năng tạo thành và khử diacetyl khác nhau đáng kể trong quá trình lên men. Chủng YCFD 11 có khả năng khử diacetyl rất tốt. Sau 7 ngày lên men chính, hàm lượng diacetyl trong dịch lên men là 0,24 mg/l, trong khi đó các chủng còn lại có hàm lượng diacetyl từ 0,25-0,63mg/l. Và sau 13 ngày lên men phụ, chủng YCFD 11 đã khử hàm lượng diacetyl trong dịch lên men xuống còn 0,1 mg/l, thấp nhất trong các chủng nghiên cứu. Có 3 nguyên nhân dẫn đến sự khác nhau về hàm lượng diacetyl của các chủng nấm men bia trong thời gian lên men là:

- Nhu cầu về axit amin, đặc biệt là khả năng tiêu thụ valin của các chủng nấm men khác nhau trong quá trình lên men thì không giống nhau.

- Hoạt lực của enzym khử diacetyl reductaza ở mỗi chủng nấm men thể hiện mạnh yếu khác nhau. Nấm men mang gen mã hóa enzym diacetyl reductaza có hoạt tính cao thì quá trình phân hủy diacetyl trở nên nhanh và mạnh hơn. ở chủng YCFD 29, mặc dù lượng diacetyl tạo ra đạt cao nhất vào ngày thứ 4 là 1,38 mg/l, cao hơn so với giá trị tương ứng ở chủng YCFD 66 (1,21mg/l) , nhưng sau đó, quá trình khử lại xảy ra mạnh mẽ hơn. Kết thúc quá trình lên men, hàm lượng diacetyl của chủng YCFD 29 chỉ còn 0,15 mg/l, thấp hơn so với hàm lượng này ở chủng YCFD 66 (0,25 mg/l).

- Nấm men có khả năng kết lắng nhanh thì hạn chế quá trình phân hủy diacetyl. Vì có khả năng kết lắng tốt ở cuối giai đoạn lên men chính nên chủng YCFD 43 chỉ còn lại một số ít tế bào nấm men lơ lửng trong dịch lên men thực hiện quá trình khử diacetyl, do vậy, kết thúc quá trình lên men, hàm lượng diacetyl còn khá cao (0,32 mg/l). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Fix (1993) tiến hành trên 3 chủng nấm men W-206, W-34/70, W-308. Trong đó chỉ có 2 chủng W-206, W-34/70 có khả năng khử diacetyl tốt. Còn chủng thứ 3 khả năng phân hủy diacetyl rất thấp do đã kết lắng rất nhanh trước khi chuyển sang giai đoạn lên men phụ (5).



Hình 2: Động học tạo thành và phân hủy diacetyl của 4 chủng nấm men bia YCFD11, YCFD 29, YCFD 43, YCFD 66

3.2. ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống nấm men đế hàm lượng diacetyl trong lên men bia

Tiến hành lên men bia với tỷ lệ tiếp giống ban đầu thay đổi từ 10×10^6 tế bào/ml đến 30×10^6 tế bào/ml ở dịch đường 11°Bx, nhiệt độ lên men 12°C, chúng tôi nhận thấy khi tỷ lệ tiếp giống ban đầu càng cao thì hàm lượng diacetyl được tạo thành trong quá trình lên men bia càng thấp. Kết quả trên bảng 2 đã chứng minh điều này. Khi tỷ lệ nấm men tiếp giống ban đầu là 10×10^6 tế bào/ml, hàm lượng diacetyl sau khi lên men là 0,15 mg/l, cao hơn so với giá trị này ở nồng độ nấm men ban đầu 20×10^6 tế bào/ml (0,1 mg/l).

Bảng 2. ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống nấm men đến hàm lượng diaxetyl

Ngày	10x10 ⁶ tế bào/ml			20 x10 ⁶ tế bào/ml			30x10 ⁶ tế bào/ml		
	Bx	OD	DA (mg/l)	Bx	OD	DA (mg/l)	Bx	OD	DA (mg/l)
0	11,0	0,36	0	11,0	0,57	0	11,0	0,75	0
1	10,4	1,22	0,1	10,1	1,47	0,12	9,8	1,68	0,15
2	9,4	1,98	0,34	8,0	2,30	0,21	7,5	2,61	0,28
3	8,0	2,29	0,71	7,0	2,55	0,44	6,5	2,01	0,51
4	6,8	2,48	0,95	6,3	1,82	0,78	5,8	1,33	0,72
5	6,2	1,96	0,8	5,6	0,80	0,56	5,2	0,67	0,48
6	5,7	1,01	0,52	5,2	0,37	0,35	5,0	0,43	0,27
7	5,3	0,46	0,34	5,0	0,20	0,24	-	0,32	0,20
8	5,0	0,22	0,28	-	0,19	0,22	-	0,25	0,17
10	-	0,2	0,23	-	0,18	0,20	-	0,19	0,15
15	-	0,19	0,18	-	0,17	0,15	-	0,18	0,1
20	-	0,17	0,15	-	0,16	0,10	-	0,18	0,07

Nguyên nhân là khi mật độ nấm men cấy giống ban đầu càng lớn thì tỷ lệ số tế bào nảy chồi càng thấp, do vậy, cường độ trao đổi chất của tế bào trẻ cũng thấp hơn, cuối giai đoạn lên men chính sẽ có ít tế bào già và chết. Và hàm lượng diaxetyl mau chóng bị phân hủy thành axetoin nhờ những tế bào nấm men vẫn còn hoạt tính khử mạnh. Mặc dù tỷ lệ tiếp giống ban đầu 30x10⁶ tế bào/ml cho hàm lượng diaxetyl cuối quá trình lên men là 0,07 mg/l nhưng lại tạo cho bia thành phẩm có mùi “men” khó chịu.

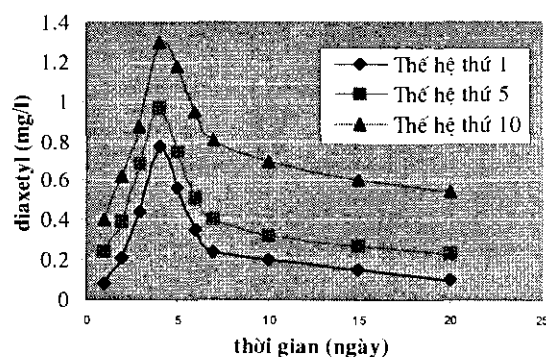
3.3. ảnh hưởng của sự thoái hóa nấm men đến hàm lượng diaxetyl trong lên men bia

Thoái hóa là hiện tượng nấm men bị giảm hoạt lực dần dần qua các thế hệ sử dụng trong quá trình sản xuất bia. Nấm men bị thoái hóa có những ảnh hưởng không tốt đến quá trình lên men bia với các biểu hiện có thể quan sát được như lên men chậm, ít bọt, kết chùm yếu, khả năng lắng kém. Do vậy, khi sử dụng nấm men ở dạng men sữa ở các thế hệ khác nhau thì nồng độ diaxetyl trong bia thành phẩm có sự khác biệt nhau đáng kể. Bảng 3 và hình 3 biểu diễn sự thay đổi về khả năng tạo thành và phân hủy diaxetyl qua các thế hệ khác nhau của chủng YCFD 11.

Bảng 3. Khả năng tạo thành và phân hủy diaxetyl qua các thế hệ của YCFD 11

Ngày	Hàm lượng diaxetyl (mg/l)					
	Thế hệ thứ 1	Thế hệ thứ 2	Thế hệ thứ 4	Thế hệ thứ 5	Thế hệ thứ 7	Thế hệ thứ 10
1	0,08	0,12	0,15	0,24	0,31	0,40
2	0,21	0,24	0,29	0,39	0,45	0,62
3	0,44	0,51	0,55	0,68	0,77	0,88
4	0,78	0,80	0,83	0,97	1,08	1,30
5	0,56	0,55	0,58	0,75	0,89	1,18
6	0,35	0,38	0,4	0,51	0,66	0,95
7	0,24	0,27	0,31	0,40	0,52	0,81
10	0,20	0,22	0,25	0,32	0,43	0,69
15	0,15	0,16	0,18	0,27	0,36	0,60
20	0,10	0,12	0,14	0,23	0,30	0,54

Như vậy, khi tái sử dụng men sữa qua nhiều đời thì hàm lượng diacetyl trong bia thành phẩm càng cao. Trong 4 thế hệ đầu, mức độ tăng không nhiều. Nhưng từ thế hệ thứ 5 trở đi, sự khác nhau về hàm lượng diacetyl trong bia thành phẩm càng trở nên rõ rệt hơn. Ở thế hệ thứ 7, sau chu kỳ lên men 20 ngày, giá trị diacetyl đạt 0,30 mg/l và ở thế hệ thứ 10 là 0,54 mg/l. Trong quá trình phát triển và lên men trong dịch đường, nấm men phải chịu tác động của nhiều yếu tố, như nhiệt độ, áp suất ... đôi khi không có lợi cho tế bào, nên năng lực lên men của chúng bị giảm dần qua các thế hệ.



Hình 3 - Khả năng tạo thành và phân hủy qua các thế hệ của chủng nấm men YCFD 11

Đồng thời, việc tái sử dụng nấm men qua nhiều thế hệ cũng làm tăng dần các thể đột biến thiếu năng hô hấp trong quần thể tế bào nấm men. Theo Priest, với số lượng xấp xỉ 10^{13} tế bào/hl dịch lên men, việc xuất hiện các thể đột biến là không tránh khỏi (9). Những tế bào có năng lực lên men bị suy giảm và các thể đột biến đã sinh ra một lượng diacetyl khá lớn, trong khi đó khả năng khử diacetyl lại rất hạn chế. Ngoài ra, một yếu tố cũng có ảnh hưởng đến sự gia tăng của diacetyl khi sử dụng nấm men qua nhiều thế hệ. Đó là sự xâm nhiễm của các vi khuẩn Gram dương như *Lactobacillus*, *Pediococcus*. Các vi khuẩn này đều có khả năng sinh ra diacetyl. Tuy nhiên, trong điều kiện các thiết bị được vệ sinh sạch sẽ, dịch đường được khử trùng tốt, men sữa được xử lý theo đúng tiêu chuẩn thì nguyên nhân này có thể được loại trừ.

IV. KẾT LUẬN

Nấm men có vai trò rất quan trọng đến sự hình thành và khử diacetyl trong quá trình lên men bia. Trong số 8 chủng nấm men bia chìm ở sưu tập giống nấm men của Bộ môn Thực phẩm, Viện Công nghiệp Thực phẩm, chủng YCFD 11 có khả năng khử diacetyl tốt nhất với hàm lượng diacetyl sau 20 ngày lên men (7 ngày lên men chính, 13 ngày lên men phụ) là 0,1 mg/l. Tỷ lệ tiếp giống nấm men 20×10^6 tế bào/ml là cần thiết để chủng YCFD 11 vừa có khả năng khử diacetyl tốt, vừa không gây ra mùi “men” khó chịu. Hàm lượng diacetyl tăng từ 0,1 mg/l ở thế hệ thứ nhất lên 0,23 mg/l ở thế hệ thứ 5 và 0,54 mg/l ở thế hệ thứ 10.

Summary

Effect of brewing yeast on diacetyl formation in fermentation

MSc. Trương Hương Lan, Dr. Trương Thị Hoa,
MSc. Nguyễn Thu Hà, Eng. Lai Quốc Phong
Food Industry Research Institute

Diacetyl - the compound responsible for buttery or butterscotch flavour is one of the most quality parameters of brewing. Yeast strains play an important role on diacetyl formation in fermentation. In this paper, 8 lager strain YCFD 11, YCFD 24, YCFD 29, YCFD 43, YCFD 66, YCFD 67, YCFD 70, YCFD 78 in Yeast Collection of Food Department (FIRI) are investigated. YCFD 11 is regarded as excellent reducer with 0,1 mg/L on the 20th of fermentation (primary fermentation 7 days, maturation 13 days). Yeast behavior for YCFD 11 also vary with pitching rate and reuse enable YCFD 11 to reduce diacetyl effectively. Results indicate that pitching rate is 20×10^6 Cell/ml increases in the diacetyl formed with

repotting. Diacetyl level is 0.1 mg/L at the first generation; 0.23 mg/L at the fifth generation and 0.54 mg/L at the tenth generation.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AOAC Official Method of Analysis, 1995, 27, 6-13.
2. Brenner, M. W, 1970, A Practical Brewer's View of Diacetyl, MBAA, Tech. Quart, N.43.
3. Engan, S, 1972, Wort Composition and Beer Flavour, J. Inst. Brew, N7, P.169.
4. Europ Brewery Convention, Analytica E. B. C. Sweizer Branerei Rudschau, 1987.
5. Fix, G. J. 1992, Diacetyl Formation, Reduction and Control in Beer and Brewing. Brewers publication, Boulder, Colorado, p.66-72.
6. Inoue, T, 1992, A review of diacetyl control technology, Proc. Conv. Institute of Brewing (Australia and Newzealand Section), Melbourne, p.76-79.
7. John, G.; Piesley, T., and Tomas, L., 1977, Yeast - Strain and Handling Techniques, In The Practical Brewer, A Manual for Brewing Industry, Unites State of America, p.183 - 195.
8. Morrison, N. M., and Bendiak, D. S., 1987, Today's Diacetyl. The Total Vicinal Diketone Profile of Beer, Tech. Q. Master, Brew. Am, p.24, 14.
9. Priest, F.G., 1987, Brewing Microbiology, Elsevier Applied Science Publishers, p.31-36.
10. Steward, G.G. and Russell I., 1998, Brewing Science & Technology, Series III, Brewer's Yeast, The Inst. Bwer. London, England. p.29.

INVESTIGATION ON THE SIGNIFICANCE OF ABSCISIC ACID FOR SOMATIC EMBRYOGENESIS OF SOME DAUCUS SPECIES INCLUSIVE TRANSGENIC STRAINS

TRAN THI LE
Hue Agricultural-forestry university

1. INTRODUCTION

A fundamental characteristic of every living being is productivity, which is shown in its growth, cell-division and reproduction. In the kingdom of plants vegetative reproduction exists besides sexual reproduction. According to Neumann and Grieb (1992) somatic embryogenesis represents a form of asexual reproduction, where under certain conditions embryos may develop out of somatic cells.

In plants somatic embryos are similar to zygotic embryo not only on a morphological- anatomical level but also on a biochemical-molecularbiological and genetic level (Dodeman et al., 1997). The development of somatic embryo is strikingly similar to the ones of zygotic embryogenesis.

After Reinert (1958, 1959) and Steward et al. (1958) independently succeeded for the first time in finding somatic embryos in tissue culture of *Daucus carota*. L, a lot of information was gained in respect to factors which can influence somatic embryogenesis.

Phytohormones play a central part in plant development. This is also true for the development of somatic embryos in-vitro. Schaefer et al. (1985), Li and Neumann (1985) were able to show in earlier experiments, that the established petiole-system of *Daucus carota*. L represents an ideal model for studies in development physiology regarding somatic embryogenesis.

From the literature it is known that ABA has a positive effect on the somatic embryogenesis of some species (Ammirato, 1977, 1985; Nadel et al., 1990). Pleschka (1995) did experiments about the influence of ABA on the somatic embryogenesis of *Daucus carota* L.. She showed, however that ABA can have also a negative influence.

In this thesis it was investigated, in what way ABA effects somatic embryogenesis of different kinds of *Daucus*.

The following points have been investigated:

- Is there a connection between the endogenous ABA-concentration of the petiole of explantation and the ability for somatic embryogenesis?
- What effect has the addition of exogenous ABA concentration on somatic embryogenesis?
- Can the induction of somatic embryogenesis be promoted through the supply of exogenous ABA?

For some years molecular genetic methods have had a strong influence on our understanding of biochemistry, physiology and the genetics of phytohormones or plants development (Schnell et al., 1993). Genetics is a new and fascinating field of research in the more developed plants. Inclusion of a desired foreign gene through gene-technics creates a unique genetic model in order to investigate the expression of the foreign gene in the new genetic environment. In the field of hormones transgenic plants contribute significantly to the understand of the modes of synthesis and biological functions.

II. MATERIAL AND METHODS

In seven *Daucus*-species and subspecies, which originally come from different continents made available by the Federal Institution of plant breeding Quedlingburg, Germany the ability for somatic embryogenesis was investigated.

The ABA-concentration in the starting material was determined via HPLC.

For the petiole-investigation two media were used: NL2 and B5. These mainly differ in their composition of the auxin- and the nitrotype used:

- NL2 contains IAA and NO₃⁻ and
- B5 contains 2,4-D and NO₃⁻/NH₄⁺

The salt-promotor is a ABA sensitive promotor sequence, which was cut from the plasmid pGVB 310, then combined with the plasmid pPCV 812 and connected with the GUS-reporter gene. The construct was first transformed into E.coli HB 101 and then into *Agrobacterium tumefaciens* by conjugation.

For this transformation a cell-cycle-synchrone carrot-cell-suspension (*Daucus carota* var. Rotin) was used in order to raise the transformation rate, because the integration of foreign DNA usually occurs in replizied DNA.

Through somatic embryogenesis, plants were obtained from transgenic cell-suspensions (Salt-GUS)

In order to guarantee, that they were really transgenic plants, PCR and Southern-blot were used.

III. RESULTS

3.1 Somatic embryogenesis and ABA-concentration in petioles of different species and subspecies of *Daucus*

In respect to the ability for somatic embryogenesis of the *Daucus* species they can be divided into two groups:

Daucus carota var. Rotin, *Daucus halophilus*, *Daucus carota maximus* and *Daucus carota maritimus* belong to the embryogenic group.

The potential for somatic embryogenesis decreases as shown in the following sequence:

D.c.var. Rotin □ *D. halophilus* □ *D.c maximus* □ *D.c.maritimus*

According to these experiments the petiole of *Daucus muricatus*, *Daucus pusillus* and *Daucus mondevidensis* cannot differentiate somatic embryos.

The hormone-analysis showed, that the ABA-concentration is highest in *D.c.var. Rotin* and lowest in *D. momdevidensis*. But it is noteworthy, that *D.c. maritimus* only shows a relatively low ABA-concentration, although it proved to be embryogenic.

Daucus species and - subspecies	Endogenous ABA-concentration (ng/g FG)	Somatic Embryogenesis			
		NL2-system		B5-system	
		-ABA	+ABA	-ABA	+ABA
<i>Daucus carota</i> . Var. Rotin	34,35	+	+	+	+
<i>Daucus halophilus</i>	16,90	+	+	+	+
<i>Daucus carota maximus</i>	13,49	+	+	+	+
<i>Daucus carota maritimus</i>	7,75	-	+	+	+
<i>Daucus muricatus</i>	7,53	-	-	-	-
<i>Daucus pusillus</i>	3,15	-	-	-	-
<i>Daucus mondevidensis</i>	2,17	-	-	-	-

Table 1: The endogenous concentration of ABA in petiole explantates and influence of exogenous ABA (t₀) on the somatic embryos in petiole-explantates of different *Daucus*-genoms in two different media solution (Evaluation: 42 days after ABA-application).

From the literature it is known, that ABA can promote somatic embryogenesis in many plantspecies. However the concentration used for this purpose differs widely from species to species and depends on the various development stages. Therefore the optimal ABA-concentration was determined first. The following concentrations were examined: 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 5×10^{-5} M.

According to the above results an ABA-concentration of 10^{-7} M was chosen in order to test the influence of exogenous ABA on the ability of embryogenesis of seven above named species of *Daucus*.

3.2 The influence of 10^{-7} M ABA on the morphological differentiation and somatic embryogenesis of petiole explantates of different *Daucus*-species and *Daucus*-subspecies in the NL2- and B5-system

ABA disturbed root-development and root-formation in *D.c.var.Rotin*.

The earlier the hormone was added to the medium, the less callus was formed and correspondingly fewer somatic embryos could be observed. Generally speaking the induction of somatic embryogenesis was not impeded as very early basic embryonal stages could be observed.

The *D. halophilus*, *D.c.maximus* and *D.c.maritimus* showed that petiole-growth and callus-formation were increased when ABA was added. The number of embryos also increased. However, root-growth and root-formation were disturbed.

The explantates of *D.c.maritimus*, which generated no somatic embryos in the NL2-system, was able to do so under the influence of 2,4-D (see table.1)

D.muricatus, *D. pusillus* and *D. mondevicensis* showed almost no reaction

3.3 The influence of ABA on the expression of the SalT-promotor linked to the GUS-reportergen in somatic embryos and plants

At first it was examined whether the addition of ABA regulates the promotor expression in the cell-suspension. The SalT-promotor became active after an ABA-supply of 10^{-7} M was added to the auxin containing B5-medium of the cell-suspension. Based on the glucuronidase-reaction, blue colouring could be observed. The blue colour in the culture became stronger after 10 hours.

A PCR-analysis resulted in the distinction between transgenic and non-transgenic plants. Amplification demonstrated the integration of the SalT-promotor in the genome of recipient culture. The Southern-blot showed that the gene-construct was installed at least two times in the genome of transgenic plants.

After transferring the cell-suspension into an auxinfree B5-medium, somatic embryos developed. But even after ABA-addition to the medium no activity of the SalT-promotor via glucuronidase-reaction could be found in the somatic embryos. Contrary to this, the promotor however became active in the veins of an older leaf from an 8-weeks-old plant, but not in younger leaves.

When petiole-explantates for the induction of somatic embryogenesis were cultured in an IAA-containing NL2-medium no activity of the SalT-promotor was found in the culture neither after 24-hours, 5 days, 9 days nor 12 days. If the medium contained an additional 10^{-4} M ABA, however a blue colouring was observed in the area of the veins of the leaf and near glandular canals of the plant. The blue colour disappeared in a longer lasting culture.

These observations prove that exogenous ABA enters through the laceration of the explantates and is then transported via the veins of the leaf and glandular canals of the plant.

IV. DISCUSSION AND CONCLUSION.

According to Grieb et al. (1997) the petiole-explantates of the highly embryogenic carrot species "Rotin" shows a high endogenous ABA- level before culturing. However during the culturing process the ABA-concentration decreased continuously. In the beginning, only low IAA-concentrations can be found in the initial material. These increase strongly in the culture on the 6th day. After that IAA decreases gradually.

Simultaneously with the IAA-peak the root-primordia appear. A few days later individual cells in the sub-epidermal area become embryonic. At this time the concentration of individual Cytokinines increases. Besides the morphological changes, changes on the protein-level were found.

The aim of this thesis is therefore to investigate more exactly the part of ABA.

The question in which of the three phases of somatic embryogenesis (de-differentiation, induction and realisation) the hormone intervenes as a regulator was also of interest. The results show that the species and sub-species considered earlier as embryogenic, show higher endogenous ABA-concentrations before culturing.

The species *D. pusillus*, *D. muricatus* and *D. mondevicensis* (in the B5- and NL2-system) and *D. c. maritimus* (in the NL2-system) which had not differentiated somatic embryos under these conditions showed the lowest ABA-levels.

From these investigations results in respect to ABA the following picture emerges: the complete course of the developmental program-"somatic embryogenesis", - does not seem to be possible, if there are no specific endogenous ABA-concentrations in the petiole before taking explants. For this a specific optimal -incipient value seems to be necessary. Beyond this incipient-value somatic embryogenesis is impeded. Thus the petiole-explants of *D. c. var. Rotin* e.g. differentiated fewer somatic embryos when ABA was added to the medium at an early stage. *D. c. var. Rotin* shows the highest endogenous ABA-concentration already in the initial material. Root-growth and root-formation were also affected by this impeding influence.

As a consequence of adding ABA to the medium the endogenous ABA-concentration was perhaps so high, that the new hormone-balance had a negative effect on both developmental processes (rhizogenesis and somatic embryogenesis).

This leads to the conclusion that the somatic embryogenesis requires specific endogenous ABA-concentration in the explantates. Below the incipient apparently does not make somatic embryogenesis possible, as earlier experiments in respect to the ability of embryogenesis in different species of *Daucus* and different culture concentration showed.

These observations explain that not only the known influence of the IAA/Cytokinin-balance plays a part in this differentiation-process in respect to root-formation but also the ABA balance in respect to both hormones.

The effect of ABA on somatic embryogenesis depends on the time. Thus experiments with petiole-explantates of *D. c. var. Rotin* showed, that embryo-development only proceeds up to the PEMs when the concentration of 10^{-7} M was added before day 7 of culture to the medium. When ABA was added on a later day higher stages of development in the embryo were observed. This result coincides with earlier observations of Ammirato (1985) and Pleschka (1995).

The results show furthermore, that the induction of somatic embryogenesis was not generally impeded by the ABA-addition to the medium, because PEMs were found in all cases. However further embryo-development and thus the realisation-phase are effected by the changed endogenous hormone-balance which was shown induction in earlier experiments of Ammirato (1977, 1985).

The experiments with *D. c. var. Rotin* underline the influence of exogenous ABA on the realisation-phase depending on the concentrations as well as the time-element.

ABA can also have a positive effect on the somatic embryogenesis. In this thesis with petiole-explantates of *D. halophilus*, *D. c. maximus* and to a limited degree of *D. c. maritimus* verify this. In the two first named species ABA promoted embryonal development, however impeded root-growth and root-development. An additional ABA supply on the 7th day had a favourable influence.

D. c. maritimus differs from both species insofar as the auxin-type used also influences somatic embryogenesis, i.e., in this case, only the stronger auxin-stimulus through 2,4-D makes a differentiation of somatic embryos in larger numbers possible. As in the above named species, ABA had a positive influence on the realisation-phase only, if the medium contained 2,4-D.

The three species clearly showed lower ABA-concentration than the Rotin-type in the petiole. As the realisation of somatic embryogenesis was promoted by adding ABA, the explants apparently absorbed sufficient ABA to reach the endogenous limit-value in order to promote the competent-cells.

The species *D.muricartus*, *D.pusillus* and *D.mondevicensis* reacted differently. The petiole explants of these species differentiated no somatic embryogenesis under the given culture conditions. Even a stronger auxin-stimulus could not induce this developmental process.

Another possibility to be considered is that the exogenous ABA was absorbed but could not produce a correct IAA-/ABA- balance within the explantates. An indication of this is the almost non-existent growth of explants.

In order to follow the distribution of ABA in the petiole-explants during the induction period of the somatic embryogenesis, transgenic plants were produced. These plants integrated the construct SalT-promotor, GUS-reporter gene in their genome. The SalT-promotor reacts among others to salt-stress, dryness or ABA (Claes et al., 1990; Garcia et al., 1998).

Molecular-genetic proof was established by specific amplifications of a determined sequence of the SalT-promotor through Polymerase-Chain-Reaction as well as by hybridization of the DNA isolated from transgenic carote plants through a marked sonde in the Southern-blot.

The action of the SalT-promotor proved highly dependent on the development of the plants. Immediately after a 48-hours -co -culture the cells turned intensively blue after adding X-gluc or the substrate of GUS. This strong coloration may have been partially caused by a transient installation of the foreign genes. It is apparent, that the transcription and translation can take place. The transiently installed gene is probably being broken down by the plants own DNAses after sometime.

The results show that exogenous ABA can increase the SalT-promotor activity, the glucuronidase-reaction however could not be immediately observed. A clear increase of glucuronidase was observed only after the culture was 48-hours old. Supposedly, the syntheses of the enzyme occurs in the meantime.

A change in the behaviour of the promotor sets in once more when the torpedo-shaped stage develop into a plantlet. An activity was observed in certain area of the developing root. The area of the veins of the leaves and the areas of transition between shoot and root. From these observations follows that even within a specific organ the physiological state of each tissue reacts differently to SalT-promotor activity.

Taking into consideration that the blue colour in leaves of a small 8-weeks-old-plant only occurs in the veins of the leaves, these colourations probably reflect an ABA transport.

The results of histological experiments of transgenic petiole-explantates, originating from 8-weeks-old-plants, support to a certain degree the transport-hypothesis.

Endogenous ABA produced blue colouring only in the veins of older leaves (Xylem, possibly Phloem and partially in glandular canals). The blue colouring occurred only for a relatively short period of time. In an ABA-containing medium the blue colour did not develop in the culture after three days.

ABSTRACT

INVESTIGATION ON THE SIGNIFICANCE OF ABSCISIC ACID FOR SOMATIC EMBRYOGENESIS OF SOME DAUCUS SPECIES INCLUSIVE TRANSGENIC STRAINS

TRAN THI LE

The results show that the species and sub-species considered earlier as embryogenic, show higher endogenous ABA-concentrations before culturing (*D.c.var. Rotin*, *D.halophilus*, *D.c.maximus*). The species *D.pusillus*, *D. muricatus* and *D. mondevicensis* (in the B5- and NL2-system) and *D.c.maritimus* (in the NL2-system) which had not differentiated somatic embryos under these conditions showed the lowest ABA-levels.

From these investigations results in respect to ABA the following picture emerges: the complete course of the developmental program-"somatic embryogenesis", - does not seem to be possible, if there are no specific endogenous ABA-concentrations in the petiole before taking explants. For this a specific optimal -incipient value seems to be necessary. Beyond this incipient-value somatic embryogenesis is impeded. Thus the petiole-explants of *D.c.var. Rotin* e.g. differentiated fewer somatic embryos when ABA was added to the medium at an early stage. *D.c.var. Rotin* shows the highest endogenous ABA-concentration already in the initial material. Root-growth and root-formation were also affected by this impeding influence.

This leads to the conclusion that the somatic embryogenesis requires specific endogenous ABA-concentration in the explantates. Below the incipient apparently does not make somatic embryogenesis possible, as earlier experiments in respect to the ability of embryogenesis in different species of *Daucus* and different culture concentration showed.

The effect of ABA on somatic embryogenesis depends on the time.

ABA can also have a positive effect on the somatic embryogenesis. In this thesis with petiole-explantates of *D.halophilus*, *D.c.maximus* and to a limited degree of *D.c.maritimus* verify this. In the two first named species ABA promoted embryonal development, however impeded root-growth and root-development. An additional ABA supply on the 7th day had a favourable influence.

D.c.maritimus differs from both species insofar as the auxin-type used also influences somatic embryogenesis, i.e., in this case, only the stronger auxin-stimulus through 2,4-D makes a differentiation of somatic embryos in larger numbers possible. As in the above named species, ABA had a positive influence on the realisation-phase only, if the medium contained 2,4-D.

The three species clearly showed lower ABA-concentration than the *Rotin*-type in the petiole. As the realisation of somatic embryogenesis was promoted by adding ABA, the explants apparently absorbed sufficient ABA to reach the endogenous limit-value in order to promote the competent-cells.

The species *D.muricartus*, *D.pusillus* and *D.mondevicensis* reacted differently. The petiole explants of these species differentiated no somatic embryogenesis under the given culture conditions. Even a stronger auxin-stimulus could not induce this developmental process.

In order to follow the distribution of ABA in the petiole-explants during the induction period of the somatic embryogenesis, transgenic plants were produced. These plants integrated the construct SalT-promotor, GUS-reporter gene in their genome. The SalT-promotor reacts among others to salt-stress, dryness or ABA (Claes et al., 1990; Garcia et al., 1998).

Molecular-genetic proof was established by specific amplifications of a determined sequence of the SalT-promotor through Polymerase-Chain-Reaction as well as by hybridization of the DNA isolated from transgenic carote plants through a marked sonde in the Southern-blot.

The action of the SalT-promotor proved highly dependent on the development of the plants. Immediately after a 48-hours-co-culture the cells turned intensively blue after adding X-gluc or the substrate of GUS. This strong coloration may have been partially caused by a transient installation of the foreign genes. The results show that exogenous ABA can increase the SalT-promotor activity, the glucuronidase-reaction however could not be immediately observed. A clear increase of glucuronidase was observed only after the culture was 48-hours old. Supposedly, the syntheses of the enzyme occurs in the meantime.

Taking into consideration that the blue colour in leaves of a small 8-weeks-old-plant only occurs in the veins of the leaves, these colourations probably reflect an ABA transport.

The results of histological experiments of transgenic petiole-explantates, originating from 8-weeks-old-plants, support to a certain degree the transport-hypothesis.

Endogenous ABA produced blue colouring only in the veins of older leaves (Xylem, possibly Phloem and partially in glandular canals). The blue colouring occurred only for a relatively short period of time. In an ABA-containing medium the blue colour did not develop in the culture after three days.

TECHNOLOGY FOR JAPANESE ENCEPHALITIS (JE) VACCINE PRODUCTION IN VIETNAM AND QUALITY EVALUATION

H.P. Lien, D.T. Thuy, N.A. Tuan, N.H. Hanh, N.K. Viet, L.X. Mai, N.D. Tien et al.

Company for vaccines and biological products N° 1 (VABIOTECH)

National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)

I. INTRODUCTION

Japanese encephalitis (JE) is a serious public health problem in Vietnam. The morbidity of JE is 6-10/10⁵ population and the mortality is 14-20%. 40-60% of survivors have neurological sequenlae. This is a burden for family and society. The active way for JE prevention is vaccination. Since 1989, we have been applying the technology which have been transferred from Biken Institute - Osaka University - Japan, for JE vaccine production.

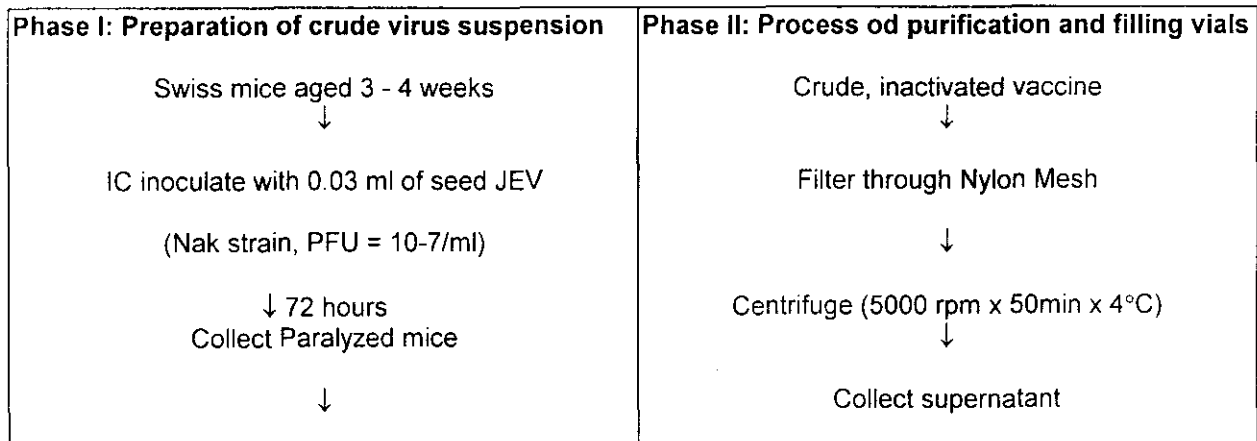
This is the procedure for production of inactivated and purified JE vaccine from mouse brain, using JEV Nakayama strain to inoculate into the mouse brain.

II. MATERIALS AND METHODS:

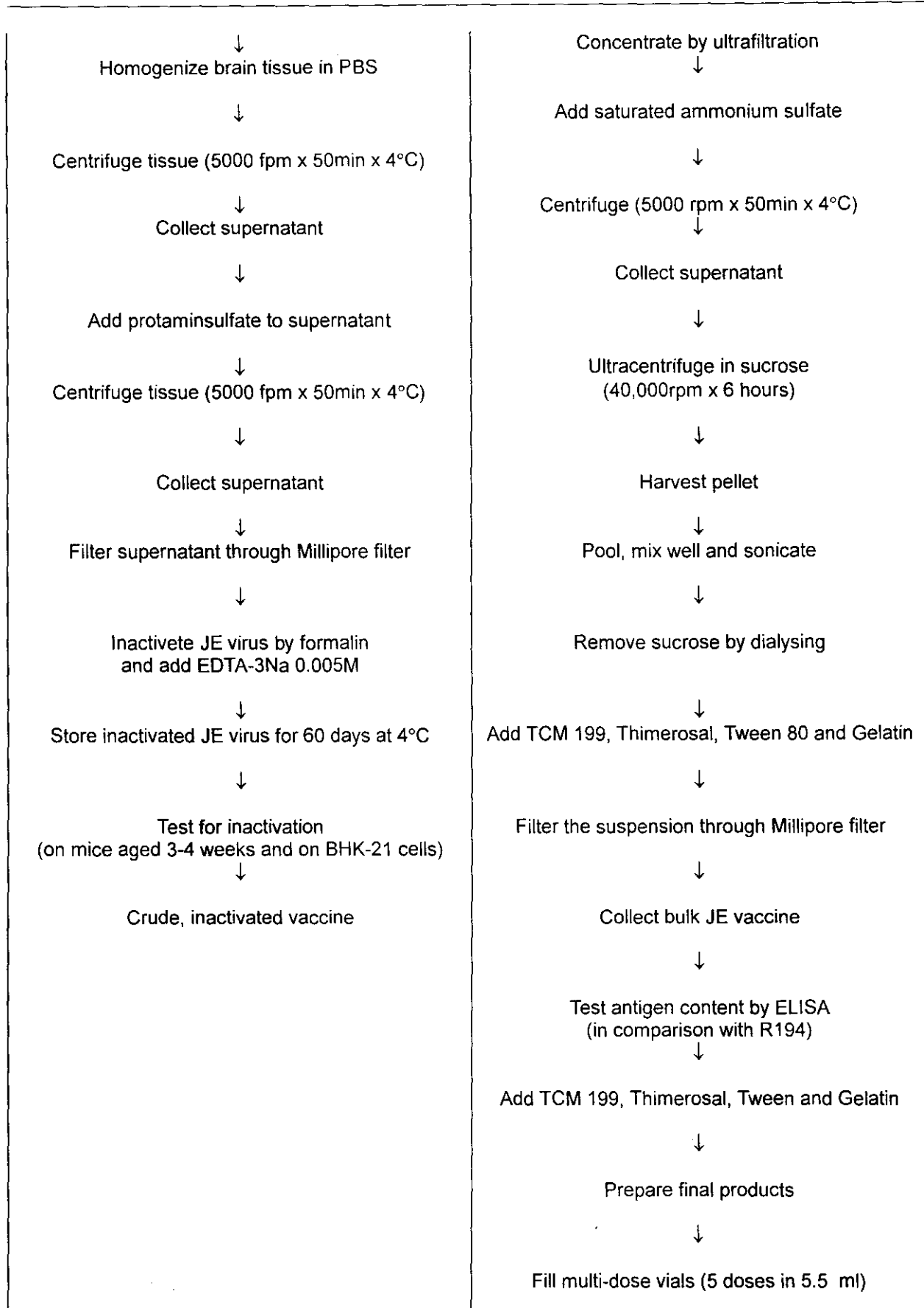
2.1. Main materials and equipment:

- Seed JE virus, Nakayama strain
- Swiss mice: 3-4 weeks of age
- Protamin sulfate
- Ammonium sulfate
- Sucrose
- TCM 199 ww/o red phenol
- Other chemicals
- Rifrigerated centrifuge
- Ultracentrifuge
- Ultrahomogenizer, sonicator sterile filtration system
- Ultrafiltration system, EIA reader, CO2 incubator, inverted microscope
- Clean hood
- Clean room
- Cold room and others

2.2. Methods: The process includes 2 phases



International Workshop on Biology, Hanoi - Vietnam 2-5 July 2001



III. RESULTS

3.1. From 1991 - 2000, NIHE has produced 208 lots of JE vaccine.

The quality control of the first 20 lots was based on 3 levels:

- Manufacturer quality control (NIHE)
- National quality control (CENBICO)
- International quality control (BIKEN)

Basing on 11 Japanese criteria JEV deriving from mouse brain, NIHE has evaluated the quality of the 208 lots of JE vaccine and the results showed that all the 208 lots have met or exceeded the minimum requirements for biological products.

Table 1

Quality of JE vaccine produced at NIHE as compared with international standards for JE vaccine production.

Item	Quality control test	International requirements	Achieved results (208 lots)
1	pH	6.8 - 7.4	6.8 - 7.4
2	TCA-Protein (µg/ml)	≤ 80	15 - 25
3	Thimerosal content (µg/ml)	≤ 120	86 - 105
4	Formaldehyde content (µg/ml)	≤ 100	0.7 - 10
5	Inactivation test (IC 0.03ml/Swiss mouse x 20)	No abnormality is noted after 14 days of follow-up	208/208 lots passed
6	Safety test (on guinea pigs and mouse)	Guinea pig: No abnormality is noted after 7 days of follow-up	No abnormality is noted after 7 days of follow-up, body weight increases 105-111%
		Mouse: No abnormality is noted after 7 days of follow-up	No abnormality is noted after 7 days of follow-up, body weight increases 120-150%
7	Pyrogen test (on rabbits)	≤ 1.3°C/3 rabbits	0 - 0.6°C/3 rabbits
8	Sterility test (thioglycolate and soybean casein medium)	No evidence of microbial growth	208/208 lots passed
		No evidence of fungal growth	
9	Potency (PRNT)	R 181, R 189 (BIKEN) R 194 = Lg2 - Lg2.8	Lg2.11 - Lg3.5
10	Antigen content test (EIA)	R 194	Ag JE vaccine ≥ R 194
11	Electron micrography observation	R: Virion surface is smooth and intact	JE virion surface is smooth Ag surface is intact No abnormality is noted

3.2. Evaluation of antibody response:

- Method: Using the double-blind method
- Subjects: 203 healthy children aged 2-4 years old were divided into 2 group: A and B
- Group A (101 children): Receiving BIKEN vaccine
Group B (102 children): Receiving NIHE vaccine
- Schedule of vaccination and bleeding:
 - The 203 children were received 2 shoots of JE vaccine with the interval of 1 week (0.5 ml and 1ml for children 2 - 3 years old and 4 year old, respectively).
 - The 203 children were bled 2 times
 - The first blood (Pre-caccination sera)
 - The second blood (Post-vaccination sera): 2 weeks after the 2nd vaccination.
- Result:
 - Negative pre-vaccination sera: 100% of vaccinees in both groups showed antibody response. GMT for the BIKEN JE vaccine was 103.71 and the titer for the NIHE JE vaccine was 103.48.
 - Positive pre-vaccination sera with the titer of 101 (14 and 10 children in group A and B, respectively): GMT for the BIKEN JE vaccine increased from 102.15 to 103.97 and the titer for the NIHE JE vaccine increased from 103.09 to 103.36

3.3. Evaluation of JE vaccine effectiveness:

Vaccination and active surveillance for JE have been carried out since 1993 in Gia Luong District, Bac Ninh province, a high-risk area for JE disease. The morbidity stable at 21/100,000 population, especially, in the 1988 JE outbreak, this figure was 99.5/100,000 population.

The vaccination coverage reached to 50% in 1998 and the morbidity sharply reduced to 3.2/100,000 population. Since 1999, no JE case in the region was notified.

3.4. Evaluation of JE vaccine stability

24-month follow up the JE vaccine stored at 4°C showed that the potency of JE vaccine was stable: there was no change in the neutralizing antibody titer between just before the delivery and after 24 months of store.

3.5. Evaluation of JE vaccine site effects:

Site effects of JE vaccine in rare: 5 - 7% of vaccinees has fever (37.2 - 37.7°C), it occurred in sensitive children. Follow-up of persons vaccinated at NIHE from 1995 showed that no site effect was noted.

IV. Conclusions

4.1. Based on results to date, the quality of JE vaccine produced by NIHE is high, purified and safe. All 208 lots of JE vaccine have met or exceeded the Japanese requirements for pH, TCA protein content, formaldehyde content, thimerosal content, antigen content, sterility, inactivation, safety, pyrogenicity and potency.

4.2. 100% children received 2 shots of JE vaccine has seroconversion with GMT of $10^{3.48}$.

4.3. Among 100,000 children followed after JE vaccination, JE vaccine efficacy was 98,6%.

4.4. JE vaccine stability was high (JE vaccine stable after 24 months of store at 4°C)

4.5. Active vaccination has been carried out in Gia Luong district, Bac Ninh province and the morbidity of 21.8 /100,000 population in 1995 has reduced to 3.2/100,000 in 1988. Since 1999, no JE case in the region was notified.

4.6. Since 1997, JE vaccine has been introducing in EPI for 1-5 years old children in high risk areas.

4.7. NIHE JE vaccine has been used in 61 provinces of Vietnam and the vaccine has been well-accepted throughout the country using a multi-dose vial packaging at the cost of approximately US \$ 1.00 per dose.

BIOCONTROL POTENTIAL OF SOME ENTOMOGENOUS FUNGI AGAINST INSECT PESTS OF RICE CROP

NGUYEN THI LOC, HUYNH VAN NGHIEP, NGUYEN THI NHAN,
PHAM QUANG HUNG, VU TIEN KHANG AND NGUYEN VAN LUAT
Cuu Long Delta Rice Research Institute, Omon. Cantho. Vietnam.

Keywords: Entomogenous fungi, insect pests, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

I. INTRODUCTION

Microbial control aims at biological suppression of insect pests, by the use of entomopathogens like viruses, fungi, bacteria, protozoa and nematodes which usually possess the special features required for implementation of IPM system viz., host specificity, high virulence, safety to natural enemies of the target pest and ecologically non-disruptive.

More than 700 species of fungi, mostly Deuteromycetes and Entomophorales from about 90 genera are pathogenic to insects (Charnley, 1989). A complex of fungal pathogens has been identified from pests of rice (Rao, 1975; and Rombach *et al.*, 1986a). Moreover, the fungal diseases were favoured by high humidity, the microclimate available in the rice fields would be most suitable for the disease development and these fungi have a better prospect in the microbial control of insect pests of rice.

On rice crop, previously published studies on the use of *B. bassiana* fungus for controlling of BPH are limited to experiments using small containers in laboratory (Srivastava and Nayak, 1978). Use of *B. bassiana* to control BPH, WBPH and green leaf hopper (GLH) (Aguda *et al.*, 1984). The use of entomogenous fungi to control the BPH, *Nilaparvata lugens* Stal. and the black bug of rice, *Scotinophora coarctata* in the rice fields in Korea and the Philippines (Rombach *et al.*, 1986a; Rombach *et al.* 1986b; Aguda *et al.*, 1987; Aguda *et al.*, 1988). Effects of *B. bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Sorok on brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in Vietnam (Thuy *et al.*, 1994). The exploitation of *B. bassiana* as potential biocontrol agent against the hoppers in rice has been studied in India (Loc, 1995).

Since there is a favourable microclimatic condition for fungal infection in rice ecosystem at Cuu Long delta, there is much scope for exploitation of the entomopathogenic fungi for control of rice pests. The present study has been taken up with the following objectives:

1. To isolate the fungi from naturally infected insects at Cuu long delta
1. Pathogenicity of entomogenous fungi against insect pests of rice crop
3. Compatibility of entomogenous fungi with botanical, pesticides and their combinations for the control of insect pests of rice crop.
4. Mass production of the entomogenous fungi and its use for brown planthopper management.
5. Effect of *Beauveria bassiana* on natural enemies of rice insect pests

II. MATERIALS AND METHODS

1. Materials

Equipments for fungal study in laboratory, tools for testing and rearing brown planthopper in the greenhouse and the necessary things (fertilizers, pesticides, fungi...); Brown planthopper (BPH), leafhopper (LF), rice bug (RB) which were culturing in greenhouse and experimental fields for testing effectiveness of entomogenous fungi on insect pests of rice crop.

2. Methods

2.1. Collection, isolation and purification of the fungus

The insects were found either sticking to the leaf sheath or floating on standing water, being overgrown by a chalky white mass of conidia. The cadavers were collected in sterile glass tube for

isolating the causal organism in the Laboratory. The fungus culture was purified by single conidium culture on PDA medium subsequently subculturing was done.

2.2. The pathogenicity tests

The pathogenicity tests with different isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against third instar nymphs and adults of Brown Plant Hopper (BPH) were done in glass house. The conidial concentration was 10^7 conidia ml^{-1} in the prepared suspension with 0.02 percent Tween 80 (R) surfactant (Rombach *et al.*, 1986b).

2.3. Suitability of different media for mass production of *B.bassiana*

The suitability of different media for mass production of *B.bassiana* was tested to find out a good and cheap medium for *B.bassiana* culturing, followings the standard microbiological methods (Booth, 1971 and Sundrababu, 1980).

2.4. Field efficacy of *B.bassiana* and *M.anisopliae* and their integration with botanical or insecticide

The experiment was laid out in a randomized complete block design with three replications, the plot size was 3x3m. Twelve hills for transplanting rice or wooden frame (60x60cm) for direct seeding rice were enclosed in a nylon cage (60x60x150cm) in the center of each plot (in the suitable conditions for natural development, of BPH we used BPH susceptible variety DS20 and enlarged plot area to 6x5m for testing efficacy of fungi on BPH). The BPH was released into each cage. Count of live BPH was taken 1 day before treatment and at 1,3, 7, 14 and 21 days thereafter. The reduction of hoppers over control was also calculated. Grain yield was recorded.

The isolate used for experiments was Omon isolate. The conidial dose was used 6×10^{12} conidia ha^{-1} . The control plot were sprayed with 0.02 per cent tween 80(R). In the case of combined treatments, the conidial dose of *B.bassiana*/*M.anisopliae* was 4×10^{12} conidia ha^{-1} which was mixed with one forth recommended dose of insecticide or with half recommended dose of botanical. Insecticide or botanical treatments was applied at recommended dose used for controlling the insect pests of rice crop.

2.5. Effect of *Beauveria bassiana* on natural enemies of rice insect pest

1) Effect of *B. bassiana* on predators and parasitoids in glasshouse conditions

- Predatory spider:

Safety tests were conducted with *B. bassiana* by direct conidial application as suggested by Maghlaes *et al.* (1988) at a rate of 10^8 conidia ml^{-1} against the wolf spider, *Lycosa pseudoannulata*. These spiders were obtained from the field collections and treated with fungal conidial suspensions. Each treatment and control were replicated four times with 10 spiders per replication. Sixty BPH nymphs (3rd instar) were released daily as food for spider. The feeding potential was calculated on daily consumption rate of BPH nymphs. The mortality (if any) of spider was also recorded.

- Egg parasitoids of yellow stem borer (YSB):

The adults of YSB collected from the YSB-infested rice fields were kept over 2 nights in rearing cages containing potted TN1 plants (seven weeks old) for egg laying. Potted TN1 plants containing known number of egg masses were sprayed with conidial suspension at the rate of 10^8 conidia ml^{-1} by using an atomiser. Each treatment and control were replicated four times with 20 egg masses per replication. After spraying the egg masses on potted plants were placed in the same field from where adults of YSB were collected for 2 days the egg masses were cut alongwith part of leaf, each egg mass was kept separately in homeopathic vials. The egg masses were observed every day and the observations were recorded on:

2) Number of larvae emerged

3) Number of parasitoids emerged

III. RESULTS AND DISCUSSIONS

1. Infectivity of certain *B.bassiana* isolates against BPH

In the pathogenicity studies, all of the available seven different isolates of *B.bassiana* were found to be pathogenic to the BPH. However, there was a variation in their infectivity against different stages of BPH. The mortality (%) ranged from 70.2 to 86.5 on BPH nymphs, 64.6 to 81.1 on BPH adults (table 1).

Significant differences in mortality caused by different isolates were observed. Omon isolate exhibited the highest infectivity to both stages of the BPH, this means that the local isolate showed more virulence than the exotic one, BPH nymphs were more susceptible than BPH adults.

Table 1. Pathogenicity of seven isolates of *B.bassiana* to BPH, *N. lugens*

(CLRRI Greenhouse, Dry season 2000)

No	Fungal isolate/dose (10^7 conidia ml ⁻¹)	Corrected mortality (%) at 7 days after spraying	
		Nymphs	Adults
1	Omon	86.5 a	81.1 a
2	An giang	83.5 ab	80.2 a
3	Long an	80.2 b	75.2 b
4	Tien giang	79.8 b	74.2 b
5	Dong thap	82.9 ab	77.4 ab
6	Vinh long	83.5 ab	78.7 ab
7	Pantnagar-INDIA	70.2 c	64.6 c

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Ignoffo and Garcia (1985) reported that Two cultures of the same insect species obtained from different sources also responded differently to the same fungal biotype. In nature, living organisms, particularly the microbes, undergo selection, recombination and mutation depending upon the ecological situations which ultimately influence their genetic make up. Sikura and Bevenuto (1972) found variations in toxin production in different strains of *B.bassiana* which could be correlated with their virulence. In the present investigation, the Omon isolate was most infective to BPH which may be due to its' origin as this isolate was obtained from BPH present in Omon locality. This isolate was selected for further study.

2. Suitability of different media for mass production of *B.bassiana*

Selection of suitable media for an entomogenous fungus is essential not only for obtaining maximum growth and sporulation but also for production of infective propagules which ultimately decides the success of a micoinsecticide. Suitability of twelve media including certain grains, tubers and other products of plant origin on growth of *B.bassiana* was determined in present studies.

The results showed that rice bran medium was the most suitable for mass production of *B.bassiana*, because it produced highest dried biomass product among 8 media have been tested (Table 3). The next suitable media were milled rice, rice bran + rice straw and then corn powder. The biomass of this fungus cultured on those media was even significantly higher than potato + dextrose medium.

Table 2. Suitability of different media for mass production of *B.bassiana*

(CLRRI Laboratory, Dry season, 1999)

Treatments	Dried biomass weight (gram) (14 days after incubation)
Rice bran	2.38 a
Milled rice	1.25 b
Rice bran + Rice straw	1.19 b
Corn powder	1.04 b
Potato + Dextrose	0.49 c
Sweet potato	0.43 c
Rice straw	0.16 d
Corn cob	0.14 d

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Nutritional concentration and quality that favour sporogenesis had been reported to be usually different from those controlling mycelial growth and the requirements, sometimes, being highly specific (latge and Sanglier, 1985). Specific requirements for certain carbohydrates, aminoacids, and peptones had been reported to be different for growth and sporulation of *B.bassiana*. Loc (1995) have reported that

rice bran was found to be the most suitable for both growth and sporulation of *B.bassiana*. Rice bran is having a quite good nutritional composition such as aminoacids, fat, vitamins, nitrogen-free extract, crude fibre etc. (Houston, 1972). Fogal *et al*, (1986) used wheat bran as medium for *B.bassiana* and *M.anisopliae*.

3. Compatibility of *B.bassiana*/*M.anisopliae* with insecticide/botanical in greenhouse

From previous laboratory studies some insecticides and rotenone were found to be compatible with these fungi at certain concentrations, hence, their compatibility was evaluated under greenhouse conditons. The results showed that the insecticide gave quick mortality in BPH i.e., 87.5 per cent mortality was recorded 1 day after treatment (DAT). Where as significantly lower mortality was recorded in *B.bassiana* and *M.anisopliae* combined with insecticide/rotenone. The fungus alone gave very low mortality (6.2 to 9.5%) 3 DAT. However, significantly higher mortality was recorded in *M. anisopliae* alone as compared to *M. anisopliae* combined with insecticide/rotenone and in *B.bassiana* alone as compared to *B.bassiana* combined with rotenone at 7 DAT. The significant differences in BPH mortality between *B.bassiana* alone and *B.bassiana* + insecticide treatments were not observed at 7 DAT. The mortality of BPH in insecticide was highest.

Table 3. Compatibility of *B.bassiana*/*M.anisopliae* with insecticide/roatanone against BPH (CLRRI Greenhouse, Dry season 1999)

Treatments	Corrected mortality (%)		
	Days after treatment (DAT)		
	1	3	7
1. <i>Beauveria bassiana</i>	0.00 d	9.50 e	76.21 b
2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	0.00 d	6.20 e	73.58 bc
3. <i>B.bassiana</i> + Trebon	33.75 b	41.25 c	77.60 b
4. <i>B.bassiana</i> + Rotenone	25.00 c	32.5 d	69.55 cd
5. <i>M.anisopliae</i> + Trebon	35.00 b	42.5 c	68.37 d
6. <i>M.anisopliae</i> + Rotenone	26.00 c	33.5 d	68.31 d
7. Trebon	87.50 a	95 a	96.29 a
8. Rotenone	36.25 b	62.25 b	69.69 cd
9. Control (Untreated)	0.00 d	0.00 e	0.00 e

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

The pathogenicity of *B.bassiana*/*M.anisopliae* and the compatibility of these fungi with insecticide in controlling of rice leaffolder (*Cnaphalocrocis medinalis*) and rice bug (*Leptocorisa oratorius*) in glasshouse have been studied. The results indicated that the infected percentage of leaffolder and rice bug was approximately was 50% and 40% respectively at 7 DAT. However, in the case of combined treatments, the conidial dose of *B.bassiana*/*M.anisopliae* was 4×10^{12} conidia ha⁻¹ which was mixed with one forth recommended dose of Decis/Padan have given significantly higher mortality of leaffolder . Similar results have been obtained with rice bug. From these results it is clearly indicated that the efficacy of combined insecticide + *B.bassiana*/*M.anisopliae* Treatments were significantly higher than *B.bassiana*/*M.anisopliae* alone..

Vilas-Boas and Alves (1988) reported that when *B.bassiana* associated with monocrotophos, the pathogen-insecticide mixture caused significantly higher mortality in *Castia licus* as compared to *B.bassiana* alone. The additive effects of *B.bassiana* with a compatible insecticide were reported by Anderson *et al*. (1989). The combination of low dose of some compatible insecticides and rotenone with *B.bassiana*/*M.anisopliae* for controlling the insect pests of rice crop should be further studied under field conditions.

4. Efficacy of *B.bassiana*/*M.anisopliae*/Rotenone and it's combinations with insecticide against insect pests of rice crop in the field.

On the basis of the successful control of BPH, LF and RB in laboratory and greenhouse, the Efficacy of *B.bassiana* and *M.anisopliae* and their combinations with insecticide/roatanone against insect pests of rice crop were tested in the field at CLRRI, Omon, can tho, Vietnam during six consecutively seasons from 1998 dry season - 2001. Some representative results are given as below:

International Workshop on Biology. Hanoi – Vietnam 2-5 July 2001

Dry season, 1998 the efficacy of *B.bassiana*/*M.anisopliae* and its combinations with Bassa against BPH was observed 7 DAT and it showed long persistence, even upto 21 DAT. At the dose of 6×10^{12} conidia ha⁻¹ both *B.bassiana* and *M.anisopliae* gave effective control of BPH 14 DAT and recorded 76.6 and 79.6 per cent reduction of BPH. The controlling effect of these two fungi prolonged upto 21 DAT i.e. 78.4 to 80.2 per cent reduction of BPH was recorded on 21 DAT. The combinations of both fungi *B.bassiana* and *M.anisopliae* with Bassa performed well in controlling BPH and the efficacy of these two treatments was not significantly different with single fungal treatments and it was significantly higher compared to that of single Bassa/Rotenone treatments. The yield of all the treated treatments was significantly higher compared to untreated control. The treatment of *B.bassiana* alone even gave significantly higher grain yield compared to Bassa/ Rotanone alone (table 4).

Table 4. Efficacy of *B.bassiana*/*M.anisopliae*/Rotenone and its combinations with Bassa against BPH (CLRRI, Dry season, 1998)

Treatments	Corrected mortality (%)					Grain Yield	
	Days after treatment (DAT)					T/ha	(%)
	1 DAS	3 DAS	7 DAS	14 DAS	21 DAS		
<i>B. bassiana</i>	3.3 e	16.9 d	58.3 d	76.6 a	78.4 a	4.36 a	139
<i>M. anisopliae</i>	7.5 e	16.0 d	62.4 cd	79.6 a	80.2 a	4.21 ab	135
<i>B. bassiana</i> + Bassa	15.3 d	43.4 c	61.0 cd	73.9 a	79.6 a	4.22 ab	135
<i>M. anisopliae</i> + Bassa	20.6 c	43.7 c	69.5 b	74.6 a	79.6 a	4.17 ab	133
Bassa	74.4 a	78.7 a	76.7 a	53.7 c	39.0 b	3.88 b	124
Rotenone	33.9 b	53.0 b	66.6 bc	54.4 c	34.1 b	3.95 b	126
Rotenone + Bassa	35.5 b	56.8 b	68.1 b	63.4 b	39.2 b	4.08 ab	130
Control (Untreated)	–	–	–	–	–	3.13 c	100

*: data were transformed into arcsine for analysis

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Wet season, 1998 the efficacy of *B.bassiana*/*M.anisopliae*/Rotenone and its combinations with Bassa against BPH was observed 3 DAT and it showed long persistence, even upto 21 DAT. At the dose of 6×10^{12} conidia ha⁻¹ both *B.bassiana* and *M.anisopliae* gave effective control of BPH at 14 DAT and recorded 72.7 and 77.2 per cent reduction of BPH. The efficacies of these two single fungal treatments were not significantly different with those of their combinations with Bassa and they were significantly higher as compared to those of single Bassa/Rotanone treatments at 14 DAT. The yields of all the treated treatments were significantly higher compared to untreated control. All of the fungal or Rotanone treatments gave significantly higher grain yield as compared to insecticide (bassa) treatment (table 5)

Table 5. Efficacy of *B.bassiana*/*M.anisopliae*/Rotenone and its combinations with Bassa against BPH (CLRRI, Wet season, 1998)

Treatments	Corrected mortality (%)*					Grain Yield	
	Days after treatment (DAT)					(T/ha)	(%)
	1 DAS	3 DAS	7 DAS	14 DAS	21 DAS		
<i>B. bassiana</i>	14.2 c	22.8 cd	70.4 b	72.7 a	62.4 a	3.12 ab	201
<i>M. anisopliae</i>	9.3 c	41.7 bc	71.7 ab	77.2 a	63.3 a	3.15 ab	203
<i>B. bassiana</i> + Bassa	15.4 c	41.8 bc	73.4 ab	74.9 a	58.3 a	3.22 a	207
<i>M. anisopliae</i> + Bassa	37.6 b	63.2 ab	79.3 a	80.1 a	55.1 a	3.10 ab	200
Bassa	80.4 a	74.1 a	60.4 c	46.2 b	28.0 b	2.67 c	172
Rotenone	41.2 b	68.3 a	67.7 bc	54.4 b	27.3 b	2.80 bc	180
Control (Untreated)	–	–	–	–	–	1.55 d	100

*: data were transformed into arcsine for analysis

International Workshop on Biology. Hanoi – Vietnam 2-5 July 2001

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 6. Efficacy of *B. bassiana* and its combinations with Trebon/Rotenone against BPH (CLRRI, Dry season, 1999)

Treatments	Corrected mortality (%)*				Grain yield	
	Days after treatment (DAT)				T/ha	(%)
	1 NSP	3 NSP	7 NSP	14 NSP		
<i>B. bassiana</i>	8.7 c	10.5 b	72.4 b	69.1 ab	3.97a	129
<i>B. bassiana</i> + Trebon	35.3 b	40.7 b	83.0 a	74.7 a	3.70a	120
<i>B. bassiana</i> + Rotenone	31.2 b	39.2 c	79.9 ab	71.5 a	3.75a	122
Trebon	70.8 a	84.6 a	79.7 ab	58.4 b	4.04a	131
Rotenone	62.6 a	74.2 a	83.8 a	59.1 b	3.78a	123
Conr.rol (Untreated)	-	-	-	-	3.08b	100

*: data were transformed into arcsine for analysis

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Dry season, 1999 the efficacy of *B. bassiana* and its combinations with Bassa/Rotenone against BPH was observed 7 DAT and it showed long persistence, even upto 21 DAT. At the dose of 6×10^{12} conidia ha⁻¹ *B. bassiana* gave effective control of BPH at 7 DAT and recorded 72.4 per cent reduction of BPH. The efficacy of *B. bassiana* was not significantly different as compared to its combinations with Trebon/Rotanone at 14 DAT, but it was significantly higher as compared to Trebon/Rotanone alone at 14 DAT. The grain yields of all the treated treatments were significantly higher as compared to untreated control. Similar results have obtained with *M. anisopliae*.

The results six consecutively season from 1998 to 2001 showed that both *B. bassiana* and *M. anisopliae* were effective in controlling BPH, the efficacy could be seen from 7DAT and it showed long persistence, even upto 21 DAT. The combinations of *B. bassiana*/*M. anisopliae* with compatible and effective insecticide/botanical such as Bassa, Trebon, Rotanone performed well in controlling BPH.

Under favourable conditions for growth and development of BPH, fungal applied treatments could give significantly higher grain yields as compared to insecticidal applied treatments.

5. Effect of *B. bassiana* and *M. anisopliae* on natural enemies of rice insect pests

Effect of inoculation of *B. bassiana* / *M. anisopliae* on natural enemies of some rice insect pests

The present investigation showed that in all the safety tests with *B. bassiana* / *M. anisopliae*, no mycosis was noticed in the natural enemies. Direct conidial application at the dose of 10^8 conidia ml⁻¹ had no adverse effects on the predatory potential of wolf spider (table 7). In all of treatments the predatory abilities of wolf spiders had no significant difference until 10 days after inoculation of fungi on spiders.

Table 7. Effect of *B. bassiana* / *M. anisopliae* on Predatory wolf spider, *L. pseudoannulata*

Days after inoculation	Number of BPH consumed		
	<i>B. bassiana</i> ¹	<i>M. anisopliae</i> ¹	Control
1	7.5 ± 1.3	6.8 ± 0.8	7.6 ± 1.0
2	7.6 ± 0.8	7.9 ± 0.7	8.0 ± 0.7
3	8.2 ± 0.8	8.1 ± 0.7	8.1 ± 1.1
4	7.8 ± 1.0	7.9 ± 0.7	7.4 ± 1.0
5	6.4 ± 1.2	7.1 ± 1.2	6.5 ± 1.6
6	7.2 ± 1.1	6.5 ± 1.4	7.0 ± 1.1
7	6.8 ± 1.3	7.1 ± 1.5	7.4 ± 1.4
8	7.2 ± 1.6	6.7 ± 1.6	6.3 ± 1.6
9	6.9 ± 1.4	6.8 ± 1.6	6.5 ± 1.0
10	7.2 ± 1.2	6.7 ± 1.5	6.9 ± 1.4

Effect	F (P=0.05)
Treatments	NS
Days after treatment	NS
Interaction	NS

¹ Concentration of *B. bassiana* / *M. anisopliae* was 10^8 conidia ml⁻¹; NS = Not significant

Conidial application of *B. bassiana* at the dose of 10^8 conidia ml⁻¹ had no adverse effects on egg parasitoids of yellow stem borer (YSB). The per cent egg masses parasitized and per cent eggs parasitized were not affected by *B. bassiana* (table 8)

Table 8. Effect of *B. bassiana* on egg parasitoids of yellow stem borer, *S. incertulas*

Treatment ¹	Egg masses parasitized (%)	Eggs parasitized (%)
<i>B. bassiana</i> (PNR)	37.50	18.12
<i>B. bassiana</i> (LKW)	38.75	20.53
<i>B. bassiana</i> (HYD)	35.00	18.07
<i>B. bassiana</i> (CBE)	36.25	19.77
Control	36.25	19.27
	NS	NS

¹ Concentration of *B. bassiana* / *M. anisopliae* was 10^8 conidia ml⁻¹.

NS = Not significant

Ramamohan Rao (1989) also reported that conidial application of *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *M. flavoviride* and *P. lilacinus* at a dose of 10^8 conidia ml⁻¹ had no adverse effects on the predatory coccinellids, spider, mirid bug and on parasitoids like *Trichogramma japonicum* ashmead, *Platygaster oryzae* cameron and *Tetrastichus schoenobii* Ferriere.

B. bassiana and *M. anisopliae* have good potential as microbial control agents for insect pests of rice crop and the results from this study suggest that they can become effective components in developing IPM programme for rice ecosystem in Cuu long delta.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support from Royal Danish Embassy. We thank Mr. Bjarne Christensen (Chief agricultural advisor, DANIDA project 104. Vietnam. 22) for his advice and helpful discussions. The support and assistance of Mrs Lien, Mr Dinh and other members of Royal Danish Embassy and colleagues at CLRRRI, is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Aguda, R.M. ; Litsinger, J.A. and Roberts, D.W. 1984. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* on brown planthopper (BPH), whitebacked planthopper (WBPH), and green leafhopper (GLH). *Int. Rice Res. Newsl.*, 9 (6): 20.
- Aguda, R. M. ; Rombach, M.C. ; Im, D.J. and Shepard, B.M. 1987. Suppression of populations of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal.) (Hom.: Delphacidae) in field cages by entomogenous fungi (Deuteromycotina) on rice in Korea. *J. Appl. Ent.*, 104:167- 172.
- Aguda, R.M. ; Rombach, M.C. and Shepard, B.M. 1988. Infection of brown planthopper (BPH) with insect fungi in the laboratory. *Int. Rice Res. Newsl.*, 13 (5): 34.
- Anderson, T.E.; Hajek, A.E., Roberts, D.W., Preisler, H.K., and Robertson, J.L., 1989. Colorado potato beetle (Coleoptera : Chrysomelidae): effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 82 : 83-89.
- Booth, C. 1971. *Methods in Microbiology*, Volume IV. Academic Press, London, New York. 795 p.
- Charnley, A.K., 1989. Mycoinsecticides: present use and future prospects. *In: Progress and Prospects in Insect control*. BCPC Monograph no.43: pp 165-181.
- Ignoffo, C.M. and Garcia, C. 1985 Host spectrum and relative virulence of an Ecuadorian and a Mississippian biotypes of *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.*, 45: 346-352.
- Loc, N.T. 1995. Exploitation of *Beauveria bassiana* as a potential biological agent against leaf- and planthoppers in rice. Thesis, Ph.D. G.B. Pant University of Agriculture & Technology, Pantnagar.

Pathak, P.K. and Heinrichs, E.A. 1980. A rapid technique for estimating brown Planthopper feeding activity. *Int. Rice Res. Newsl.*, 5(3): 18-19.

Ramamohan Rao, P. 1989. Study on culture techniques, safety and control potential of certain entomopathogenic fungi of rice pests. Thesis, Ph.D., Tamilnadu Agric. Univ., Coimbatore, 212p.

Rao, P.S., 1975. Wide spread occurrence of *Beauveria bassiana* on rice pest. *Curr. Sci.*, 44: 441-442.

Rombach, M.C.; Aguda, R.M. and Roberts, D.W. 1986a. Biological control of the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) with dry mycelium applications of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotyna: Hyphomycetes). *Phillipp. Entomol.*, 6: 613-619.

Rombach, M.C.; Aguda, R.M.; Shepard, B.N. and Roberts, D.W. 1986b. Infection of rice brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) by field application of entomopathogenic hyphomycetes (Deuteromycotyna). *Environ. Entomol.*, 15: 1070-1073.

Sundrababu, P.C. 1980. Studies on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *major* Tolloch in *Oryctes rhinoceros* (L.). Thesis, Ph.D. Tamil Nadu Agric. Univ., Coimbatore, 151 p.

Vyas-boas, A.M. and Alves, S.B. 1988. Pathogenicity of *Beauveria spp.* And it's effect associated with monocrotophos on *Castnia licus* (Drury, 1970) (Lepidoptera: castniidae) *Anais-da-sociedade-Entomologia Do Brazil*, 17 (2) : 305-332.

SUMMARY

BIOCONTROL POTENTIAL OF SOME ENTOMOGENOUS FUNGI AGAINST INSECT PESTS OF RICE CROP

NGUYEN THI LOC, HUYNH VAN NGHIEP, NGUYEN THI NHAN,
PHAM QUANG HUNG, VU TIEN KHANG AND NGUYEN VAN LUAT
Cuu Long Delta Rice Research Institute, Omon, Cantho, Vietnam.

Studies were conducted on *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to exploit their potential for controlling insect pests of rice crop. All of seven isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* which have been collected and purified from different sites were pathogenic to brown planthopper (BPH) *Nilaparvata lugens*, leaf folder (LF), *Cnaphalocrocis medinalis* and rice bug (RB), *Leptocorisa oratorius*. Omon isolate was most virulent. BPH was more susceptible to *B. bassiana* than other rice pests. Nymphs of BPH were more susceptible to *B. bassiana* as compared to adults. Rice bran medium was the most suitable for mass production of *B. bassiana*. Bassa, Trebon and Rotenone were compatible with *B. bassiana* at certain doses. Both *B. bassiana* and *M. anisopliae* were effective in controlling BPH, the efficacy could be seen from 7DAT and it showed long persistence, even upto 21 DAT. The combinations of *B. bassiana*/*M. anisopliae* with compatible and effective insecticide/botanical such as Bassa, Trebon, Rotenone performed well in controlling BPH. Under favourable conditions for growth and development of BPH, fungal applied treatments could give significantly higher grain yields as compared to insecticidal applied treatments. *B. bassiana* and *M. anisopliae* were safe to *lycosa pseudoanulata*, predator of rice hoppers. *B. bassiana* was safe to *Telenomus sp.* and *Tetrastichus sp.*, egg parasitoids of yellow stem borer in green-house tests.

USING "CLEAN" DNA TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF TRANSGENIC RICE PLANTS EXPRESSING AGRONOMICALLY IMPORTANT TRAITS.

NGUYEN THI LOC^{1,4*}, ANGHARAD M.R. GATEHOUSE², PAUL CHRISTOU³ & JOHN A. GATEHOUSE¹

¹*Crop Protection Group, Department of Biological Sciences, University of Durham, Durham DH1 3LE, United Kingdom*

²*Crop Protection Group, Department of Agricultural and Environmental Science, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, NE1 7RU, United Kingdom*

³*Molecular Biotechnology Unit, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, United Kingdom.*

⁴*Cuu Long Delta Rice Research Institute, Omon, Cantho, Vietnam.*

Keywords: *biolistic transformation, "clean" DNA, Oryza sativa, crop pests.*

I. INTRODUCTION

Enhanced levels of resistance to insect pests is an economically important agronomic trait which is being engineered into crops via recombinant DNA technology (Gatehouse and Gatehouse, 1999). The crystal protein genes (*cry* genes) from *Bacillus thuringiensis* (Bt) encode insecticidal δ -endotoxins and are primary candidates for exploitation in the development of crops resistant to insect pests. Such genetically modified crops have been commercially available since 1995 following the introduction of Bt-potato (expressing *cry 3A*), and thereafter by the commercialisation of Bt-cotton (*cry 1Ac*) and Bt-maize (*cry 1Ab*, *cry 1Ac*, *cry 9C*); these crops exhibit enhanced levels of resistance to coleopteran (*cry 3A*) and lepidopteran pests respectively (reviewed in Carozzi and Koziel, 1997). Rice resistant to lepidopteran insect pests has also been produced by transformation with Bt *cry* genes (Bennett *et al.*, 1997)

In order to develop crops with enhanced levels of resistance to sap-sucking insects (Homoptera), other strategies are being actively pursued. The mannose specific lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*), GNA, is toxic towards a number of insect pests of different orders, including Homoptera. GNA inhibits development and reduces fecundity in aphids when fed in artificial diet (Down *et al.*, 1996), and when expressed in transgenic potato plants (Gatehouse *et al.*, 1997). Expression of GNA in transgenic rice (Sudhakar *et al.*, 1998b) was shown to confer significantly enhanced levels of resistance to BPH (Rao *et al.*, 1998), and, more recently, to GLH (Foissac *et al.*, 2000).

Two major techniques for rice transformation have been developed and are in routine use; direct DNA transfer (Christou *et al.*, 1991), and *Agrobacterium*-mediated transformation (Hiei *et al.*, 1994). Both methods generally lead to the integration of extraneous sequences ("vector backbone") into the host genome along with the desired transgene(s) (Kononov *et al.*, 1997). However, integration of backbone sequences may exert undesirable effects in *cis* (Arteit *et al.*, 1991) as well as having a tendency to promote transgene rearrangements. Recently Fu *et al.* (2000) cotransformed rice by particle bombardment using linear transgene constructs lacking vector backbone sequences resulting in plants with simple integration patterns, low transgene copy number, and efficient expression.

The present paper extends these results to genes of agronomic interest and describes the production of transgenic rice plants expressing GNA and Bt toxins using linear transgene constructs lacking vector backbone sequences ("clean" DNA).

II. MATERIALS AND METHODS

2.1 Gene constructs

Minimal transgene expression cassettes isolated from four plasmids (pUbi-gna, pIA2, pIAI(mod) and 35S-hpt-35S-GusA) were used in the cotransformation experiments.

The constructs are shown in diagrammatic form in fig. 1. Minimal transgene expression cassettes were isolated from the above plasmids by digestion with the restriction enzymes Kpn I and Sac I (*ubi-gna* construct), Hind III (*cry1Ac* construct), Not I and Swa I (modified *cry1Ac* construct), or BamH I (*hpt* gene).

2.2. Plant material, cotransformation and regeneration

Scutellum-derived embryogenic callus from mature seeds of two elite rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, Eyi 105 and Bengal, was used as target tissue for transformation as previously described (Sudhakar *et al.*, 1998a). Two cotransformation experiments were carried out for minimal transgene expression cassettes, and for whole plasmid transformations. A molar ratio of 1:3:3 *hpt* (selectable marker): *gna* (nonselected): *cry1Ac* (nonselected) cassettes, or whole plasmids, was used. The preparation of DNA, cotransformation by particle bombardment, selection and regeneration of transgenic rice plants was carried out as described previously (Sudhakar *et al.*, 1998a). The resulting lines of clonal plants were designated E- if derived from cultivar Eyi 105, and B- if derived from cultivar Bengal.

2.3. Polymerase chain reaction (PCR) analysis

Genomic DNA was extracted from young leaf tissue of hygromycin-resistant putatively transgenic rice plants according to the method described by Edwards *et al.* (1991). PCR analysis was carried out using primers specific for the unselected genes *gna* and *cry1Ac*. Reaction conditions were as follows: for *gna*, DNA was denatured at 94°C for 3 min followed by 30 amplification cycles (94°C, 50 s; 62°C, 50 s; 72°C, 50 s) and a final extension step at 72°C for 7 min.; for *cry1Ac*, DNA was denatured at 94°C for 5min followed by 35 amplification cycles (94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 2 min) followed by 7 min final extension at 72°C

2.4. Nucleic acid isolation and Southern blot analysis

Total genomic DNA was isolated from 1g samples of fresh leaf material using the Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction Kit (Amersham Life Science) according to the manufacturer's instructions. Procedures for enzyme digestion, electrophoresis and Southern blot analyses was carried out as described previously (Magbool, S.B and Christou, P, 1999) with some modifications.

2.5. Western blot analysis

Samples of young leaf tissue were homogenised in extraction buffer (50mM Tris-HCl, pH9.5 + 1% PMSF), and extracted for 5 hours at 4°C, followed by centrifugation at 12,000g for 10 min at 4°C. Protein concentration in the supernatants was estimated using Bradford Reagent (Bio-Rad). Procedures for Western blot analyses was carried out as described previously (Foissac *et al.*, 2000).

2.6. Insect bioassays

Rice Brown Planthopper:

Rice brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens*) cultures were held under MAFF licence PHL 51A/3438. The BPH bioassay was carried out as described previously (Foissac *et al.*, 2000). Data analysis was carried out using the Statview software package (Version 5.0; SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, U.S.A.) and statistical differences between treatments were assessed pairwise using the unpaired t-test and its nonparametric equivalent, the Mann-Whitney U-test.

Rice Stem Borer:

Egg masses of striped stem borer (*Chilo suppressalis*) were obtained from International Rice Research Institute, The Philippines. The egg masses were maintained under controlled environmental conditions (70-80% relative humidity, 25 ± 2°C, 16-h photoperiod).

Bioassays were carried out as described previously (Ghareyazie *et al.*, 1997) with some modifications. Statistical analysis of insect data was performed with Statview software as above. Analysis of variance (ANOVA) was used to test for significant differences between treatments. A rejection limit of P>0.05 was used.

III. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Recovery of transgenic plants and PCR analysis

After particle bombardment, transformed calli were subcultured and regenerated under hygromycin selection, using the *hpt* gene as selectable marker. The proportion of calli which were recovered after selection varied from 14 - 22%, and the efficiency of recovery was similar in the two transformation techniques.

PCR analyses were carried out on selected R₀ transgenic plants to confirm the presence of genes encoding GNA and *cry1Ac*. We selected a representative population of seven independent transgenic plants each generated from either "clean DNA" or "whole plasmid" transformations for more in depth analysis. In the minimal gene cassette transformation experiments, analysis of plants from 7 independent transformation events showed that 5 events gave rise to plants containing all 3 genes (*gna*, *cry1Ac* and *hpt*), while 2 further events gave rise to plants that lacked one or other of the unselected genes (*cry1Ac* or *gna*). Parallel cotransformation experiments carried out using supercoiled whole plasmid DNA showed a similar proportion of events giving rise to plants containing all three genes (4 out of a total of 7 events analysed). As with the minimal gene cassettes, two further transformation events gave rise to plants lacking either one or the other of the unselected genes (*cry1Ac* or *gna*). One transformation event gave rise to plants containing the selected marker (*hpt*) only.

3.2. Transgene integration

Representative results of the Southern blot analysis of transgenic plants are presented in figure 2. Plants derived from "clean DNA" transformation experiments exhibited a general trend in terms of simpler integration patterns for the transgenes compared to those generated in experiments involving plasmids. However, this was not an absolute behaviour as some plants transformed with fragments has complex integration patterns and some plants transformed with plasmids did exhibit simpler patterns. This is consistent with previous results with marker genes reported by Fu et al. (2000).

One of the major advantages of particle bombardment as a method for transformation is the ability to transform plants simultaneously with several different constructs. In the present study two different insect-resistance genes (*cry1Ac*, *gna*) plus a marker gene (*hpt*) were cotransformed into rice using either minimal cassettes or whole plasmid DNA. The results showed that cointegration was not affected by the use of minimal gene cassettes.

3.3. Analysis of transgene expression

Western blot analysis of proteins extracted from leaves of plants which had been cotransformed either with minimal cassettes or whole plasmids was used to investigate the accumulation of transgene products. Typical blots are shown in fig. 3. GNA in transgenic plants was visualised by probing with anti-GNA antibodies as a polypeptide of approximately 12 kDa, of similar size to GNA produced in snowdrop, suggesting that post-translational processing of this protein occurs similarly in rice as in snowdrop, and that the nature of the transformation method does not affect its processing. The constructs containing *cry1Ac* gave rise to multiple polypeptides when extracts from plants were probed with anti-*cry1Ab* antibodies. A doublet band at approx. 65 kDa band was similar in size to the major polypeptide present in activated "native" *cry1Ac* toxin (fig. 3a).

Interestingly, whereas expression of the target transgenes, in terms of accumulation of the protein product, was observed in all the lines produced by transformation with minimal gene cassettes, 1/5 lines produced by transformation with whole plasmids did not express *cry1Ac*, and 2/5 lines did not express *gna*. Lines B-2-1, containing *cry1Ac*, *gna* and *hpt* genes, and B-2-5, containing only *gna* and *hpt* genes, did not accumulate detectable levels of GNA protein, and line B-2-8, containing *cry1Ac* and *hpt* genes, did not accumulate *cry1Ac* protein (fig 3). Furthermore, all plants produced by transformation with minimal gene cassettes gave higher expression levels of the target transgenes when compared to plants transformed with whole plasmid DNA (fig. 3). The increase in expression level was estimated as up to approx. 2-fold in plants accumulating Bt toxins (fig. 3a), and up to approx. 4-fold in plants accumulating GNA (fig. 3b).

Cotransformation of rice with minimal cassettes resulted in a high frequency of plants expressing the target gene(s). Fu *et al.* (2000) found that approximately 20-30% of rice transformants produced by bombardment with whole plasmid DNA showed low levels of transgene expression, or complete transgene silencing, which was absent from plants transformed with fragments in our study.

3.4. Insect bioassays

Assays with Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*)

The transgenic rice lines expressing *gna* which had been produced by transformation with whole plasmids were significantly resistant to this homopteran pest. By day 4 insect survival on lines B-2-10 and B-3-2 was significantly reduced ($p < 0.05$) compared to that on non-transformed control plants. This trend was maintained throughout, with reduced survival being highly significant by the end of the trial

($p < 0.0001$). At this stage *N. lugens* survival had been reduced by 43% and 38% respectively for lines B-2-10 and B-3-2 relative to performance on control plants (Fig 4a). However, there was no significant difference between insect survival on line B-2-2 (expressing cry1Ac only) and on the control plants, at any stage during the trial period.

Similar results were obtained with plants transformed with minimal gene cassettes. By day 4 survival of *N. lugens* on 2 GNA-expressing lines, E-4-7 and E-6-5, was significantly reduced ($p < 0.05$) compared to that on non-transformed control plants; by day 7, survival on the other GNA-expressing line, E-4-10, was also significantly reduced ($p < 0.05$) compared to that on non-transformed control plants. This trend was maintained throughout the remainder of the trial, and by the end of the trial the difference in survival between all the GNA-expressing lines and the control was highly significant ($p < 0.0001$). At this stage, insect survival had been reduced by 52%, 48% and 41% for lines E-4-7, E-6-5 and E-4-10 respectively, relative to the control parental line (Fig 4b).

These results are in broad agreement with those previously published for other transgenic rice varieties expressing *gna*, where constitutive expression was shown to reduce BPH survival by 41% (Rao *et al.*, 1998) and 32% (Tinjauangjun *et al.*, 2000).

Comparison of results obtained in the present study show that the reduction in brown planthopper survival was slightly greater (approx. 10%) on plants cotransformed with minimal cassettes, compared to the corresponding plants cotransformed with whole plasmid DNA (Fig 4a, b). The improved performance of plants containing minimal cassettes may be a consequence of the significantly higher levels of GNA expression obtained for these lines (Fig 3).

Assays with Striped Stem Borer (*Chilo suppressalis*)

All plants expressing Bt toxins showed a high level of resistance to this lepidopteran pest. Survival of stem borer larvae on plants containing cry1Ac protein but not GNA was reduced to 29% (line E-4-3) and 28% (line B-2-2), for plants transformed with the minimal cassette and whole plasmid, respectively (Fig 5a); both reductions were highly significant ($p < 0.0001$) when compared to survival on the parental cultivar controls. Plants containing both GNA and cry1Ac performed comparably to plants containing cry1Ac only in this assay, with insect survival being reduced to 17% and 42% (lines E-4-7 and E-6-5 respectively) and 25% and 49% (lines B-2-10 and B-3-2 respectively) for plants transformed with the minimal cassette and whole plasmid, respectively. Data for these lines is combined pairwise in fig. 5a. In all cases, the reduction in survival on plants expressing the two insecticidal proteins was highly significant ($p < 0.0001$) compared to performance on the respective control plants. Survival of stem borer larvae on plants containing GNA but no Bt toxin (line E-4-10) was slightly less than the parental control (86% vs. 91%), but this slight reduction was not statistically significant.

Effects of transgene expression on the growth and development of rice stemborer larvae were also monitored. Development of surviving larvae was significantly reduced on all plants expressing cry1Ac, with no larvae developing beyond the 1st instar, compared to almost all insects on the controls reaching 2nd instar. Expression of cry1Ac alone resulted in a decrease in mean weight of surviving larvae of 62% (line E-4-3; transformation with minimal gene cassette) and 60% (line B-2-2; transformation with whole plasmid DNA); these reductions were highly significant ($p < 0.0001$). On plants containing GNA + cry1Ac, mean larval weight was decreased by 71% and 48% (lines E-4-7 and E-6-5, respectively) and 65% and 46% (lines B-2-10 and B-3-2, respectively) relative to controls (significant at $p < 0.0001$), for plants cotransformed with minimal cassettes and whole plasmid DNA, respectively (Fig. 5b)

The results obtained for stem borer mortality are comparable to previous reports in the literature. Fujimoto *et al.* (1993) reported mortality levels of up to 50% for striped stem borer on transgenic rice plants expressing a codon-optimised cry1Ab gene under the control of the CaMV 35S promoter. More recently, high mortality levels for stem borer larvae on transgenic rice were reported by Ghareyazie *et al.* (1997) who demonstrated that expression of this truncated cry1Ab gene, but driven by the maize C₄ PEP carboxylase promoter. Synthetic cry1Ab and cry1Ac genes gave 100% mortality of striped stem borer larvae in stem section assays when expressed in transgenic rice (Cheng *et al.*, 1998; Shu *et al.*, 2000).

In conclusion, this is the first demonstration of expression of genes conferring agronomically important traits using "clean" DNA technology. Transgene expression levels in rice plants produced by this method were higher than those in plants transformed with whole plasmid DNA, resulting in slight increases in resistance towards two major insect pests of the crop.

ABSTRACT

Biolistic transformation was used to introduce genes encoding the insecticidal proteins snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and cry1Ac Bt toxin (δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*) into elite rice (*Oryza sativa*) cultivars. Plant transformation was carried out in parallel experiments simultaneously by using either whole plasmids containing suitable gene constructs, or the corresponding minimal gene cassettes, which were linear DNA fragments lacking vector sequences excised from the plasmids. Both transformation methods generated similar numbers of independent transformation events. Selected R₀ clonal plant lines were further characterised for presence and expression of transgenes. Co-transformation of the unselected genes (*cry1Ac* and *gna*) with the selectable marker (*hpt*) was at least as efficient for transformation with minimal gene cassettes as with whole plasmid DNA, and higher levels of accumulation of the insecticidal gene products GNA and cry1Ac were observed in plants resulting from minimal gene cassette transformation. Insect bioassays with major pests of rice showed that transgenic plants expressing *gna* showed enhanced resistance to brown planthopper (*Nilaparvata lugens*), and plants expressing *cry1Ac* were protected against attack by striped stem borer (*Chilo suppressalis*). Expression of both transgenes gave protection against both pests.

REFERENCES

1. Artelt, P., Grannemann, R., Stocking, C., Friel, J., Bartsch, J. and Hauser, H. (1991) The Prokaryotic Neomycin-Resistance-Encoding Gene Acts as a Transcriptional Silencer in Eukaryotic Cells. *Gene*, 99, 249-254.
2. Bennett, J., Cohen, M.B., Katiyar, S.K., Ghareyazie, B. and Khush, G.S. (1997) Enhancing insect resistance in rice through biotechnology. In Carozzi, N. and Koziel, M. (eds.), *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. Taylor and Francis Ltd., London, pp. 75-93.
3. Carozzi, N. and Koziel, M.e. (1997) *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. Taylor and Francis Ltd., London.
4. Cheng, X.Y., Sardana, R., Kaplan, H. and Altosaar, I. (1998) Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2767-2772.
5. Christou, P., Ford, T.L. and Kofron, M. (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, 9, 957-962.
6. Down, R.E., Gatehouse, A.M.R., Hamilton, W.D.O. and Gatehouse, J.A. (1996) Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered in vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. *Journal of Insect Physiology*, 42, 1035-1045.
7. Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic Acids Research*, 19, 1349-1349.
8. Foissac, X., Loc, N.T., Christou, P., Gatehouse, A.M.R. and Gatehouse, J.A. (2000) Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). *Journal of Insect Physiology*, 46, 573-583.
9. Fu, X.D., Duc, L.T., Fontana, S., Bong, B.B., Tinjuangjun, P., Sudhakar, D., Twyman, R.M., Christou, P. and Kohli, A. (2000) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research*, 9, 11-19.
10. Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Kyojuka, J. and Shimamoto, K. (1993) Insect-Resistant Rice Generated by Introduction of a Modified Delta-Endotoxin Gene of *Bacillus-Thuringiensis*. *Bio-Technology*, 11, 1151-1155.
11. Gatehouse, A.M.R., Davison, G.M., Newell, C.A., Merryweather, A., Hamilton, W.D.O., Burgess, E.P.J., Gilbert, R.J.C. and Gatehouse, J.A. (1997) Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: Growth room trials. *Molecular Breeding*, 3, 49-63.

12. Ghareyazie, B., Alinia, F., Menguito, C.A., Rubia, L.G., dePalma, J.M., Liwanag, E.A., Cohen, M.B., Khush, G.S. and Bennett, J. (1997) Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA(b) gene. *Molecular Breeding*, 3, 401-414.
13. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 6, 271-282.
14. Kononov, M.E., Bassuner, B. and Gelvin, S.B. (1997) Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: Evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant Journal*, 11, 945-957.
15. Magbool, S.B and Christou, P (1999) Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Molecular Breeding*, 5, 471-480.
16. Rao, K.V., Rathore, K.S., Hodges, T.K., Fu, X., Stoger, E., Sudhakar, D., Williams, S., Christou, P., Bharathi, M., Bown, D.P., Powell, K.S., Spence, J., Gatehouse, A.M.R. and Gatehouse, J.A. (1998) Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant Journal*, 15, 469-477.
17. Shu, Q.U., Ye, G.Y., Cui, H.R., Cheng, X.Y., Xiang, Y.B., Wu, D.X., Gao, M.W., Xia, Y.W., Hu, C., Sardana, R. and Altosaar, I. (2000) Transgenic rice plants with a synthetic cryIAb gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding*, 6, 433-439.
18. Sudhakar, D., Duc, L.T., Bong, B.B., Tinjuangjun, P., Maqbool, S.B., Valdez, M., Jefferson, R. and Christou, P. (1998) An efficient rice transformation system utilizing mature seed-derived explants and a portable, inexpensive particle bombardment device. *Transgenic Research*, 7, 289-294.
19. Sudhakar, D., Fu, X.D., Stoger, E., Williams, S., Spence, J., Brown, D.P., Bharath, M., Gatehouse, J.A. and Christou, P. (1998) Expression and immunolocalisation of the snowdrop lectin, GNA in transgenic rice plants. *Transgenic Research*, 7, 371-378.
20. Tinjuangjun, P., Loc, N.T., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. and Christou, P. (2000) Enhanced insect resistance in Thai rice varieties generated by particle bombardment. *Molecular Breeding*, 6, 391-399.

SUSTAINING AGRICULTURAL PRODUCTIVITY IN THE RAINFED SLOPING LANDS OF NORTHERN VIETNAM

TRAN DINH LONG¹ AND A RAMAKRISHNA²

¹ Deputy Director General, Vietnam Agricultural Science Institute (VASI), Hanoi.

² Resident Scientist, ADB Assisted Watershed Project, VASI, Hanoi /Agronomist, ICRISAT, Patancheru, India.

INTRODUCTION

The rainfed sloping lands compose approximately one-third land area of the northern Vietnam, consisting most of the provinces of Vinh Phu, Ha Bac, and Bac Thai, some parts of Tuyen Quang, Yen Bai, Hoa Binh, Ha Tay, and Quang Ninh, and a small part of Ninh Binh. Made up of low, rounded hills and narrow river valleys, the rainfed sloping lands form an arc around the Red River Delta, separating the alluvial plain from the Hoang Lien Son highlands. Hill slopes are the dominant landform, but the sinuous alluvial valleys represent an extension of the deltaic plain into the mountains.

Topography varies from densely packed hills to plains with isolated knolls. Hills are rounded, with level tops and convex slopes of between 5 and 40°. Most are between 20-25° with elevations ranging between 15 and 200 meters above the sea level. Between the hills are narrow valleys with alluvial soils used for irrigated rice cultivation.

The climate is monsoonal with hot, wet summers (April to August) and cool, cloudy, moist winters (December-February). The total rainfall is 1500-2000 mm per annum. The average annual temperature is 25° C, with an average maximum of 35° C (in August) and an average minimum of 12° C (in January). The southwest monsoon occurs from May to October, bringing high temperatures and heavy rainfall. November to May is the dry season with a period of prolonged cloudiness, high humidity, and light rain.

Soils are complex and varied. Mineralization is rapid, and organic substances quickly break down, resulting in low humus content. Intensive surface cultivation and deep leaching processes make the soil very acidic and poor in nutrients. Nitrogen, phosphate and other cations are easily dissolved or carried away to such an extent that these soils cannot be cultivated for long before they suffer serious degradation. In extreme cases of erosion, a hardpan of laterite nodules is exposed.

CHALLENGES OF DEVELOPMENT

A number of specific challenges should be addressed for development to be carried out successfully in the sloping land ecoregions. Chu Huu Quy (1995) identified very poor material and technical infrastructure; seriously damaged environment; poorly developed economy; low level of knowledge; high population increase; unemployment; and poor education and training for local professional staff and administrators as the main constraints. Ngo The Dan and Tran An Phong (1993) identified steep and broken terrain; inadequate technical and material infrastructure; difficult communication and transportation; and cultural standards and social conditions as the major constraints.

The analysis carried out by the Institute of Ethnology identified heavily broken terrain, steep slopes, inadequate production infrastructure, slow development of communication and transportation, unskilled agricultural workforce; and lack of suitable strategy of development as the major constraints (Be Viet Dang, 1993). A recent review by Terry Rambo (1995) lists remoteness and inaccessibility, low biological productivity, environmental degradation, disease and health problems, population increase, ethnic relations, and the lack of a development paradigm tailored to the special conditions of the sloping land ecoregions as key constraints on development.

These various studies on challenges, constraints, and problems of the sloping land ecoregion of the northern Vietnam can be consolidated into:

International Workshop on Biology. Hanoi – Vietnam 2-5 July 2001

- Physical constraints: broken terrain and steep slopes, poor soils and natural hazards.
- Environmental constraints: deforestation and land degradation.
- Infrastructure constraints: inadequately developed communication and transportation.
- Economic constraints: subsistence orientation, commitment to autarchy and inadequate development of markets and trade.
- Population problems: rapid growth rates, poor distribution and high rates of unemployment.
- Cultural constraints: persistence of traditional pattern of behavior, low levels of education and knowledge and ethnic relations.
- Intellectual constraints: inadequate scientific knowledge of the sloping land ecoregions and the lack of suitable strategies to guide development and planning.

CROP PRODUCTION AND SOIL EROSION PROBLEMS

More than 50% of the area has slopes above 20 degrees (Bui Quan Toan et al. 1993). Little level land is available for cultivation forcing farmers to clear fields on steeply sloping hillsides. In Da Bac district, Hoa Binh province, swiddens are frequently cleared on slopes exceeding 50 degrees, an angle so steep that a person can only stand upright with difficulty without holding on to surrounding tree stumps (Deanna Donovan et. al., 1997).

Rainfall is seasonal with much of the annual total concentrated in a few short events. Inadequate distribution of rainfall during the year causes intermittent and prolonged droughts leading crop failures or fall in crop yields and food production.

Diversity of soil is great. Yellow red feralitic soils are the most widespread type (Be Viet Dang, 1993). Soils in the sloping ecoregions of the northern Vietnam are deeply weathered, poor in nutrients, and highly vulnerable to erosion when cleared of vegetative cover and are subjected to various forms of degradation. Loss of humus rich topsoil leaves behind the subsoil devoid of vital plant nutrients leading to rampant infertility and poor waterholding capacity. Unterraced fields are highly subject to erosion with estimates of annual soil losses ranging from 150 - 350 t ha⁻¹ (Bui Quang Toan et al., 1993). Micronutrients are frequently limiting.

Forced by weather-related uncertainties and low incomes, farmers in sloping land ecoregions are generally resource poor and cannot invest adequately in crop husbandry. Thus these lands are threatened with destruction of natural habitat due to improper land use practices. These ecosystems have much lower carrying capacity and respond to crop intensification by rapid declines in productivity, even total collapse. Growth in population densities, combined with deforestation and environmental degradation, has created a veritable crisis in the sloping land ecosystems. There are currently no economically viable and environmentally sustainable alternatives available.

WHY DO WE NEED TO SUSTAIN PRODUCTION IN THE SLOPING LAND ECOLOGIES?

There are 10 million agricultural and forestry households in Vietnam with agriculture as the main component of the rural production structure (> 70% of households). In mountainous provinces this is further higher (> 80%) implying that other professions account for a smaller percentage. Surveys of farmer income show that, on an average, household earn their income mainly from agriculture (>72% of total income) and very small from other professions (< 12%).

There are only 7 m ha of cultivated land compared with 20 m ha of forestland (with 9 m ha under dense forests). In mountainous provinces, the flat lands are only 10% and sloping lands in the remaining 90%. Farmers in several areas have been exploiting sloping lands using backward and unsustainable methods like slash and burn cultivation, uncontrolled exploitation of forest products, free animal grazing resulting in continuous degradation of soil and environment. The economic status of ethnic families who live in these areas is getting badly affected resulting in migration to new areas and repeating the cycle. During 1991 and 1995, 172,000 households (832,000 persons) immigrated to 8 provinces of west high plateau and eastern part of the south and destroyed more than 100, 000 ha of pristine forests.

Population growth is rapid and will continue to be so for at least for next 20 years. The population densities are expected to double over the current levels by 2015. In general sloping agroecosystems, except in limited areas where irrigated terraces can be constructed, have much lower carrying capacity and respond to intensification by rapid declines in productivity, even total collapse.

Growth in population densities, combined with deforestation and environmental degradation, has created a veritable crisis in sloping land ecosystems. The unfavorable shift in the people to land ratio has forced a dramatic shortening of the fallow cycle. There are currently no economically viable and environmentally sustainable alternatives available for sloping ecoregions of the northern Vietnam.

The conservation of land and water resources in these ecosystems has been neglected for too long. There is an urgent need for development of sustainable land and water management strategies suitable for these ecoregions.

INTEGRATED PARTICIPATORY WATERSHED RESEARCH: THE NEED OF THE HOUR!

The sloping lands are made up of a combination of upland and lowland ecologies or a toposequential complex of ecologies representing upland, lowland and a coastal ecosystem. Watershed framework therefore, can provide necessary inter-ecological linkages. Watershed enjoins biophysical, social and economic inputs for optimal management, lead to diversified and high production, control environment degradation and provide a mechanism for the recharge of ground water aquifers. Focus on micro-level land and water will help optimizing food production and contain land degradation. Watershed based technologies offer excellent opportunities to meet this challenge. Soil and water conservation technologies can be best practiced on a watershed, which is a natural hydrological unit.

The research partnership between the Vietnam Agricultural Science Institute (VASI) and the International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) precisely address these concerns in the Asian Development Bank's (ADB) Regional Technical Assistance # 5812 began in April 1999. The project "Improving Management of Natural Resources for Sustainable Rainfed Agriculture" in Vietnam is addressing primarily two issues:

- Enhance and sustain crop production and
- Combat degradation of natural resource base

With specific objectives:

- Introduce improved soil, water, nutrient soil, water, nutrient and pest management technologies for efficient use of natural resources;
- Reduce soil degradation and increase rain water use efficiency through better infiltration, water harvesting and ground water recharging; and
- Identify and evaluate suitable cropping systems based on the agroecological potential of the region for sustained increases in agricultural productivity and farm income.

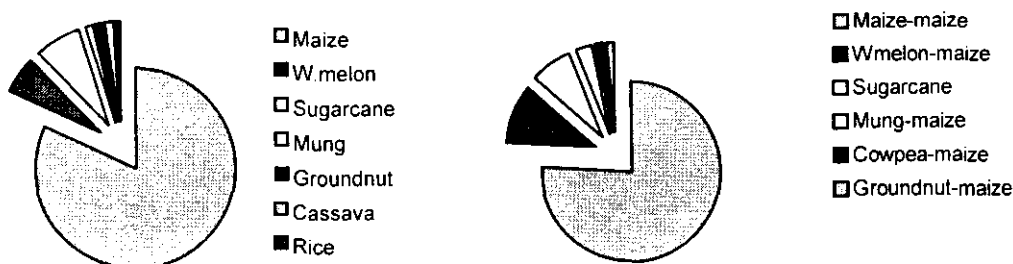
The approach we are taking is to encourage maximum participation of farmers' in planning and execution of all our activities. All the watershed interventions are thoroughly discussed and decided by the farmers. Researchers and extension workers aid in decision-making process and facilitate agreed activities by providing technical support.

THANH HA WATERSHED: FACTS AND FIGURES

The watershed is located in Kim Boi district of Hoa Binh Province. Baseline surveys were conducted covering the watershed as a whole for general description of macro-economic, population, infrastructure, institutions and other aspects. But most of the work concentrated at village and household level. Information on physical (rainfall, temperature, solar radiation, topography and soil) and biological (natural vegetation, plant pests and diseases) elements were obtained to determine what crops can be grown in an area, given a suitable human environment (economic, institutional and social elements).

Major crops in terms of cropped area are maize (83%), sugarcane (8%), legumes (13%) and watermelon (6%). Groundnut was grown in the past but went out of cultivation due to severe problem of pod rot disease. Cereal monocropping (maize- maize) is predominant and occupies 77% of the cultivated area followed by watermelon- maize cropping system (11%). Cereal - legume cropping is practiced in only 2-3% cultivated area.

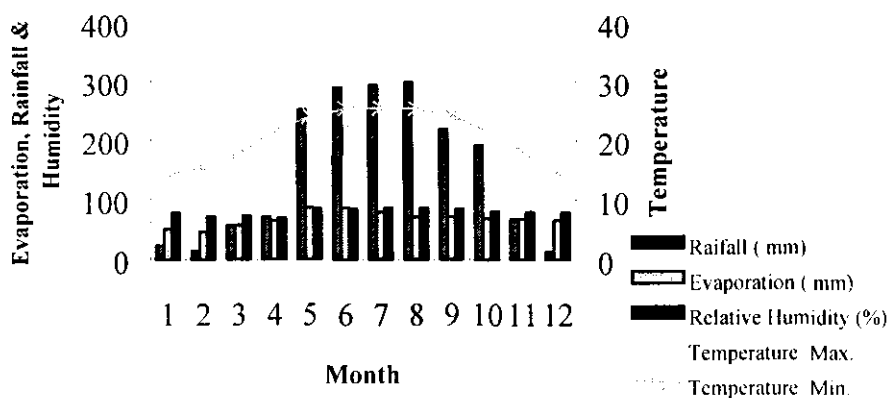
Fig 1. Crops and cropping systems



The average yields are low to moderate with a wide range [maize 0.9-7 t ha⁻¹; watermelon 10-36 t ha⁻¹; and mung 0.3-1.2 t ha⁻¹] and low cost: benefit ratio [0.4 (maize), 0.7 (watermelon) and 0.9 (mung)]. Discussions with the farmers revealed that production potential is high if appropriate crops and production technologies are used. Improved seed and cultural practices are being adopted only in maize.

The climate in the landscape watershed is monsoonal with hot, wet summers (April to August) and cool, cloudy, moist winters (December-February). The total rainfall is 1500-2000 mm per annum. The average annual temperature is 25° C, with an average maximum of 35° C (in August) and an average minimum of 12° C (in January). The southwest monsoon occurs from May to October, bringing high temperatures and heavy rainfall. November to May is the dry season with a period of prolonged cloudiness, high humidity, and light rain (Fig. 2).

Fig 2. Climate of Hoa Binh Province, 1984-98



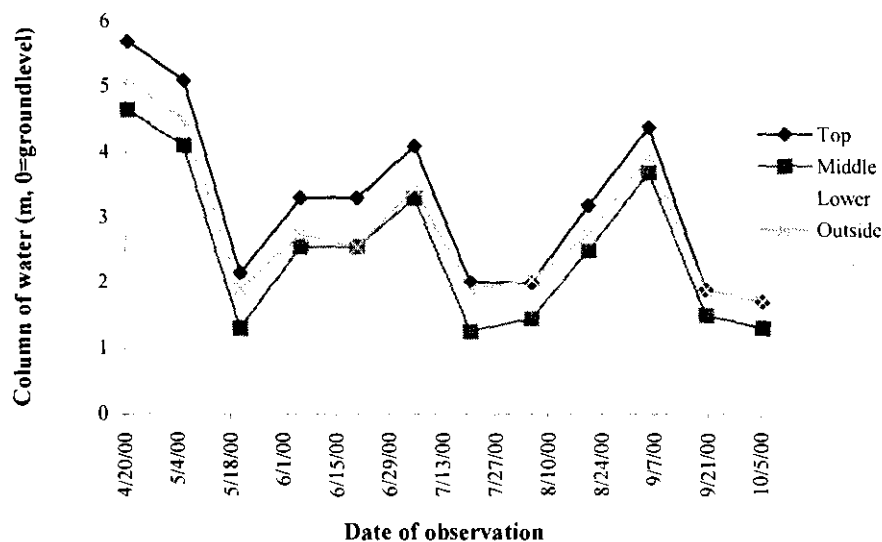
All available databases on soil, climate, crops, and input use for the targeted rainfed production system applicable in the ecoregion of northern Vietnam (7 provinces) are assembled to study spatial distribution of the constraints, analyze yield gaps, and examine opportunities for crop intensification.

SOIL AND WATER CONSERVATION

For increased water and soil conservation various measures such as landform treatments (ridge and furrow, contour planting), waterways and drainage channels, field bunds, vegetative barriers, storage of excess water through construction of dugout ponds, cropping intensity increase etc. were undertaken.

Ground water level in 10 open wells (8 inside and 2 outside the watershed) is being monitored at fortnightly intervals. About 1 m rise in the water level was recorded in the wells near the percolation tanks.

Fig 3. Water table fluctuation in the wells, Thanh Ha watershed



- Low temperature and moisture stress are important production constraints in groundnut during the winter season. The effect of plastic mulch on moisture conservation and soil temperature was assessed. Plastic mulching gave 26 % higher pod yields (2.86 t ha^{-1}) over no mulch (2.16 t ha^{-1}) in groundnut.

- Trials to evaluate the effect of mulch and chemicals on soil moisture conservation are initiated.
- Three water storage structures with a capacity of 40 cu m were constructed.
- Twenty thousand *Glyricidia* saplings were planted on the field property bunds and contours for stabilizing the bunds and to conserve the rainwater and soil.
- Staggered trenches, silt traps were dug to capture rainwater, reduce the velocity of runoff and to increase the opportunity time for infiltration of rainwater.
- Exotic grass species (*Brachiaria ruziziensis*) having high nutritive value and good adaptability was introduced in the grass ways and on field bunds to reduce runoff velocity, soil erosion and to serve as good fodder for farm animals.
- Gully plugging in potential areas is undertaken.
- Runoff and soil loss are being monitored with automatic data loggers.

INTEGRATED NUTRIENT MANAGEMENT

Improved nutrient management practice (180 N: 90P₂O₅: 90K₂O; 10 t FYM; 400 kg lime and biofertilizer) was compared with farmers' practice (300 N: 80P₂O₅: 45 K₂O) in maize with an objective to wean the farmers away from high dependence on inorganic fertilizers and encourage balance fertilization. Higher grain yields were obtained with improved practice (5.9 t ha^{-1}) and indicated considerable scope for savings on N fertilizer (Table 1).

- Application of bio-fertilizer in groundnut resulted in 19.8% higher pod yields (2.1 t ha^{-1}) over no bio-fertilizer (1.7 t ha^{-1}) application.
- Appropriate Rhizobium stains for soybean, groundnut, and mungbean were provided.
- Quantification of BNF using N-difference method is being done using non-fixing crop (maize and sesame) varieties of matching duration with groundnut and soybean in farmers' fields.
- Farmers have planted 25,000 *Glyricidia* saplings on farm bunds for producing N rich organic matter and for *in-situ* application.

- Farmer managed micronutrients trials were initiated.
- Maize straw burning is being discouraged and farmers were given training to use the straw either for soil incorporation or as mulch in young fruit trees. Vermi-composting is under active consideration for introduction in the watershed.

Table 1. Influence of nutrient management practices on grain yield of maize, spring 2000

Parameter	Improved practice	Farmers' Practice
Plant height (cm)	240	240
Height to first cob	131	129
Cob length (cm)	16.4	16.4
Cob girth (cm)	4.5	4.4
Yield plant (g)	103.2	97.8
Bio mass plant (g)	124.6	120.5
100 seed weight (g)	30.4	30.6
Shelling %	82.8	81.3
Grain yield t ha ⁻¹	5.88	5.24
Biomass t ha ⁻¹	11.9	11.80

	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	FYM	Lime
Improved practice	180	90	90	10 t	400 kg
Farmers' practice	350	80	45	Nil	Nil

INTEGRATED PEST AND DISEASE MANAGEMENT

The Integrated pest and disease management studies in the benchmark watershed are being aimed towards sustainable and increased productivity of crops and cropping systems. Regular monitoring of disease and insect buildup, appropriate selection of variety (resistant), seed treatment, cultural practices and need based chemical application are some of the measures that are being followed.

IMPROVED CROPPING SYSTEMS FOR PRODUCTIVITY GAINS AND SUSTAINABILITY

Improved cropping systems: Cereal monocropping (spring maize-autumn maize) is predominant in the watershed resulting in decline in soil fertility and increase in input costs. Trials to evaluate/identify improved cropping systems with soybean; groundnut and mungbean were taken up. All the new cropping systems were profitable over the traditional maize-maize cropping system indicating considerable scope for productivity gains and efficient use of NRs. Watermelon mung-groundnut, watermelon-mung-soybean, and watermelon-mung-maize cropping systems gave highest income (201 to 268%) over the traditional cropping system (Table.2).

Table 2. Net income (US \$) from various cropping systems, 1999-2000.

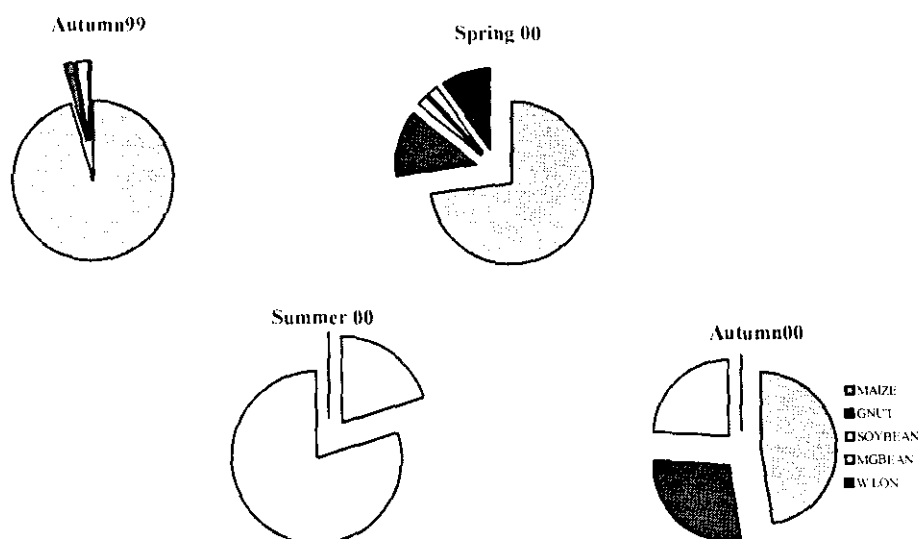
Cropping system	Net Income (US \$)	Additional profit over traditional system (US \$)	% Increase over traditional system
Maize-maize (traditional system)	492	--	--
Maize-soybean	746	254	51
Maize-groundnut	780	288	58
Watermelon-maize	1453	961	195
Groundnut-maize	825	333	68
Groundnut-soybean	1079	587	119
Soybean-groundnut	1102	610	123
Soybean-maize	814	322	65
Soybean-soybean	1068	576	117

International Workshop on Biology. Hanoi – Vietnam 2-5 July 2001

Mungbean -soybean-maize	773	281	57
Watermelon-mungbean-maize	1481	989	201
Mungbean -soybean-groundnut	1106	614	125
Watermelon-mungbean-groundnut	1813	1321	268
Mungbean-soybean-groundnut	1130	638	130
Watermelon-mungbean-soybean	1803	1311	266

More than 3/4 cropped area was under maize monocropping before the intervention of watershed based technologies. Technical backstopping and provision of improved seeds of the remunerative crops like groundnut, mungbean, and soybean resulted in reduction in maize area by about half during the last one year in the micro-watershed (Fig 4). Many more farmers are interested to take up groundnut cultivation but due to non-availability of improved seed further increase in groundnut area was not possible during this year.

Fig 4. Area (ha) under new cropping systems in Thanh Ha watershed



Improved production practices: Farmers in the watershed are following traditional cultural practices due to technological inaccessibility. Improved production practices (integrated nutrient, pest and disease management and agronomy) were compared with the farmers' practice in maize during autumn-winter 1999 and spring 2000. A yield increase of 8% was possible with 28% reduction in N fertilizer use (Table 3). Improved cultivars of soybean, groundnut and mungbean were introduced for large-scale cultivation with improved agronomy.

Table 3. Effect of improved production practices on maize yield

Parameter	Spring 2000		Autumn 1999	
	IP	FP	IP	FP
Plant height (cm)	240	240	213	215
Height to first cob	131	129	95	90
Cob length (cm)	16.4	16.4	12.9	11.9
Cob girth (cm)	4.5	4.4	4.7	4.6
Yield plant (g)	103.2	97.8	106.9	89.4
Bio mass plant (g)	124.6	120.5	162.8	135.4
100 seed weight (g)	30.4	30.6	31.8	31.7
Shelling %	82.8	81.3	84.8	84.6
Grain yield t ha ⁻¹	5.71	5.32	5.23	4.85
Biomass t ha ⁻¹	11.9	11.80	8.91	8.09

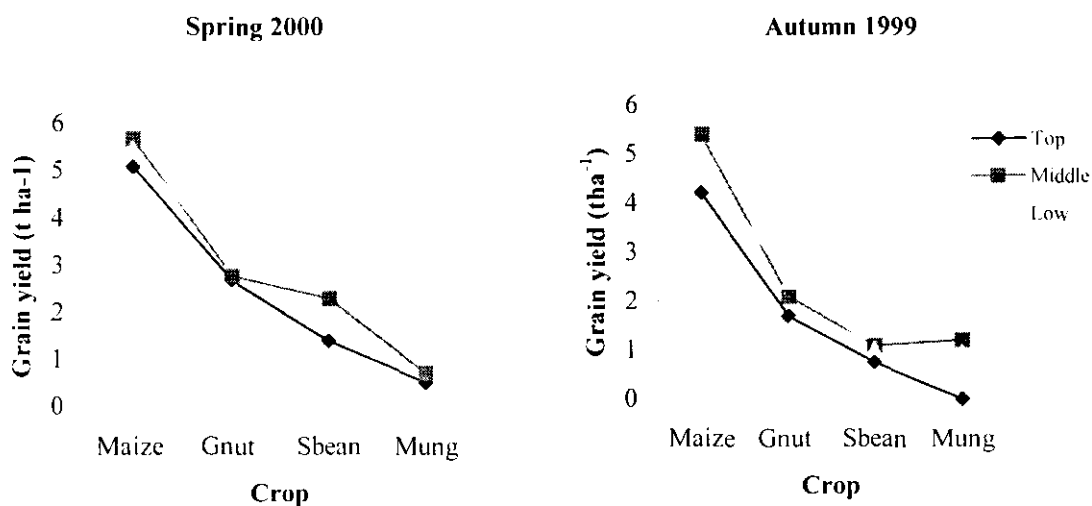
Demonstration of new crops and/or improved cultivars: On-farm demonstrations were conducted with mungbean, soybean, groundnut and watermelon.

Improved mungbean cultivar (T 135) was assessed for its suitability as a catch crop in watermelon-maize cropping system. T- 135 has produced 1.12 t - 1.24 t ha⁻¹ and did not pose any problem for normal maize cultivation.

An early maturing soybean cultivar TN 12 (70-75 days) was introduced to increase cropping intensity and system productivity. The new cropping system allows four crops watermelon-soybean-groundnut-sweet potato/vegetables in one year, if water is made available during the dry season.

Improved groundnut cultivars (LO 2 and MD 7) with high yield potential (3-4 t ha⁻¹) and bacterial wilt and pod rot tolerance were introduced. Farmers highly impressed with groundnut and interested to plant in large areas.

Fig 5. Influence of toposequence on crop productivity



Influence of toposequence: Grain yields of soybean, groundnut, mungbean, and maize were delineated based on the toposequence in the landscape watershed to find out the influence of land degradation/soil fertility on crop productivity (Fig 5). In general, higher grain yields were obtained in mid and lower part of the toposequence compared to top of the toposequence due to less degradation and better soil fertility. Among the crops grown, soybean suffered most due to fertility differences on the toposequence. Among crops, groundnut can be grown successfully on top, mid and lower part of the toposequence while mungbean and soybean need high level of management on top of the toposequence and for obtaining good yields. This kind of information would assist in land use planning and development of appropriate nutrient management options.

TRANSFER OF TECHNOLOGY AND HUMAN RESOURCE DEVELOPMENT

- Training Courses

♥ **In country Training Course on Participatory Integrated Watershed Management:** Sixteen Vietnamese scientists participated in the training course organized during 7-16 October at VASI with the objectives to

- Teach recent concepts in integrated participatory watershed management
- Introduce the needs of soil and water management by landscape watershed in upland agriculture in medium rainfall (800-1300 mm) tropical areas
- Train scientists currently working in the watershed project in the design and development of efficient land and water management at watershed scale.

Senior scientists from the Asian Institute of Technology (AIT), ICRISAT, Institute of Soil and Fertilizers, Plant Protection Institute, and VASI served as resource persons. The course was very

effective and provided good understanding about integrated participatory watershed concepts to the participants.

▼ **A short-training course on integrated insect and disease management** was organized during 18 and 19 February 2000 before the spring season plantings. On the first day, the agricultural extension officers and technicians of Thanh Ha State Farm and on the second day cooperating farmers were given on the job training on

- (i) Important disease and insect problems on mungbean, soybean, groundnut, and maize.
- (ii) Pest and disease identification.
- (iii) Seed treatment with fungicides, insecticides, and biofertilizer and
- (iv) Appropriate spraying methods.

▼ **A short-term training course on improved production technologies** of soybean, groundnut and mungbean including *Rhizobium* inoculation methods was conducted before the cropping season.

- **Field/farmers' Day:** Farmers' days were conducted in each cropping season in the landscape watershed and all the farmers in the Thanh State Farm (consisting 7 Brigades/villages) were invited to get them familiarized with different components and technologies of the integrated watershed.

- **Video film:** The Vietnam Television crew was requested and the watershed activities were filmed. The video is being used for wider publicity through the media.

- **Brochure:** A multi color attractive and informative brochure outlining the scope for efficient use of NRs under watershed context was brought out and being distributed widely for enhanced public awareness and sensitize the research managers.

CONCLUSIONS

The conservation of land and water resources in the sloping land ecoregions has been neglected for too long. Sustainable farming on sloping lands in the context of a seriously deteriorated ecology and environment is not an easy task. Thorough understanding of constraints and development of appropriate technology with focus land and water management at micro-level will help optimizing food production and arrest further land degradation. Watershed based technologies offer excellent opportunities for sustainable land and water development in sloping land ecoregions. In the coming years, the strategic goal is sustainable eco-agricultural development in the sloping land ecoregions through new crops and cropping systems to make cultivation more profitable; agroforestry in the higher elevations of the toposequence to arrest erosion; horticulture and animal raising to raise the household economy.

REFERENCES

Be Viet Dang. Ed. 1993. *Nhung Bien Doi ve Kinh Te-Van Hoa a cac Tinh Mien Nui Phia Bac* (Economic and cultural changes in the northern mountain provinces). Hanoi: Nha Xuat Ban Khoa Hoc Xa Hoi.

Bui Quang Toan. 1993. *San xuat nong nghiep o trung du mien nui va van khai tac dat mot vu* (Agricultural production in the midlands and mountains and the problems of exploiting single croplands). Pages 59-67 *In Vien Quy Hoach va Thiet Ke Nong Nghiep. Nong Nghiep Trung Du Mien Nui. Hien Trang va Trien Vong.* Hanoi: Nha Xuat Ban Nong Nghiep.

Bui Quang Toan., Bui Thi Si, and Vu Cong Lan. 1993. *Dat doi nui o nuoc ta va van de quy hoach phat trien* (Hill and mountain soil in our country and problems and development planning). Pages 35-46 *In Vien Quy Hoach va Thiet Ke Nong Nghiep. Nong Nghiep Trung Du Mien Nui. Hien Trang va Trien Vong.* Hanoi: Nha Xuat Ban Nong Nghiep.

Chu Huu Quy. 1995. Overview of highland development in Vietnam: General characteristics, socioeconomic situation, and development challenges. Page 319 *In A. T. Rambo. R. R. Reed, Le Trong Cuc, and M. R. DiGregorio (eds.) The Challenges of Highland Development in Vietnam.* Honolulu: East-West Center.

Deanna Donovan., A. Terry Rambo., Jefferson Fox., Le Trong Cuc, and Tran Duc Vien (eds.). 1997. *Development Trends in Vietnam's North Mountain Region. An Over View and Analysis (Vol. 1).* Hanoi. National Political Publishing House. Pp109.

Deanna Donovan., A. Terry Rambo., Jefferson Fox., Le Trong Cuc, and Tran Duc Vien (eds.). 1997. Development Trends in Vietnam's North Mountain Region. Case Studies and Lessons from Asia (Vol. 2). Hanoi. National Political Publishing House. pp. 231.

Ngo The Dan and Tran An Phong. 1993. *Khai tac va giu gin tot vung dat trung du va mein nui nuoc ta* (Good exploitation and conservation of our midland and mountain region). Pages 5-15 In Vien Quy Hoach va Thiet Ke Nong Nghiep. *Nong Nghiep Trung Du Mien Nui, Hien Trang va Trien Vong*. Hanoi: Nha Xuat Ban Nong Nghiep.

Rambo, A. Terry. 1995. Perspectives on defining highland development challenges in Vietnam: New frontier or cul-de-sac? Pages 21-30 In A. T. Rambo. R. R. Reed, Le Trong Cuc, and M. R. DiGregorio (eds.) *The Challenges of Highland Development in Vietnam*. Honolulu: East-West Center.

SUMMARY

SUSTAINING AGRICULTURAL PRODUCTIVITY IN THE RAINFED SLOPING LANDS OF NORTHERN VIETNAM

TRAN DINH LONG¹ AND A RAMAKRISHNA²

¹ Deputy Director General, Vietnam Agricultural Science Institute (VASI), Hanoi.

² Resident Scientist, ADB Assisted Watershed Project, VASI, Hanoi /Agronomist, ICRISAT, Patancheru, India.

The rainfed sloping lands occupy approximately one-third area of northern Vietnam and are threatened with destruction of natural habitat due to improper land use practices. The production technology practiced on these sloping lands is exacerbating soil loss and destruction of the natural habitat since the soils are deeply weathered, poor in nutrients, and highly vulnerable to erosion. The loss of humus rich topsoil leaving behind the subsoil devoid of vital plant nutrients is leading to rampant infertility and poor water holding capacity of soils.

Remoteness and inaccessibility, low biological productivity, environmental degradation, disease and health problems, population increase, ethnic relations, and lack of a development paradigm tailored to the special conditions are the key constraints. The sloping land ecosystems have much lower carrying capacity and respond to crop intensification by rapid declines in productivity, even total collapse.

Growth in population densities, combined with deforestation and environmental degradation, has created a veritable crisis in the sloping land ecosystems. Currently no economically viable and environmentally sustainable alternatives are available. Sustainable farming on these sloping lands in the perspective of a seriously deteriorated ecology and environment is not an easy task. Through proper understanding of constraints and development of appropriate technology with focus on soil, water and nutrient management will help optimize food production and combat further resource degradation. Watershed based natural resource management technologies that offer excellent opportunities to optimize food production and arrest environment degradation in sloping land ecoregions of the northern Vietnam were discussed.

MỐI QUAN HỆ GIỮA THỂ TRỌNG, TUỔI THÀNH THỰC SINH DỤC ĐẾN CHẤT LƯỢNG SINH SẢN CỦA BA BA (PELODISCUS SINENSIS)

PHẠM ĐÌNH LONG

Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên

I. MỞ ĐẦU

Từ xưa tới nay người ta cho rằng Ba ba là sản phẩm bổ dưỡng, có tác dụng tăng cường sức khoẻ, có thành phần dinh dưỡng phong phú. Do giá trị thực phẩm và dược học cao, lại thêm "*Vật hiếm trở nên quý*", nên thị trường trong và ngoài nước giá trị thương phẩm của Ba ba rất được coi trọng [4.5].

Trên thế giới, nghề nuôi Ba ba đã có từ lâu đời. Nhật Bản, nghề nuôi Ba ba đã có trước thế chiến thứ nhất, Trung Hoa lục địa, Đài Loan đã phát triển mạnh mẽ hơn 30 năm nay [5]. Việt Nam, thời tiết thuận lợi, nhưng nghề nuôi Ba ba chỉ mới có 10 năm trở lại đây [1.2]. Công nghệ nuôi Ba ba ở Việt Nam còn rất thô sơ, năng suất thấp, những hiểu biết về đặc điểm sinh thái, sinh lý cũng như kỹ thuật chăn nuôi còn rất ít ỏi.

Nghiên cứu về mối quan hệ giữa thể trọng, tuổi thành thực sinh dục của Ba ba bố mẹ đến chất lượng sinh sản là một nhu cầu quan trọng, nhằm đóng góp thêm những hiểu biết vào kho tàng kỹ thuật nuôi Ba ba năng suất cao ở nước ta.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Ba ba bố mẹ được nghiên cứu là Ba ba hoa (còn gọi là Ba ba trơn), phổ biến ở ao hồ Việt Nam.

Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 3 năm 1998 đến tháng 11 năm 1998 tại cơ sở nuôi Ba ba của ông Vũ Thành Tựu, thị xã Sông Công tỉnh Thái Nguyên.

2. Quy trình nuôi

Bốn bể xi măng có kích thước ($1 \times 2 \times 2,5 = 5m^3$), mức nước sâu 70cm, đáy bể có cát dày 20cm, mặt nước phủ 2/3 diện tích bề mặt. Trên mỗi bể có ô cát để Ba ba bò lên đẻ. Bể có máng đựng thức ăn, có hệ thống cấp thoát nước làm sạch môi trường.

Mỗi ngày cho Ba ba ăn hai lần vào lúc 7 giờ và 17 giờ, thức ăn là cá, cua xay nhỏ. Điều kiện chăm sóc (môi trường, chế độ dinh dưỡng) cả 4 bể giống nhau.

Mỗi bể được nuôi 5 cá thể cái và 2 cá thể đực theo cấp độ từ 2-5 tuổi, trọng lượng, kích thước được cân đo trước lúc thả.

3. Phương pháp nghiên cứu

- Dùng cân kỹ thuật của Trung Quốc để xác định trọng lượng ba ba mẹ, trọng lượng trứng thu được.

- Dùng thước cặp kỹ thuật để đo đường kính trứng.

- Xác định trứng thụ tinh bằng phương pháp quan sát của Tăng Minh Cường (Trung Quốc) [3].

Trứng thu hoạch hàng ngày được phân tích, lấy số liệu theo phương pháp nghiên cứu sinh thái học bò sát của Trần Kiên. Số liệu xử lý theo phương pháp thống kê sinh học.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. **Mối quan hệ giữa trọng lượng cơ thể, tuổi trưởng thành sinh dục đến số lứa đẻ, số lượng trứng trong một năm của một cá thể**

Bảng 1: Theo dõi số lượng trứng, số lứa đẻ của 1 con/1 năm và số trứng của 1 con/1 lứa

Nhóm bố mẹ (tuổi)	Trọng lượng (g) X±m	Số lượng trứng của 1 con/1 năm	Số lứa đẻ của 1 con/1 năm	Số lượng trứng của 1 con/1 lứa
2	615±75	24,4±3,13	2,6±0,22	9,38±0,55
3	1.350±107	34,2±2,90	3,0±0,12	11,54±0,28
4	2.242±137	42,6±2,60	3,2±0,48	13,31±0,26
5	3.731±183	46,0±2,35	3,4±0,75	13,53±0,29

Qua (bảng 1) ta thấy tuổi thành thực sinh dục của con mẹ, trọng lượng cơ thể có liên quan đến số lượng trứng và số lứa đẻ trong một năm.

Nhóm Ba ba hai tuổi trọng lượng cơ thể 0,6kg có số lượng trứng trung bình một năm là: 24,4 quả, số lứa đẻ trung bình là: 2,6 và số trứng trung bình của một cá thể trong một lứa là: 9,25 quả.

Ba ba ở tuổi trưởng thành cao nhất (5 tuổi) có trọng lượng cơ thể là 3,7kg có kết quả cao nhất, số lượng trứng trung bình của một cá thể trong một năm: 46 quả, số lứa đẻ cũng nhiều hơn: 3,4 và số lượng trứng của một con/1 lứa là: 13,6 quả.

2. **Mối quan hệ giữa trọng lượng cơ thể, tuổi thành thực sinh dục đến trọng lượng, kích thước và tỷ lệ thụ tinh của trứng Ba ba.**

Bảng 2: Bảng theo dõi trọng lượng, kích thước và tỷ lệ trứng thụ tinh

Nhóm mẹ (tuổi)	Trọng lượng mẹ (g) X ± m	Số trứng quan sát (quả)	Trọng lượng trứng (g)	Đường kính trứng (cm)	Trứng thụ tinh kém (quả)	Trứng thụ tinh tốt (quả)	Tỷ lệ thụ tinh (%)
2	615±75	122	4,05±0,24	2,01±0,12	18	104	85,25
3	1.350±107	171	6,06±0,29	2,31±0,13	17	154	90,01
4	2.242±137	213	6,70±0,31	2,35±0,14	12	201	94,37
5	3.731±183	230	7,20±0,30	2,52±0,13	10	220	95,65

Bảng (2) ta thấy chất lượng trứng có quan hệ rõ rệt với tuổi và thể trọng Ba ba bố mẹ. Ba ba có tuổi trưởng thành nhỏ, có trọng lượng cơ thể nhỏ, trọng lượng trung bình của trứng chỉ đạt: 4,05g và tỷ lệ thụ tinh thấp: 85,25%.

Nhóm Ba ba bố mẹ (5 tuổi) cơ thể có trọng lượng bình quân: 3,7kg, chất lượng trứng cao hơn. Trọng lượng trung bình của trứng: 7,2g, tỷ lệ thụ tinh của trứng đạt tới 95,65%.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Qua nghiên cứu 4 nhóm Ba ba có tuổi thành thực sinh dục khác nhau (từ 2-5 tuổi) có trọng lượng tương ứng (0,61-3,7kg), ta nhận thấy:

- Ba ba 5 tuổi, có trọng lượng 3,73kg, có số lượng trứng, số lứa đẻ, và số lượng trứng trong một lứa đẻ cao nhất, chất lượng trứng (trọng lượng, đường kính trứng và tỷ lệ thụ tinh) cũng cao nhất.

- Ba ba 2 tuổi có trọng lượng 615g, có số lượng trứng, số lứa đẻ và số lượng trứng trong một lứa đẻ thấp nhất, chất lượng trứng, trọng lượng, đường kính trứng và tỷ lệ thụ tinh là thấp nhất (bảng 1-2).

- Như vậy, trong chăn nuôi để thu hoạch trứng có số lượng và chất lượng cao nên cho Ba ba bố mẹ tham gia sinh sản từ 3 tuổi trở lên.

- Cần được nghiên cứu tiếp mối quan hệ giữa tuổi và thể trọng bố mẹ đến tốc độ sinh trưởng của con non.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Thủy sản Vụ nghề cá. *Tổng kết kỹ thuật nuôi Ba ba ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội 1998.
1. Nguyễn Lâm Hùng. *Cẩm nang kỹ thuật nuôi Ba ba, ếch, lươn, tré lai*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội 1995.
3. Tăng Minh Cường - Vương Tân Hiền. *Kỹ thuật nuôi Ba ba - Rùa* (Trung Văn). Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật tỉnh Hồ Nam Trung Quốc 1998.
4. Lý Kiên Điền - Hoàn Sùng Hào. *Kỹ thuật nuôi Ba ba nhân tạo tốc độ nhanh* (Trung Văn). Nhà xuất bản Nông nghiệp Trung Quốc năm 1996.
5. Vương Kiên Hoa - Diệp Chính Dương. *Nghiên cứu về bệnh Ba ba và cách phòng trị* (Trung Văn). Nhà xuất bản KHKT Nông nghiệp Trung Quốc 1998.

SUMMARY

INVESTIGATION ON INFLUENCES OF BODY WEIGHT, REPRODUCTIVE AGE ON THE QUALITY, QUANTITY OF EGGS OF TRIONYCHILD TURTLES IN ARTIFICIAL FEEDING CONDITION

PHAM DINH LONG

Our investigation on some productive couple turtle at the age of 2-3-4-5 years and the correlative weight of 0,61-1,35-2,24-3,73 (kgs). The result shows that the couple turtle of 4-5 years give more eggs in bring forth, and more bring forths in a year than the turtles of 2-3 years. Moreover, the quality of eggs (weight, side, and insermination rate) of the 4-5 years turtles is also better than the 2-3 years creatures.

MỘT SỐ CHỈ TIÊU HUYẾT HỌC
CỦA BABA TRƠN (PELODISCUS SINENSIS, WIEGMAN 1834)

PHẠM ĐÌNH LONG
KTN¹-DHSP Thái Nguyên

Ba ba là loài động vật, thuộc lớp bò sát (Reptilia) trong bộ Rùa
(*Testudinata*) và thuộc họ Ba ba (*Trionychidae*) [1]

Họ Ba ba có 8 giống hơn 20 loài phân bố rộng từ châu á, châu Phi đến tận Bắc - Mỹ [2]
ở Việt Nam, Ba ba phân bố gần như khắp cả nước, phổ biến có 4 loài:

1. Ba ba trơn (Ba ba hoa) (Trionyx sinensis)
2. Ba ba gai (Trionyx steinachderi)
3. Ba ba Nam bộ (Trionyx cartilagineus)
4. Ba ba suối (lẹp suối) [3]

Nghề nuôi Ba ba ở nước ta đây triển vọng, nhưng việc nghiên cứu Ba ba, nhất là các chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá trong cơ thể Ba ba còn quá ít ỏi. Một số nghiên cứu trong lĩnh vực này còn đứt đoạn [4].

Nghiên cứu một số chỉ tiêu huyết học của Ba ba trơn, nhằm làm phong phú thêm kiến thức huyết học của Ba ba. Từ các chỉ tiêu huyết học được nghiên cứu, tìm ra một số chỉ tiêu đặc trưng cho tình trạng sinh lý nhất định của Ba ba. Từ đó, rút ra một vài phép thử thông qua kiểm nghiệm máu, để phán đoán tình trạng dinh dưỡng phát dục hoặc bệnh của Ba ba, giúp người chăn nuôi có điều kiện để điều chỉnh kỹ thuật nuôi, phòng trị bệnh phù hợp [5]

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là Ba ba trơn (*Pelodiscussinensis*) có trọng lượng khoảng 500-600 gam, mua từ cơ sở nuôi Ba ba của ông Vũ Thành Tựu, ở thị xã Sông Công, thành phố Thái Nguyên. Trước thời gian thí nghiệm 1 tuần, Ba ba được nuôi trong bể có kích thước $(3 \times 2 \times 1) = 6 \text{ m}^3$. Việc phân tích các chỉ tiêu huyết học được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học, thuộc Trung Tâm Khoa Học Tự Nhiên và Công Nghệ Quốc Gia.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Thu mẫu theo phương pháp của Ivanova (1983).
- Xác định số lượng hồng cầu và bạch cầu: Dùng buồng đếm Gonaev theo phương pháp của Kudriaxev 1969 và Ivanova (1983).

- Xác định công thức bạch cầu theo phương pháp của Ivanova (1983).
Máu được lấy từ tim, cố định trong cồn tuyệt đối (97%) nhuộm bằng hematoxinilin và eosin [6].

Có khoảng 300 bạch cầu được đếm trên mỗi tiêu bản để tính tỷ lệ phần trăm các loại tế bào.

- Xác định kích thước tế bào máu và nhân, tỷ lệ giữa các loại bạch cầu theo phương pháp Ivanova (1983).

- Xử lý số liệu: Theo phương pháp thống kê sinh học của Nguyễn Văn Thiện và Trần Đình Miên (1979)

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu

1.1. Điều kiện tự nhiên nơi thu mẫu

Ba ba dùng để nghiên cứu được nuôi ở ao của ông Nguyễn Thành Tụ thị xã Sông Công thành phố Thái Nguyên, có nhiệt độ trung bình 25°C, độ pH = 6,8-8,0. Ba ba được chiếu sáng từ 6-18 giờ trong ngày cho Ba ba ăn cá mè xay nhỏ theo yêu cầu. Mỗi giới tính 5 con, máu được lấy vào lúc 9 giờ sáng.

1.2. Đặc điểm các thành phần hữu hình của máu Ba ba

1.2.1. Đặc điểm của hồng cầu

+ Hồng cầu Ba ba có dạng hình cầu, nhân có dạng cầu, bầu dục, mang đặc điểm chung của máu loài bò sát.

+ Số lượng hồng cầu: Ba ba đực: $(0,52 \pm 0,03) \cdot 10^6$ tb/mm³. Ba ba cái $(0,49 \pm 0,02) \cdot 10^6$ tb/mm³

+ Kích thước hồng cầu:

- Đường kính tế bào: Ba ba đực: 18,37µm. Ba ba cái : 17,86µm

- Đường kính nhân: Ba ba đực: 5,10µm. Ba ba cái : 5,35µm

+ Hàm lượng hemoglobin: Ba ba đực: $(12,28 \pm 0,13)$ g%. Ba ba cái : $(11,37 \pm 0,09)$ g%.

1.2.2. Số lượng, công thức và kích thước bạch cầu

+ Căn cứ vào kích thước, hình dạng, số lượng, độ bắt màu, ta thấy có nhiều kiểu tế bào bạch cầu khác nhau

H₁-Tup A

H₂Ưa eosin lớn

H₂Ưa eosin bé

H₄-heterophyl

H₅lymphocyte

H₆ Monocyte

- Gần như không có sự khác biệt về kích thước, tính chất bắt màu của tế bào bạch cầu giữa con đực và con cái.

- Tế bào ưa eosin: Dựa trên kích thước của tế bào và hình dạng nhân ta có thể phân biệt thành hai loại: Kiểu bé (H₂) có nhân phân thành hai thùy. Kiểu to (H₂) nhân không phân thùy, các hạt to bắt màu đậm hơn. Nói chung tế bào ưa eosin nhân nằm lệch tâm.

- Tế bào kiểu A (Tup A) H₁ đây là loại tế bào đặc trưng của loài bò sát. Nhân tế bào tròn, bắt màu thâm, tế bào chất trong suốt.

- Tế bào heterophil: có dạng hình que, nhân không phân thùy (H₄).

- Tế bào ưa kiềm: có dạng tròn, nhân tròn nằm ở trung tâm tế bào.

- Tế bào lymphocyte: kích thước đa dạng, có nhân lớn hình răng cưa, nằm lệch tâm (H₅).

- Monocyte: có kích thước nhỏ, nhân hình tròn nằm giữa trung tâm tế bào H₆.

Bảng 1

Số lượng, công thức, kích thước tế bào bạch cầu của con đực và con cái

Loại tế bào	Tỷ lệ % bạch cầu		Kích thước tế bào (μm)		Kích thước nhân (μm)		Số Ba ba số mẫu
	Đực	Cái	Đực	Cái	Đực	Cái	
-Ura eosin lớn	22,31 \pm 8,15	19,65 \pm 4,20	19,12 \pm 0,32	19,08 \pm 1,02	5,73 \pm 0,25	5,53 \pm 0,49	5/25
- Ura eosin bé	20,77 \pm 6,37	15,37 \pm 2,47	11,48 \pm 0,87	12,21 \pm 0,56	4,48 \pm 0,20	4,76 \pm 0,08	5/25
-Tup A	38,59 \pm 8,24	50,62 \pm 5,10	13,05 \pm 2,04	14,12 \pm 1,02	4,44 \pm 0,75	4,94 \pm 0,50	5/25
-Heterophilin	0,83 \pm 0,31	1,25 \pm 0,42	9,87 \pm 0,98	11,98 \pm 1,27	3,36 \pm 0,34	5,03 \pm 0,26	5/25
-Lymphocyte	13,53 \pm 4,68	11,47 \pm 1,07	10,02 \pm 0,95	9,56 \pm 1,12	5,71 \pm 0,55	5,54 \pm 0,49	5/25
-Basophil	1,88 \pm 0,55	0,99 \pm 0,49	9,25 \pm 0,95	9,36 \pm 1,03	4,92 \pm 0,49	5,10 \pm 0,07	5/25
-Monocyte	2,08 \pm 0,65	0,64 \pm 0,34	8,97 \pm 0,86	9,86 \pm 1,29	2,87 \pm 0,05	4,93 \pm 0,35	5/25

- Số lượng bạch cầu: Ba ba đực $(4,50 \pm 0,04) \cdot 10^3 \text{tb/mm}^3$. Ba ba cái $(4,20 \pm 0,03) \cdot 10^3 \text{tb/mm}^3$.

- Công thức bạch cầu: Bạch cầu hạt gồm có: eosin, basophil.

Bạch cầu không hạt gồm: Monocyte, Lymphocyte tỷ lệ giữa các loại bạch cầu đực trình bày (bảng 1).

1.2.3. Độ lắng máu.

Nhìn chung độ lắng máu của Ba ba có trọng lượng càng lớn độ lắng máu càng thấp, giữa con đực và con cái cùng trọng lượng, cùng độ tuổi thì tốc độ lắng máu gần giống nhau.

Ba ba đực: 2,00mm/h. Ba ba cái: 3,20mm/h

2. Thảo luận

Trong các tế bào bạch cầu của Ba ba trơn, tế bào ura eosin lớn có kích thước lớn nhất, tế bào ura kiềm có kích thước nhỏ nhất.

Tỷ lệ nhân / tế bào, lớn nhất ở lymphocyte và thấp nhất ở tế bào eosin lớn. Tỷ lệ nhân/tế bào, của heterophil và Monocyte ở con đực thấp hơn con cái. Đặc biệt tế bào kiểu A có số lượng lớn nhất. Các loại tế bào bạch cầu khác ít hơn, ít hơn cả là heterophil

III. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1, Số lượng hồng cầu Ba ba có trọng lượng (500 -600g) Con đực: $(0,52 \pm 0,53) \cdot 10^6 \text{tb/mm}^3$. Con cái: $(0,49 \pm 0,02) \cdot 10^6 \text{tb/mm}^3$.

2, Hàm lượng hemoglobin ở Ba ba cùng trọng lượng Con đực: $(12,28 \pm 0,13) \text{g\%}$. Con cái: $(11,37 \pm 0,09) \text{g\%}$

3., Tế bào Bạch cầu có nhiều loại, có kích thước và chức năng khác nhau, gồm 6 loại chủ yếu: Tế bào kiểu A ura eosin, heterophyl, basophyl, lymphocyte, Monocyte.

4, Số lượng bạch cầu Ba ba có trọng lượng (500-600g) Con đực: $(4,50 \pm 0,04) \cdot 10^3 \text{tb/mm}^3$. Con cái: $(4,50 \pm 0,03) \cdot 10^3 \text{tb/mm}^3$.

Những số liệu ở đây chỉ được coi là những giá trị để tham khảo. Vì Ba ba Việt Nam có 4 loài, cần xác định giá trị cụ thể của từng loài. Ngoài ra cần chú ý đến các yếu tố khác ảnh hưởng đến kết quả như: Thời gian trong năm (*mùa đông Ba ba ngủ đông quá trình trao đổi chất bị hạn chế*) cần chú ý đến loại thức ăn, tuổi, thể trọng, nhiệt độ môi trường và trạng thái sức khỏe. Do vậy cần được nghiên cứu tiếp để có giá trị chuẩn xác hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Hùng. *Kỹ thuật nuôi Ba ba*
NXB Nông nghiệp 1995
2. Phạm Quốc Hùng (Đại học Thủy sản Nha trang)
Nghiên cứu đặc điểm sinh học Ba ba trong ao nuôi Bình Định - Khánh Hoà (báo cáo tại hội thảo khoa học toàn quốc về nuôi trồng thủy sản 30/09/1998).
3. Bộ Thủy sản - Vụ nghề cá: *Kỹ thuật nuôi Thủy Đặc sản*.
Trung tâm thông tin KHKT và Kinh tế Thủy sản năm 1996
4. Nguyễn Tài Lương -CS 1997 Viện Công nghệ Sinh học - Trung tâm KHTN và Công nghệ Quốc Gia. "*Một số chỉ tiêu sinh lý - Hoá sinh ở Ba ba trong vùng nước ngọt bắc Việt Nam*" Tạp chí Sinh học, Tháng 6/1997.
5. Lưu Thị Dung - *Nghiên cứu một số chỉ tiêu huyết học liên quan đến trạng thái sinh lý của cá trắm cỏ*.
Luận án phó tiến sĩ khoa học Nông nghiệp 1996.
6. Vũ Công Hoà 1976. *Kỹ thuật hiển vi học thông thường*.
NXB Y học Hà Nội.
7. Vũ Kim Cầu - Nguyễn Tài Lương, 1995. *Một số chỉ tiêu sinh lý sinh hoá của ba loài rùa núi ở Việt Nam*.
Tạp chí Sinh học 17 (2). 74-76.

SUMMARY

SOME INDICATIONS OF PELODISCUS SINENSIS'S HAEMATOLOGY.

PHAM DINH LONG

Thai Nguyen Teacher's Training College.

The investigation on the norms of pelodiscus sinensis's haematology shows that erythrocytes are $(0,49 \pm 0,02) \cdot 10^6$ per/mm³ - $(0,52 \pm 0,35) \cdot 10^6$ per/mm³. Leucocytes are from $(4,20 \pm 0,03) \cdot 10^3$ per/mm³ - The biggest is eosinophil leucocyte. The A tup and heterophil are at average size. Basophil leucocyte lymphocyte and monocyte are small. From the norms of our nivation we can decide the conditions of breeding and their health and adjust the optimal regime.

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ KINH NGHIỆM Y HỌC DÂN TỘC TẠO CHẾ PHẨM THỰC PHẨM - THUỐC CHO VẬN ĐỘNG VIÊN.

NGUYỄN TÀI LƯƠNG, NGUYỄN THỊ VINH,
ĐOÀN VIỆT BÌNH, NGUYỄN HUY NAM, NGUYỄN KIM DUNG (1)
DƯƠNG NGHIỆP CHÍ, NGUYỄN NGỌC CÙ, LÊ QUÝ PHƯƠNG (2)

(1) Viện Công nghệ Sinh học

Trung tâm KHTN&CNQG.

(2) Viện Khoa học Thể dục Thể thao.

I. MỞ ĐẦU:

Trong thể thao việc sử dụng các kích tố hoá học tổng hợp đều bị cấm nghiêm ngặt. Nghiên cứu tìm kiếm khai thác các nguồn hoạt chất sinh học với mục đích bổ sung dinh dưỡng cho vận động viên (VDV) đang trở thành một cuộc ganh đua thâm lặng và mang tính bí mật giữa các quốc gia, thậm chí giữa các tỉnh và các bang trong một quốc gia. Điều này dễ hiểu vì nó có liên quan đến số lượng huy chương giành được.

Khi xem các cuộc thi đấu quốc gia và quốc tế, ai cũng thấy là rất cần phải tăng cường thể lực cho các vận động viên Việt nam. Để thực hiện mục đích trên, chúng tôi đã ứng dụng công nghệ sinh học kết hợp với kinh nghiệm y học truyền thống tạo ra một sản phẩm mới từ hải sâm và rần biển. Nguồn tài nguyên sinh học này khá phong phú ở biển Việt nam. Riêng vùng biển Nha trang có thể khai thác 7 tấn rần / năm. Biển Việt nam là kho tài nguyên vô tận về protein và các hoạt chất sinh học. Theo kinh nghiệm y học cổ truyền, hải sâm có tác dụng bổ như nhân sâm nên mới gọi là "sâm biển" / 5,10/. Hải sâm bổ thận, ảnh hưởng tốt lên các chức năng sinh sản, tạo máu và thần kinh /10/. Dịch chiết rần biển về tác dụng dược lý không thua kém dịch chiết rần cạn / 4/. Dịch chiết rần có tác dụng làm tăng trương lực của cơ bắp, gân cốt, kích thích tiêu hoá, tuần hoàn và chữa được bệnh thấp khớp / 5/.

Tuy nhiên, những kinh nghiệm của y học dân tộc và của dân gian hầu như chưa được các công trình nghiên cứu cơ bản soi sáng, chứng minh.

Lần đầu tiên ở Việt nam, phòng thí nghiệm chúng tôi đã tiến hành những nghiên cứu cơ bản phân tích sinh hoá 4 loài hải sâm ăn được (hải sâm trắng-*Holothuria scabra*, hải sâm nâu-*Actynopyga echinites*, hải sâm đỏ- *Holothuria Sp*, hải sâm xanh- *Bohahchia graeffei*) và 4 loài rần biển (đèn) ăn được (đèn cơm- *Lapemis hardwickii Gray*, đèn khoang hay đèn rồng - *Hydrophys cyanocintus*, đèn ghim -*Microcephalophys gracillis*, đèn lục - *Praescula viperina*) đã dẫn tới việc ứng dụng công nghệ enzym chế biến thịt hải sâm và rần biển thành các sản phẩm giàu peptid, axit amin và hoạt chất sinh học / 6,7/. Công nghệ sản xuất các viên nang hải sâm (Hasaton) và rần biển (Rabiton) được tiến hành trên dây chuyền hiện đại của Liên hiệp quốc tại Công ty Dược và các chế phẩm Sinh học BIOPHA tp. Hồ Chí Minh. Các chế phẩm mới này đã được cấp giấy kiểm nghiệm của Viện Kiểm nghiệm Dược liệu, Bộ Y tế.

Tác dụng y sinh học của chế phẩm đã được nghiên cứu kỹ trong các mô hình thực nghiệm trên động vật, nghiên cứu ứng dụng trên lâm sàng tại Bệnh viện Bạch Mai- Hà nội, và cuối cùng ứng dụng trên các VDV thể dục thể thao Việt nam .

Trong bài này trình bày các kết quả ứng dụng trên vận động viên các chế phẩm Hasaton và Rabiton.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng

Đã chọn đội điền kinh 12 người (lứa tuổi 17-21 tuổi), nhóm đối chứng 5 người, nhóm thực nghiệm 7 người. Đội bơi lội 13 người (ở lứa tuổi 12-15 tuổi), nhóm đối chứng 5 người, nhóm thực nghiệm 8 người.

Nhóm thực nghiệm điền kinh uống viên nang Hasaton, nhóm thực nghiệm bơi lội uống viên nang Rabiton. Liều dùng 6 viên / ngày, uống trước bữa ăn 30 phút, liên tục trong 2 tháng. Các đối tượng thực nghiệm đều là các VĐV cấp kiện tướng và cấp quốc gia tập luyện tại Trường Đại học TDTT 1.

Các nhóm đối chứng sử dụng placebo (các viên nang tương tự nhưng bên trong không chứa thực phẩm thuốc).

Nhóm thực nghiệm và nhóm đối chứng đều được nuôi dưỡng, chăm sóc và tập luyện như nhau theo chương trình xen kẽ các bài tập chuyên môn và kỹ thuật, đội điền kinh tập 30 giờ mỗi tuần, xen kẽ các bài tập chuyên môn và kỹ thuật như chạy phát triển sức mạnh thể lực (ưa khí) , phát triển tốc độ (yếm khí) ,sức dẻo dai, sức bền và chạy 600-1000 m (ưa khí). Đội bơi lội tập luyện với km bơi trung bình 200 km/ tháng.

Trước và sau 2 tháng tập luyện ,tiến hành lấy máu và nước tiểu của tất cả các VĐV để phân tích sinh hoá, đồng thời theo dõi các chỉ tiêu tâm lý sự phạm và thành tích của VĐV:

2.2 Phương pháp phân tích:

- WBC, RBC, HGB, Hct, MCV, MCH, PLT ... đo trên máy K-4500
- Testosteron huyết thanh -theo phương pháp miễn dịch enzym, bộ kit chuẩn của hãng Biotech-USA, đo trên máy miễn dịch enzym ELIZA- Multiskan Phần Lan.
- Hoạt tính các enzym LDH , SGOT, SGPT, hàm lượng cholesterol, ure và creatinin huyết, ure và creatinin niệu bằng các bộ kit chuẩn của hãng Biomerieux France.
- Các nguyên tố vi lượng trong máu bằng phương pháp nhiễu xạ huỳnh quang tia X. Xử lý xác suất thống kê nhờ phần mềm AXIL
- Hiệu suất vận động -VO₂ max được xác định bằng máy công năng lực kế Med-graphics, USA và đánh giá các chỉ tiêu sự phạm, thành tích của vận động viên.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

3.1 Các chế phẩm Hasaton và Rabiton có tác dụng hồi phục các chỉ tiêu hồng cầu và Hb đã giảm xuống sau 2 tháng tập luyện:

Nhóm đối chứng: ở VĐV điền kinh nam, hồng cầu giảm 10% (từ $5,32.10^6$ còn $4,81.10^6$ tế bào/ 1 mm^3 máu). Hàm lượng Hb giảm 6,50% (từ 16g% còn 14,95g%) .ở VĐV điền kinh nữ, hồng cầu giảm 4% (từ $4,46.10^6$ còn $4,30.10^6$ tế bào/ 1 mm^3 máu). Hàm lượng huyết sắc tố giảm 3,7% (từ 13,5 g% còn 13g%).Số lượng bạch cầu tăng lên không đáng kể, các chỉ tiêu khác (Hct, MCV, MCH hầu như không thay đổi (bảng NI).

Bảng 1: Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu huyết học ở VĐV điền kinh dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hasaton:

Chỉ tiêu	Nam VĐV		Nữ VĐV	
	Trước 2 tháng	Sau 2 tháng	Trước 2 tháng	Sau 2 tháng
Nhóm đối chứng				
Bạch cầu- WBC ($10^3/mm^3$)	5,70. 10^3	7,1. 10^3	6,93. 10^3	7,30. 10^3
Hồng cầu-RBC ($10^6/mm^3$)	5,32. 10^6	4,81. 10^6	4,46. 10^6	4,30. 10^6
Huyết sắc tố HBG (g%)	16,00	14,95	13,50	13,00
Hematocrit - Hct (L/L)	0,45	0,42	0,39	0,38
MCV (fL)	85,45	88,60	88,30	87,83
MCH (pg)	30,05	31,05	30,27	30,30
Nhóm thực nghiệm với Hasaton.				
Bạch cầu- WBC ($10^3/mm^3$)	5,98. 10^3	6,10. 10^3	6,65. 10^3	5,95. 10^3
Hồng cầu-RBC ($10^6/mm^3$)	4,81. 10^6	5,08. 10^6	4,32. 10^6	4,39. 10^6
Huyết sắc tố HBG (g%)	15,40	15,20	13,25	13,15
Hematocrit Hct (L/L)	0,44	0,43	0,38	0,37
MCV (fl)	88,30	85,90	88,60	87,45
MCH (pg)	26,70	30,12	30,70	30,10

ở nhóm thực nghiệm dùng Hasaton cho thấy bức tranh huyết học được cải thiện rõ rệt. Số lượng hồng cầu không những không bị giảm như lô ĐC, mà còn tăng thêm:

ở nam VĐV, hồng cầu tăng lên 1/4 triệu tế bào trong 1mm³ máu, tương ứng 5,61% (từ 4,81.10⁶ đến 5,08. 10⁶ trong 1 mm³ máu), ở nữ VĐV số lượng hồng cầu tăng lên không đáng kể (từ 4,32.10⁶ đến 4,39.10⁶ trong 1 mm³ máu).

- Hàm lượng huyết sắc tố ở tất cả nam nữ VĐV điền kinh vẫn giữ được mức ổn định vốn có như trước khi bước vào tập luyện (ở nam VĐV- 15,2-15,4 g%, ở nữ VĐV- 13,15-13,25 g%).

- Các chỉ số hematocrit (Hct), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), nồng độ Hb trung bình hồng cầu (MCH), số lượng tiểu cầu (PLT), tỷ lệ bạch cầu trung tính (MXD), tỷ lệ tế bào lympho hầu như không thay đổi đáng kể sau 2 tháng luyện tập.

Các kết quả tương tự cũng nhận được trong thực nghiệm với chế phẩm Rabiton. Ở nam VĐV điền kinh Hb-15,20 g%, nữ VĐV điền kinh-13,15g%, nam VĐV bơi lội Hb-16,0 4g%, nữ VĐV bơi lội 13,80g%). Các giá trị này chính là mức tối ưu Hb để VĐV phát huy năng lực ưa khí tốt nhất trong vận động. Kết quả này có thể giải thích là trong các chế phẩm Hasaton và Rabiton giàu các nguyên liệu tạo máu nguồn gốc hữu cơ (Fe,Zn, Cu), giàu testosterone là yếu tố kích hoạt thận sản xuất erythropoietin (kích tố tạo máu). Các chỉ tiêu Hct, MCV, MCH, WBC vv...hầu như ít thay đổi, giữ được mức vốn có như trước khi bước vào tập luyện.

3.2. Các chế phẩm Hasaton và Rabiton có tác dụng hồi phục và nâng cao hàm lượng testosterone trong máu của VĐV.

Bảng 2: Hàm lượng Testosteron trong máu VĐV dưới ảnh hưởng của chế phẩm Hasaton:

Hàm lượng testosterone	Đơn vị tính	Trước 2 tháng		Sau 2 tháng	
		X	SD	X	SD
Nhóm đối chứng					
Nam VĐV	nmol/l	21,03	0,62	19,15	0,65
Nữ VĐV		1,79	0,21	1,54	0,26
Nhóm thực nghiệm					
Nam VĐV	nmol/l	21,20	0,79	24,92	0,90
Nữ VĐV		1,80	0,06	2,50	0,10

Hàm lượng Testosteron sau 2 tháng ở nhóm ĐC: nam giảm 9,5%, nữ giảm 13%. Sau 2 tháng dùng chế phẩm Hasaton: nam tăng 17%, nữ tăng 38%). Kết quả tương tự nhận được đối với Rabiton. Các kết quả này có thể giải thích là trong các chế phẩm Hasaton và Rabiton có hàm lượng cao testosteron tự nhiên.

3. Các chế phẩm Hasaton và Rabiton có tác dụng làm giảm cholesterol toàn phần phòng ngừa bệnh tim mạch cho VĐV.

Bảng 3 - ảnh hưởng của chế phẩm Hasaton lên hàm lượng cholesterol trong máu VĐV điền kinh.

Chỉ tiêu và đối tượng nghiên cứu	Đơn vị	Trước 2 tháng		Sau 2 tháng	
		X	SD	X	SD
Nhóm đối chứng					
Cholesterol toàn phần	mg/dl				
Nam VĐV		148,50	34,50	178,50	24,50
Nữ VĐV		194,17	42,10	205,67	30,11
Nhóm thực nghiệm					
Nam VĐV	mg/dl	159,00	14,85	142,20	8,33
Nữ VĐV		135,50	34,50	101,00	9,00

Hiệu quả làm giảm cholesterol trong máu của viên nang Hasaton 12-25% (ở nam VĐV giảm từ $211,40 \pm 26,23$ còn $157,40 \pm 3,06$ mg/dl, còn ở nữ VĐV giảm từ $211,67 \pm 13,28$ còn $185 \pm 9,24$ mg/dl / $p < 0,05/$). Kết quả tương tự nhận được trong thực nghiệm đối với viên nang Rabiton: hàm lượng cholesterol giảm xuống hoặc giữ được mức vốn có trước khi bước vào tập luyện). Kết quả này phù hợp với kết quả của Monaxova,1991, Sao.T,1996 : " dùng dịch chiết hải sâm , nhuyễn thể và cá biển bổ sung vào thức ăn cho chuột thực nghiệm, sẽ làm giảm cholesterol huyết thanh một cách có ý nghĩa thống kê".

4. Các chế phẩm Hasaton và Rabiton có tác dụng kích hoạt enzym LDH, duy trì sự ổn định các enzym SGOT,SGPT, hỗ trợ chức năng gan và cơ của VĐV trong quá trình tập luyện.

Nhóm đối chứng dùng placebo , hoạt độ LDH huyết thanh hầu như không đổi hoặc tăng lên không đáng kể - 0,8-2% (có lẽ liên quan đến phản ứng tự vệ, tự điều chỉnh của cơ thể đối với axit lactic). Nhóm thực nghiệm-được dùng Hasaton thì hàm lượng LDH tăng lên 6% ở nam VĐV ($349,60 \pm 8,02$ đến $371 \pm 4,57$ IU/L; Ở nữ VĐV- tăng 7% (từ $269,50 \pm 13,50$ đến 289 ± 10 IU/L). Kết quả tương tự nhận được trong thực nghiệm với Rabiton. Có thể giải thích là trong các chế phẩm có hàm lượng Zn cao, mà những công trình nghiên cứu mới /1/ đã khẳng định rằng Zn có tác dụng kích hoạt enzym LDH trong phản ứng khử axit lactic tạo thành axit piruvic, rất cần thiết đối với VĐV và các đối tượng lao động cơ bắp.

Hoạt độ các enzym SGOT,SGPT liên quan chặt chẽ với trạng thái sức khỏe của cơ thể. Khi các tế bào trong gan, tim,cơ và của các nội quan bị thương tổn , thì các enzym này được giải phóng vào máu, vì vậy trong y tế, các bác sỹ căn cứ vào hoạt độ các enzym này để chẩn đoán lâm sàng, đặc biệt là các bệnh viêm gan, viêm tụy cấp, nhồi máu cơ tim....

Trong thực nghiệm, các VĐV sau 2 tháng dùng chế phẩm Hasaton và Rabiton, hoạt tính SGOT, SGPT không tăng mà dao động trong giới hạn vốn có giống như trước khi bước vào tập luyện, (trong khi đó ở nhóm đối chứng hoạt độ các enzym này tăng 6-11%). Như vậy các chế phẩm Hasaton và Rabiton có tác dụng bảo vệ màng tế bào, hỗ trợ chức năng gan, tim của VĐV trong tập luyện và thi đấu.

IV. KẾT LUẬN

1. Các viên nang Hasaton và Rabiton có tác dụng rõ rệt hồi phục (thậm chí hồi phục vượt mức) các chỉ tiêu hồng cầu, huyết sắc tố, testosterone, làm tăng khả năng hấp thụ ôxy, tăng các vi chất dinh dưỡng (Fe,Cu,Zn) trong máu VĐV.

2. Các viên nang Hasaton và Rabiton có tác dụng rõ rệt làm giảm cholesterol toàn phần, do đó phòng ngừa các bệnh tim mạch cho VĐV.

3. Dưới ảnh hưởng của các chế phẩm Hasaton và Rabiton, hoạt tính các enzym SGOT, SGPT không tăng mà giữ được mức ổn định vốn có như trước khi bước vào tập luyện, hoạt tính enzym LDH được kích hoạt so với đối chứng.

SUMMARY

APPLICATION BIOTECHNOLOGY AND TRADITIONAL MEDICAL EXPERIENCE TO PRODUCE MEDICINE-FOOD FOR SPORTSMEN

NGUYEN TAI LUONG ET AL.

Institute of Biotechnology, NCST, Vietnam

The application of biotechnology in combination with traditional medical experience, exploiting natural biological active substances to produce medicine-food for sportsmen is an interesting research and an advantage of Vietnam as well as Asian countries.

For this purpose, we tried to apply enzyme technology and traditional medical experience to create a new product using sea cucumber and sea snake, which we can find a lot in Vietnam sea. We discovered that there is a high content of non-replaceable amino acid (lysine, proline), of microelements (iron, zinc, selenium), and of hormone steroid (testosterone, progesterone) in sea cucumber and especially in sea snake meat.

The technology to produce sea cucumber capsule (called Hasaton) and sea snake capsule (called Rabiton) are produced at Biopha Company, Ho Chi Minh City.

The result of experimental research on sportsmen:

The experimental group of athletic (12 persons) used Hasaton; the experimental group of swimmer (13 persons) used Rabiton. Dosage is 6 capsules / person/ day, continuously in 2 months, taking before meal 30 minutes. The controlled group used the placebo (similar capsules without the right medicine inside). Both groups had exactly the same training exercises as usual. Before and after 2 months of using the product, all the biochemical, physiological data and the results of the sportsmen were recorded. From the data and analysis, we concluded:

1. Hasaton and Rabiton capsules are effective for recovering (even exceeding) the RBC standard, HBG, testosterone, reinforce oxygen absorption ability, increase microelements in the blood of sportsmen.

2. Hasaton and Rabiton capsules are effective for reducing total cholesterol, for increasing LDH, but are not effective to SGOT, SGPT activities.

3. Hasaton and Rabiton capsules can improve psychological indexes and the nerve response gets better. The result on sport training of the experimented group is better than that of the controlled group.

4. Hasaton and Rabiton is safe to use, they have no side effect. Some sportsmen of Vietnam have used them in recent international competition and became medallists.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. **Henry C Lukaski, Bonita S.H, Sandra K.G, William W B, 1992-** Physical training and copper,iron, and zinc status of swimmers. J.Sport.Med, 1996.
2. **Higuchi R, Inagaki M, Togawa K, Miyamoto T,Komori T,1998-** Constituents of holothuroidea IV : Isol. and structure of three new cerebrosides, CE-2b, Ce-2c CE-2d from the sea cucumber *Cucumaria echinata*. / Liebig's Annalen der Chemie, Coden LACHDL, DEU.,ISSN 0170-2041, DA, 1994,N 1, 79-81./.
3. **Jayle M.F et al. 1961-** Analyse des Steroides hormonaux.1961,32.
4. **Đình ngọc Lâm, Đặng Hồng Vân, Nguyễn Khánh Thành,1985-** Hương, nai, rắn và các chế phẩm dùng trong y học. Nhà xuất bản y học.Hà nội, 1985.
5. **Đỗ Tất Lợi ,1991-** Cây thuốc và vị thuốc Việt nam . Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà nội 1125-1126.
6. **Nguyễn Tài Lương,Nguyễn thị Vĩnh ,Đoàn Việt Bình, Đỗ Văn Thu,1996-** Hải sâm (Holothuroidea) nguồn thực phẩm giàu hoạt chất sinh học- thuốc bổ, thuốc chữa bệnh . Kỷ yếu, Annual report,1996,Viện Công nghệ sinh học. NXB khoa học và kỹ thuật,Hà nội,1996 , 254-258.
7. **Nguyễn Tài Lương ,1998 -** Study on the value of alicament for holothuria (*Holothuroidea*) in Nha trang sea coast of the Vietnam . Vietnam-India seminar of Biotechnology. Hanoi, 1998.
8. **Rodriguez J, Riguera R, 1998-** Lefevreiosides: four novel triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Cucumaria lefevrei*. J. of chemical research. Synopses,Coden JRPSDC;GBR ISSN 0308-2342, DA,1989, N 11,pp 342-343.
9. **Tsushima M, Fujiwara Y, Matsuno T. 1998-** Novel marine di-Z-carotenoids: Cucumariaxanthins A,B,C from the sea cucumber *Cucumaria Japonica*. J.of natural products. Coden JNPRDF,USA.ISSN,DA, 1996, Vol 59,pp 30-34.
10. **Bùi Kim Tùng , 1997.** Món ăn bài thuốc. Sở KHCNMT Tỉnh Bà Rịa, Vũng Tàu, quyển N1, tr. 56;77. 1997.

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH NẢY MẦM CỦA GẠO LẬT †

LÊ THANH MAI⁽¹⁾, NGUYỄN KIM VŨ⁽²⁾ & PHẠM VĂN ĐIỀN⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Bách khoa Hà nội

(2) Viện Công Nghệ sau thu hoạch

I - MỞ ĐẦU

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu về quá trình nảy mầm của đại mạch hoặc của gạo... Trong quá trình nảy mầm, cùng với các biến đổi sinh lý, sinh hóa trong hạt là sự hình thành và tăng nhanh lượng cũng như hoạt độ enzym, ngoài ra còn có hàng loạt các chất có hoạt tính sinh học được tạo thành, trong đó có nhiều loại vitamin cần thiết cho cơ thể, đặc biệt là vitamin E [4]. Đại mạch nảy mầm là nguyên liệu chính dùng để sản xuất bia, còn thóc nảy mầm dùng trong sản xuất đường nha. Khi sử dụng malt đại mạch hoặc thóc nảy mầm làm nguồn enzym để bổ xung vào bột gạo hoặc bột nếp để tăng giá trị dinh dưỡng thì gặp rất nhiều khó khăn do không tách được hoàn toàn vỏ trấu.

Hạt thóc sau khi bóc vỏ trấu ta được gạo lật. Gạo lật có ưu điểm rõ rệt như lớp cám trong gạo lật có nhiều chất béo và các vitamin, đặc biệt là có chất oryzanol là chất chống viêm loét dạ dày vì thế gạo lật từ trước đến nay là nguồn dược liệu quý mà nhân dân ta thường sử dụng. Cho đến nay chúng tôi chưa tìm thấy công bố nào về nghiên cứu quá trình nảy mầm từ các hạt gạo lật. Từ ý nghĩa ứng dụng rất lớn của malt gạo, chúng tôi đã nghiên cứu quá trình nảy mầm của gạo CR203 và nếp cẩm và xác định sơ bộ khả năng dịch hoá của các loại gạo nảy mầm trên.

II - NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu:

- Thóc CR203 mua từ công ty cây trồng trung ương và thóc nếp cẩm của Hòa bình mua tại chợ Hà nội. Tách vỏ trấu trên máy xay mầu starke để thu gạo lật.

- Malt đại mạch của Pháp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Xác định độ ẩm theo phương pháp sấy khô đến trọng lượng không đổi
 - Xác định hàm lượng tinh bột theo phương pháp thuỷ phân bằng axit HCl
 - Xác định hàm lượng các chất hòa tan bằng chiết quang kế
 - Xác định hàm lượng đường theo phương pháp Lain-Aynon hoặc bằng máy sắc ký lỏng cao áp (HPCL của Viện CN Thực phẩm)
 - Xác định độ hoạt lực diastaza (DC) theo phương pháp năng lực đường hoá
 - Xác định hoạt lực amilaza (AC) bằng máy so mầu
 - Xác định năng lực nảy mầm theo phương pháp EBC
 - Xác định hoạt lực proteaza theo phương pháp Anson cải tiến.
 - Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Kjeldald
 - Xác định axitamin theo phương pháp Lowry
 - Xác định chất béo bằng máy chiết Soxlet
- Xác định thời gian chảy của dịch cháo: bột gạo (không hoặc có bổ sung thêm malt gạo lật) trộn với nước theo tỷ lệ 1:10, sau đó nâng nhiệt độ lên từ từ và dừng ở mỗi khoảng 50 ÷ 52°C; 62 ÷ 65°C; 70 ÷ 75°C trong 15 phút rồi đun tới sôi. Để nguội xuống 70°C rồi đo thời gian chảy của dịch qua pipet 10ml có đường kính lỗ 2,5mm.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Xác định một số chỉ tiêu của thóc và gạo lật:

Để đánh giá chất lượng hạt thóc và gạo trước khi ngâm và ương mầm, một số chỉ tiêu cơ bản đã được xác định (bảng 1).

Bảng 1 : Một số chỉ số của thóc và gạo lật

Nguyên liệu	Nếp cẩm	CR203
Chỉ số		
Thóc :		
Độ ẩm, %	13,0	13,5
Hàm lượng trấu, %	18,4	20,0
Năng lực nảy mầm, %	97,0	97,5
Gạo lật :		
Độ ẩm, %	13,3	14,0
Hàm lượng cám, %	12,4	12,5
Hàm lượng tinh bột, %	74,0	76,5
Hàm lượng đường, %	1,3	0,8
Hàm lượng protein, %	8,2	7,6
Hàm lượng axitamin, mg/g	0,5	0,4
Hàm lượng chất béo, %	1,5	1,1
Năng lực nảy mầm, %	94,0	91,8

Kết quả cho thấy các hạt thóc giống đều có khả năng nảy mầm cao, hàm lượng trấu của hạt thóc CR203 lớn hơn của nếp cẩm. Gạo nếp cẩm có hàm lượng protein và chất béo lớn hơn nhưng hàm lượng tinh bột lại nhỏ hơn một ít so với gạo CR203. Hàm lượng axit amin của 2 loại gạo là như nhau. Khả năng nảy mầm của hạt gạo lật tuy thấp hơn thóc nhưng không đáng kể, chứng tỏ gạo lật có thể nảy mầm khi không còn vỏ trấu. Qua thực nghiệm nhận thấy rằng chỉ có những hạt gạo lật bị hỏng phôi hoặc những hạt gãy không còn phôi mới mất khả năng nảy mầm.

2. Nghiên cứu quá trình sản xuất malt gạo lật :

Quá trình tạo malt gạo được thực hiện theo 3 công đoạn : ngâm, nảy mầm và sấy.

a - Sự thay đổi độ ẩm của gạo theo nhiệt độ và thời gian ngâm :

Gạo lật được ngâm theo phương pháp thủ công trong các khay và trong tủ ẩm. Hạt gạo được ngâm ngập trong nước 1-2 cm, có thông thoáng khí 3 giờ 1 lần và cứ 4 giờ lấy mẫu một lần để xác định độ ẩm hạt. Dựa vào các kết quả nghiên cứu trước đây [1 & 2], chúng tôi chọn nhiệt độ thích hợp để ngâm là 25 và 30°C.

Bảng 2 : Sự thay đổi độ ẩm của gạo theo thời gian và nhiệt độ

Thời gian, h	T° ngâm, °C		Độ ẩm, %	
			25	30
	Nếp cẩm	CR203	Nếp cẩm	CR203
0	13,3	14,0	13,3	14,0
4	22,0	22,0	24,0	24,0
8	27,0	27,5	30,0	30,0
12	31,6	32,0	35,0	35,5
16	35,0	35,4	38,5	39,0
20	38,0	38,5	41,0	41,5
24	39,8	40,6	42,0	42,5
28	41,2	41,5	42,0	42,2
30	41,5	42,0	42,0	42,2
32	41,5		42,0	

Bảng 2 cho thấy nhiệt độ càng cao thì thời gian để hạt đạt độ ẩm bão hòa càng ngắn. Trong 4 h đầu, gạo hút nước rất nhanh, độ ẩm tăng từ 13 lên đến 22 - 24 %, sau đó tốc độ hút nước có giảm dần và đạt tới độ ẩm bão hòa sau 28 h nếu ngâm ở nhiệt độ 25°C hoặc 24 h nếu ngâm ở nhiệt độ 30°C. Như vậy gạo lật sau khi ngâm có độ ẩm bão hòa trong khoảng 41 ÷ 43 %, tương tự như thóc [1, 2]. Ngoài ra, do mất lớp vỏ trấu bảo vệ cho nên khi ngâm, các chất dinh dưỡng ở lớp cám rất dễ hòa tan vào nước làm cho khả năng nhiễm tạp khuẩn cao, vì vậy khi ngâm ở nhiệt độ cao cần chú ý sự nhiễm khuẩn.

b - Nghiên cứu sự tích tụ enzym trong quá trình nảy mầm của gạo lật:

Gạo sau khi đã ngâm đã đạt độ ẩm thích hợp thì được đưa đi ươm mầm trong các khay có lỗ thoáng, độ dày lớp hạt 3 - 4cm. Thường xuyên đảo trộn để đảm bảo thông khí và cứ 3 - 4 giờ tưới nước cho khối hạt 1 lần để giảm nhiệt độ cho khối hạt do hô hấp tăng lên và đảm bảo độ ẩm tối thích cho hạt. Trong thời gian nảy mầm cứ 24 giờ xác định hoạt lực các enzym trong hạt một lần (bảng 3).

Bảng 3 : Sự thay đổi hoạt lực Enzim của hạt gạo lật trong quá trình nảy mầm

Hoạt lực enzym	Nguyên liệu	Nếp cẩm				CR203			
	T' nảy mầm, °C	25		30		25		30	
	T' ngâm, °C	25	30	25	30	25	30	25	30
Amilaza đv/g	τ nảy mầm, h								
	0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,02	0,02	0,02	0,02
	24	0,3	0,4	0,6	0,8	0,2	0,2	0,4	0,5
	48	1,2	1,4	2,2	2,5	1,0	1,0	1,6	1,9
	60			3,5	3,8			3,0	3,3
	72	2,8	3,0	4,2	4,3	2,7	2,8	3,9	4,0
	78			4,4	4,2			4,1	3,9
	84	4,0	4,2	4,3	4,1	3,7	3,8	3,9	3,8
	96	4,5	4,6	4,1	3,9	4,3	4,3	3,8	3,6
	102	4,7	4,5			4,4	4,2		
	108	4,6	4,4			4,3	3,8		
120	4,4	4,1			4,1				
Diastaza, (mg maltoza/g)	0	4	4	4	4	2	2	2	2
	24	25	29	33	35	17	24	25	28
	48	41	43	50	68	30	35	48	63
	60			75	85			71	79
	72	75	78	90	93	65	74	83	86
	78			96	92			89	85
	84	90	92	94	90	85	87	85	83
	96	97	98	88	83	93	91	80	77
	102	102	97			95	88		
	108	100	95			93	84		
	120	91	89			87			
Proteaza đv/g	24	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4
	48	1,0	1,2	1,1	1,3	0,9	1,1	1,0	1,2
	60			1,9	2,0			1,8	2,0
	66			2,1	2,3			2,0	2,2
	72	2,1	2,2	2,3	2,2	2,0	2,2	2,2	2,1
	84	2,3	2,4	2,1	2,0	2,2	2,4	2,0	1,9
	90	2,5	2,3			2,4	2,3		
	96	2,4	2,2	1,9	1,8	2,3	2,1	1,8	1,7
	108	2,1				2,0			

Kết quả cho thấy ngay khi chưa nảy mầm thì hoạt lực amilaza của nếp cẩm đã lớn hơn hẳn CR203. Khi ngâm và cho nảy mầm ở cùng một nhiệt độ thì gạo nếp cẩm vẫn luôn có các hoạt lực enzym lớn hơn so với gạo CR203. Với cả 2 loại gạo này, nếu ngâm ở nhiệt độ 25 hay 30°C và nảy mầm ở nhiệt độ 25°C thì hoạt lực amilaza đạt cực đại sau 96 - 102 giờ, còn khi nảy mầm ở 30°C hoạt lực amilaza đạt cực đại sớm hơn khoảng 24 giờ tức sau 72 - 78 giờ. Hoạt lực amilaza khi ngâm và ương mầm ở các nhiệt độ khác nhau thì đạt giá trị cực đại khác nhau. Nếu cùng nhiệt độ ngâm, hạt nảy mầm ở 25°C có hoạt lực enzym cao hơn nảy mầm ở 30°C, còn khi cùng nhiệt độ nảy mầm, hạt ngâm ở 25°C cũng cho hoạt lực cao hơn ngâm ở 30°C. Tuy nhiên khi ngâm ở các nhiệt độ khác nhau, sự chênh lệch hoạt lực enzym là không đáng kể so với khi nảy mầm ở các nhiệt độ khác nhau.

Cũng như amilaza, hoạt lực diastaza khi ngâm và ương ở 25°C lớn hơn khi thực hiện ở 30°C và thời gian đạt hoạt lực cực đại khi ương ở 25°C chậm hơn ở 30°C là 24 giờ. Còn đối với hoạt lực proteaza, khi ương ở 25°C đạt cực đại sau 66 ÷ 72 giờ, và giá trị thu được lớn hơn so với khi ương ở 30°C. Nhiệt độ ngâm không có ảnh hưởng rõ rệt tới hoạt lực enzym này.

Theo kinh nghiệm chúng tôi nhận thấy rằng, hoạt lực amilaza và diastaza đạt cực đại khi độ dài mầm bằng 3/4 độ dài hạt và rễ bằng 1,5 lần chiều dài hạt. Nếu để mầm và rễ tiếp tục phát triển thì hoạt lực enzym trong hạt giảm, tiêu hao nhiều chất khô. Do đó cần kết thúc quá trình ương mầm đúng lúc và đưa đi sấy ngay.

c- Nghiên cứu các biến đổi trong quá trình sấy malt gạo :

Gạo lật sau khi nảy mầm thì mang sấy khô để cố định không cho chúng phát triển tiếp đồng thời tạo thuận lợi cho quá trình bảo quản mà vẫn giữ được hoạt tính của các enzym.

Gạo đã nảy mầm được trải mỏng trên mặt sàng sấy, nâng nhiệt độ từ sấy từ từ sao cho sau 6 giờ đầu nhiệt độ chỉ đạt 40°C và độ ẩm hạ xuống còn 15 ÷ 16%. Trong 6 giờ tiếp theo, nâng dần nhiệt độ lên 50°C và độ ẩm hạ xuống còn 8 ÷ 10%, rồi lại tiếp tục nâng nhiệt độ lên 70 ÷ 75°C và sấy cho tới khi độ ẩm hạt còn 4 ÷ 4,5%. Quá trình sấy kết thúc sau 24 giờ và được đem đi tách mầm và rễ ngay vì để lâu sẽ hút ẩm và trở nên dai khó tách. Chúng tôi so sánh hoạt lực enzym trước và sau khi sấy (bảng 4).

Bảng 4 : Sự thay đổi hoạt lực enzym trước và sau quá trình sấy

enzim \ Nguyên liệu	Nếp cẩm		CR203	
	Trước sấy	Sau sấy	Trước sấy	Sau sấy
Amilaza	4,7	4,2	4,4	3,9
Diastaza	102	90,8	95	84,5
Proteaza	2,5	2,3	2,4	2,2

Kết quả cho thấy, sau khi sấy hoạt lực của cả 3 loại enzym đều có giảm đi nhưng không đáng kể, nhỏ hơn 10 %.

Trong giai đoạn ngâm, ương mầm và có thể cả trong thời kỳ đầu quá trình sấy, các enzym được tạo thành và hoạt động mạnh mẽ, chúng có thể làm biến đổi thành phần và cấu trúc hạt nảy mầm [3 & 5]. Chúng tôi đã xác định một vài thành phần chính và so sánh với gạo lật trước khi mang đi ngâm (bảng 5).

Qua quá trình nảy mầm, hàm lượng protein, tinh bột, chất béo trong hạt đều giảm, nhưng giảm nhiều nhất là tinh bột 10 ÷ 12%. Hàm lượng đường, axitamin tăng lên nhiều, đó là nhờ hoạt động của hệ enzym amilaza và proteaza. Như vậy qua quá trình nảy mầm, các chất cao phân tử trong gạo lật giảm nhưng hàm lượng các chất hòa tan lại tăng đồng thời hoạt lực của cả 3 loại enzym cũng tăng một cách đáng kể, đó chính là mục đích của quá trình nảy mầm.

Bảng 5 : Sự thay đổi một số thành phần trong gạo lật nảy mầm

Nguyên liệu	Nếp cẩm		CR203	
	Trước khi ngâm	Sau nảy mầm và sấy	Trước khi ngâm	Sau nảy mầm và sấy
Thành phần				
Độ ẩm, %	13,3	4	14	4
Tinh bột, %	74	65	76,5	68,2
Đường tổng, %	1,3	6,6	0,8	5,7
Protein, %	8,2	7,7	7,6	6,9
Chất béo, %	1,5	0,9	1,1	0,4
Axit amin, mg/kg	0,5	9,1	0,4	8,3

d - So sánh hoạt lực enzym của malt thóc, malt gạo và malt đại mạch:

Để hiểu rõ hơn hoạt lực các enzym của gạo lật nảy mầm đạt ở mức nào, chúng tôi đã xác định hoạt lực các enzym trong malt đại mạch và malt thóc và so sánh (bảng 6).

Bảng 6. So sánh hoạt lực các enzym trong malt đại mạch, thóc và gạo

Nguyên liệu	Enzim	Amilaza	Diastaza	Proteaza
Malt đại mạch		10,6	217	2,8
Malt thóc nếp cẩm		5,7	125	3,9
Malt thóc CR203		5,5	115	3,7
Malt gạo lật nếp cẩm		4,7	102	2,5
Malt gạo lật CR203		4,4	95	2,4

Kết quả cho thấy rằng malt đại mạch có hoạt lực amilaza và diastaza lớn gấp 2 lần so với malt thóc và malt gạo lật, có nghĩa là malt đại mạch có khả năng đường hóa mạnh hơn malt thóc và malt gạo. Còn hoạt lực proteaza của malt đại mạch thì nhỏ hơn malt thóc nhưng lớn hơn malt gạo. Trong gạo lật nảy mầm hoạt lực các enzym đều nhỏ hơn so với malt thóc một ít, hoạt lực amilaza và diastaza của malt gạo bằng khoảng 80%, proteaza khoảng 65%. So với malt đại mạch, amilaza trong gạo lật nảy mầm chỉ bằng 40 ÷ 45%, còn proteaza thì xấp xỉ. Như vậy chúng tỏ gạo lật có khả năng nảy mầm và tích tụ enzym với hàm lượng không đến nổi thấp lắm so với malt thóc.

3. Nghiên cứu sơ bộ khả năng dịch hóa của gạo lật nảy mầm:

Gạo lật nảy mầm có nhiều enzym tích tụ đặc biệt là enzym amilaza. Vì vậy nếu bổ sung bột gạo lật nảy mầm vào dịch cháo thì chúng có tác dụng thủy phân các chất cao phân tử như tinh bột, protein... thành các chất có phân tử lượng thấp hơn dễ hòa tan, dễ tiêu hóa và làm cho độ nhớt của dịch cháo giảm đi rất nhiều.

Để xác định khả năng này của malt gạo lật, ta tiến hành xác định độ nhớt của dịch cháo (thể hiện bằng thời gian chảy của dịch cháo) và hàm lượng đường khử (gồm glucoza, maltoza và fructoza). Kết quả được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7 : Ảnh hưởng malt gạo lật lên khả năng dịch hoá và đường hoá của dịch cháo

Hàm lượng malt gạo, %	Thời gian chảy của dịch cháo	Hàm lượng đường khử có trong dịch cháo, g/l
0	7'30"	24,0
5	10"	-
10	6"	86,3
15	5"	-

Kết quả cho thấy chỉ cần phối trộn 5% bột gạo lật nảy mầm vào bột gạo đã làm cho độ nhớt của dịch cháo giảm đi rất nhiều (thời gian chảy của dịch bột giảm từ 7'30" xuống 10"). Như vậy với các tỷ lệ malt gạo bằng hoặc lớn hơn 5 % sẽ thu được dịch cháo ở dạng lỏng, rất dễ chảy và khả năng hấp thụ dễ dàng. Khi bổ sung 10% bột gạo lật nảy mầm vào dịch cháo thì hàm lượng đường (phân tích trên máy sắc ký khí lỏng cao áp) tăng lên khoảng 3,5 lần. Điều này chứng tỏ các enzym amilaza và diastaza đã tham gia tích cực vào quá trình thủy phân tinh bột.

IV -KẾT LUẬN

Gạo lật (thóc đã tách vỏ trấu) hoàn toàn có khả năng nảy mầm nếu như phôi vẫn còn. Thời gian ngâm để đạt độ ẩm bão hoà của gạo lật CR203 và nếp cẩm là 28 h ở nhiệt độ 25°C hoặc 24 h ở nhiệt độ 30°C, còn thời gian nảy mầm để đạt hoạt lực amilaza và diastaza cực đại là 96 - 102 giờ nếu nảy mầm ở nhiệt độ 25°C hoặc 72 - 78 giờ nếu nảy mầm ở nhiệt độ 30°C.

Hoạt lực các enzym trong gạo lật nảy mầm đặc biệt là hệ enzym amilaza không thua kém nhiều so với thóc nảy mầm. Chỉ cần bổ sung 5 % bột gạo lật nảy mầm vào dịch cháo thì chúng dịch hóa và đường hóa rất tốt, làm giảm đáng kể độ nhớt và tăng lượng đường khử trong dịch cháo.

SUMMARY

A STUDY ON THE PROCESS OF GERMINATION OF UNDER-MILLED RICE

The under-milled rice (dehusked rice) can be certainly germinated whenever the embryo is still available. The steeping time needed to reach the saturated humidity of dehusked rice of CR203 and Cam glutinos rice varieties is 28 hours or 24 hours at either 25°C or 30°C respectively. Meanwhile, the necessary time for germinating to reach maximum amilase and diastase response is as long as 96-102 hours when germinating at 25°C, or 72-78 hours when germinating at 30°C. The enzyme activities in undermilled rice, especially the amilase enzyme activity is found almost similar to that of germinated rice. Only by adding 5% of germinated undermilled rice flour into the rice gruel solution, could the solubility and the saccharozed process be improved; as well as the viscosity reduced and the reducing-sugar amount in the rice gruel solution increased.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quán Lê Hà. Nghiên cứu đặc tính hệ enzym có trong malt thóc và ứng dụng trong sản xuất bia. Luận văn cao học - Trường Đại học bách khoa Hà Nội - 1993.
2. Trương Thị Thuý. Nghiên cứu điều kiện tối ưu tới quá trình tạo enzym từ hạt thóc nảy mầm của Việt nam và ứng dụng trong sản xuất bia.. Luận văn cao học - Trường Đại học bách khoa Hà Nội - 1996.
3. Malleshi N.G, Desikacha H.S.R. Studies on coparative malting characteristics of some tropical cereals and millets. J.Inst. Breu. N.2 – 1986.
4. Fraser J. Thomson. Technical Malting with Canadian barley. Sixth International Malt and Malting Barley Program. Canada, 1997.
5. Liu. D.J. Temperature and grain weight effects on the inhibition and amylase activity of caryopsis and seeding growth in rice chemical. Abs. 170351 x VII0, 1988.

TÁCH SẠCH α - AMYLAZA CHỊU NHIỆT TỪ CHŨNG VI KHUẨN 3BT2 VÀ BS168M[PHV33BLAMY.BSPR]

TRẦN ĐÌNH MẮN⁽¹⁾, LƯƠNG ĐỨC PHẨM⁽¹⁾

LÊ VĂN NHƯƠNG⁽²⁾

⁽¹⁾– Viện Công nghệ Sinh Học, TTKHTN & CN Quốc gia

⁽²⁾– Viện CNSH&Thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội

I. MỞ ĐẦU

Alpha- amylaza được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực sản xuất như công nghiệp thực phẩm, công nghiệp dệt... Sản xuất α - amylaza công nghiệp đã được chú ý từ rất lâu và ngày càng phát triển ở nhiều nước trên thế giới [2, 4, 6, 7, 8, 9]. Việc tạo ra các chủng mang gen α - amylaza tái tổ hợp đã mở ra triển vọng rất lớn cho lĩnh vực sản xuất này [5,11,12]. Các chủng tái tổ hợp sinh tổng hợp α - amylaza rất cao, vì vậy rất thuận tiện cho việc tách sạch dùng cho các mục đích nghiên cứu [3,10]. Alpha- amylaza sạch được sử dụng để nghiên cứu tính chất, cấu trúc phân tử và làm sạch ADN khỏi glycogen của tế bào nấm men trong sinh học phân tử.

Trong bài này chúng tôi trình bày phương pháp tách sạch α - amylaza chịu nhiệt của chủng vi khuẩn 3BT2 và chủng tái tổ hợp Bs168M[pHV33 BLAmy.Bspr].

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu:

Vi sinh vật: chủng 3BT2 và tái tổ hợp Bs168M[pHV33 BLAm.Bspr] từ bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ lên men, Viện CNSH, TTKHTN&CNQG.

Hoá chất: DNSA, CMC, acrylamit, bis acrylamit, SDS... của hãng Merck (Đức).

2.2. Phương pháp:

- Thu nhận α - amylaza:
 - Chủng 3BT2 nuôi lác trên môi trường Zobell ở 45°C, 48h.
 - Chủng tái tổ hợp Bs168M[pHV33 BLAmy.Bspr] nuôi lác trên môi trường LBPG 60 h ở 37°C.
 - Dịch ly tâm môi trường lên men vi sinh vật được sử dụng như là enzym thô. Nhiệt độ và pH tối ưu của α - amylaza đã được xác định ở công bố trước đây [1].
- Kết tủa phân đoạn: bằng etanol ở nồng độ 45, 70 và 75%.
- Xử lý nhiệt: dịch protein enzym được bổ sung CaCl₂ 5 mM và xử lý ở 70°C; lấy mẫu theo thời gian; xác định protein và α - amylaza.
- Điện di protein: được thực hiện trên gel polyacrylamit sodium dodecyl sulphat (SDS - PAGE) 10% [8,10].
- Alpha- amylaza được xác định theo Bernfeld (1955): một đơn vị hoạt độ của α - amylaza là lượng enzym cần thiết để thủy phân tinh bột tạo thành 1 μ M đường (tính theo glucoza) ở 70°C pH 6,5 trong 1 phút.
- Protein xác định theo Bradford (1976).
- Sắc ký protein trên cột CMC: dung dịch protein khoảng 100 mg được đưa vào cột CMC có

kích thước 2,5×30 cm đã được cân bằng bởi đệm axetat 0,02 M. Sau khi rửa cột bằng 5 lần thể tích bởi đệm trên, protein được thổi ra khỏi cột với gradien nồng độ NaCl từ 0 ÷ 1 M. Thu mẫu 5 ml ở tốc độ 40 m/giờ. Mẫu được kết tủa bằng etanol 70% ở 4°C qua đêm. Protein kết tủa được hoà bằng đệm axetat 0,1 M. Xác định hoạt tính α -amylaza và hàm lượng protein.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết tủa phân đoạn protein bằng etanol

Dịch enzym thô được kết tủa phân đoạn ở các nồng độ etanol 45, 70 và 75% thể tích. Phần cặn thu được sau khi ly tâm được hoà tan bằng dung dịch đệm natri axetat 0,1 M có thể tích bằng đúng thể tích dịch ban đầu. Nồng độ protein và hoạt độ α -amylaza trong dung dịch đệm được coi là tương đương với nồng độ protein bị kết tủa khỏi dung dịch thô. Vì kết tủa bằng etanol nên không thể xác định nồng độ protein và hoạt độ α -amylaza của dịch ly tâm. Các đại lượng này được tính bằng hiệu số giữa giá trị ban đầu và giá trị tương ứng trong dịch hoà tan của protein kết tủa. Kết quả nghiên cứu phân đoạn protein được trình bày ở bảng 1 và 2.

Bảng 1. Lượng protein và hoạt độ α -amylaza của các phân đoạn kết tủa bằng etanol 10 ml dịch lên men chủng 3BT2

Nồng độ etanol, %	Dịch ly tâm			Kết tủa		
	Protein, μg	α -amylaza, đv	Hoạt độ riêng, đv/mg	Protein, μg	α -amylaza, đv	Hoạt độ riêng, đv/mg
0	7350	199	27,3	-	-	-
45	3215	194	60,3	2485	5	2,0
70	1576	17	10,8	1639	177	107,9
80	321	-	-	1255	15	11,9

Bảng 2. Lượng protein và hoạt độ α -amylaza của các phân đoạn kết tủa bằng etanol

10 ml dịch lên men chủng Bs168M[pHV33.BLAmy.Bspr]

Nồng độ etanol, %	Dịch ly tâm			Kết tủa		
	Protein, μg	α -amylaza, đv	Hoạt độ riêng đv/mg	Protein, μg	α -amylaza, đv	Hoạt độ riêng đv/mg
0	8254	1100	133,2	-	-	-
45	4715	1076	228,2	3539	24	6,7
70	1235	32	25,9	3480	1044	302,6
75	478	-	-	757	25	33

Từ kết quả ở bảng 1 và 2 cho thấy α -amylaza được phân đoạn chủ yếu ở nồng độ etanol 70%; hoạt lực riêng của α -amylaza tăng lên từ 2,3 đến 3,9 lần. Phương pháp kết tủa phân đoạn được các tác giả khác sử dụng rất nhiều để làm sạch enzym. Trong nghiên cứu của các tác giả khác thường sử dụng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ làm tác nhân kết tủa, nên khi protein thu được phải loại muối qua màng bán thấm. Do ở Việt Nam sử dụng màng bán thấm với số lượng lớn là rất tốn kém, nên sử dụng phương pháp kết tủa bằng etanol tiết kiệm hơn và phù hợp vì α -amylaza của chủng 3BT2 qua các lần kết tủa thử cho thấy không bị bất hoạt bởi etanol. Phần lớn các protein trọng lượng phân tử thấp được làm sạch bằng phương pháp này.

3.2. Xử lý nhiệt để làm sạch α -amylaza

Dịch enzym trong đệm axetat natri 0,1M thu được ở phân đoạn kết tủa 70% etanol ở trên được sử dụng để làm sạch bằng xử lý nhiệt. Để cho α -amylaza không bị biến tính bởi nhiệt độ xử lý dịch enzym được bổ xung CaCl_2 ở nồng độ 5mM. Xử lý ở 70°C và lấy mẫu theo thời gian ly tâm bỏ cặn protein kết tủa. Xác định nồng độ protein và hoạt độ α -amylaza ở dịch xử lý. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Qua kết quả ở bảng 3 cho thấy sử dụng phương pháp xử lý nhiệt là rất hữu hiệu đối với α -amylaza chịu nhiệt. Phần lớn các protein kém bền nhiệt được loại ra ở bước này. Thời gian xử lý nhiệt phù hợp là từ 1 đến 2 giờ. Mức độ xử lý nhiệt như đã nêu ở trên hoàn toàn không ảnh hưởng đến hoạt tính của α -amylaza. Hoạt độ riêng của α -amylaza tăng lên khoảng 3 lần so với trước khi xử lý. Kết quả thu được cũng tương tự như nghiên cứu của nhiều tác giả khác đối với enzym chịu nhiệt [2, 4, 6, 8, 9].

Bảng 3. Nồng độ protein và hoạt độ α -amylaza của 5ml dịch enzym xử lý ở 70°C

Thời gian, h	Alpha-amylaza chủng 3BT2			Alpha-amylaza chủng tái tổ hợp		
	Protein, μg	α -amylaza, đv	Hoạt độ riêng, đv/mg	Protein, μg	α -amylaza, đv	Hoạt độ riêng, đv/mg
0	819	88	107,9	1740	522	302,6
1	314	89	283,4	654	535	818,5
2	296	89	300,6	517	525	1015,4
3	293	88	300,5	508	522	1027,5
4	290	88	303,4	503	522	1037,7

3.3. Điện di protein trên gel polyacrylamit

Để kiểm tra các bước làm sạch ở trên dung dịch enzym được chạy điện di trên gel polyacrylamit. Để xác định vạch hoạt tính của α -amylaza, dung dịch protein không biến tính với SDS tuy nhiên trong gel chạy vẫn cho SDS như đã mô tả ở trên. Điện di được chạy ở 400V ở 4°C trong 3 giờ. Điện di được chạy với các mẫu enzym của chủng 3BT2; vạch 1 và vạch 2, 3 là enzym của chủng tái tổ hợp. Lượng đưa vào chạy là 20 μl . Các dịch enzym đã làm sạch ở trên sau khi kết thúc điện di bằng 3 được cất ra xử lý với dung dịch tinh bột và sau đó nhuộm bằng dung dịch Lugol để xác định vạch hoạt tính α - amylaza. Phần còn lại được nhuộm bằng dung dịch Coomassi. Kết quả điện di protein được trình bày ở hình

Hình 1. Điện di đồ protein α -amylaza

trên gel polyacrylamit-SDS

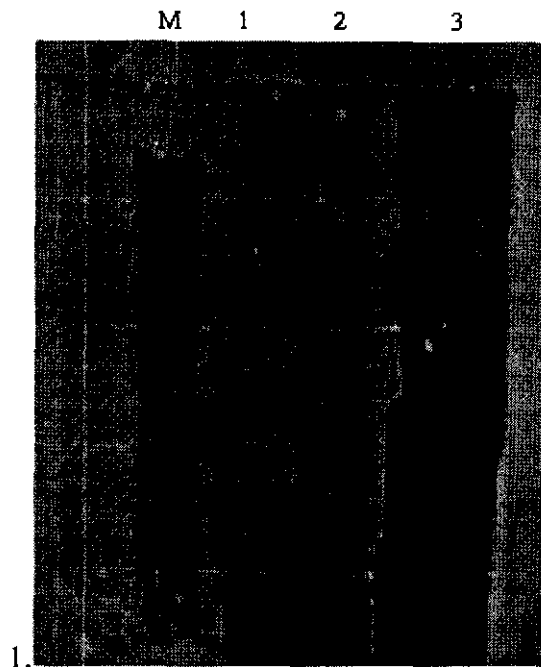
M – Protein chuẩn

(1) – α - amylaza chủng 3BT2

(2), (3) – α - amylaza tái tổ hợp

(1), (2) – Nhuộm Coomassi

(3) – Băng hoạt tính α - amylaza



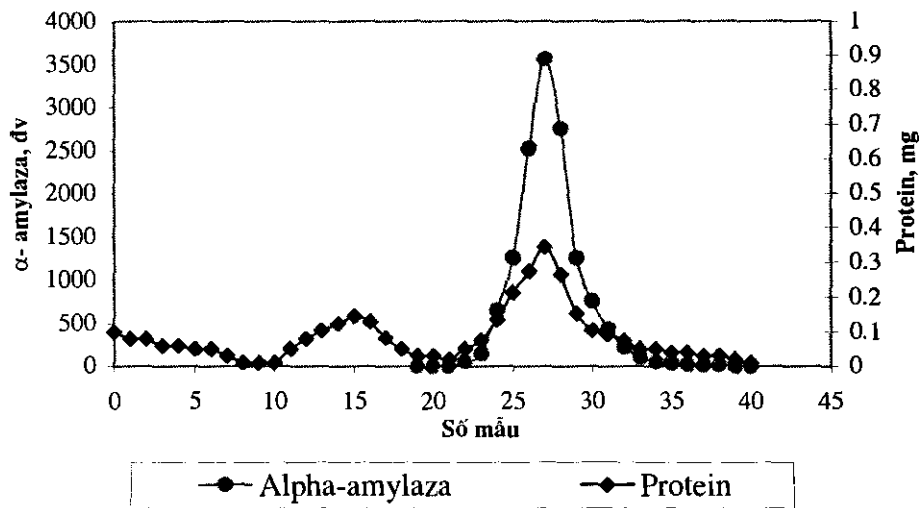
Kết quả điện di cho thấy bằng các bước làm sạch ở trên đã thu được α - amylaza có độ sạch tương đối cao. Còn một số vạch protein mờ trên điện di đồ, do đó protein được đưa qua cột sắc ký để làm sạch tiếp.

3.4. Làm sạch α - amylaza trên cột sắc ký

Đối với α - amylaza có thể sử dụng nhiều vật liệu mang khác nhau để làm sạch trong sắc ký cột. Trong nghiên cứu này CMC đã được sử dụng. Xác định pH phù hợp để protein gắn tốt nhất lên CMC dịch enzym được ủ với CMC trong đệm natri axetat 0,1M có pH khác nhau (4,5; 5,5; 6,0; 6,5 và 7,0) ở nhiệt độ $28\div 30^{\circ}\text{C}$ trong 2 giờ. Xác định α - amylaza ở dịch để tìm pH thích hợp. Kết quả cho thấy ở pH 5,5 có 98% enzym được giữ trên CMC. Trong khi đó ở các pH khác α - amylaza chỉ giữ lại trên CMC khoảng 30÷80%. Do đó pH 5,5 được sử dụng để cân bằng cột sắc ký và làm dung dịch rửa cột.

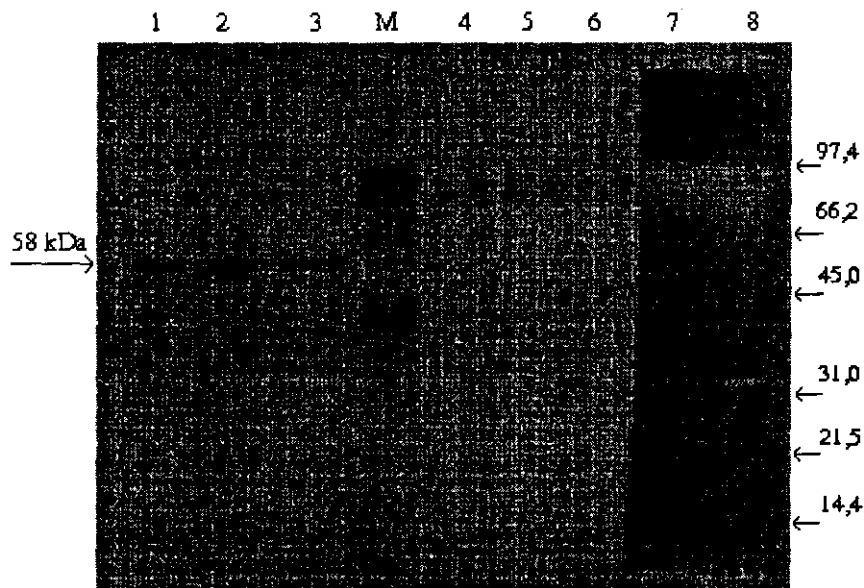
Dung dịch enzym có chứa protein pH 5,5 thu được bằng cách hòa tan dịch kết tủa ở mục 2 và được đưa lên cột sắc ký đã được làm cân bằng bởi đệm natri axetat 20mM. Sau khi rửa cột 5 lần thể tích tự do của cột bằng cùng loại đệm natri axetat, enzym được thổi ra khỏi cột bằng NaCl có gradien nồng độ từ 0÷1M. Thu mẫu với lượng 5ml ở tốc độ chạy 40 ml/giờ.

Loại muối ra khỏi dung dịch protein bằng cách kết tủa protein bằng cồn ở nồng độ 70% ở 4°C qua đêm. Kết tủa thu được sau khi ly tâm 1300 vòng/phút được hòa tan trong đệm natri axetat 0,1M để xác định protein và hoạt độ α - amylaza của từng mẫu. Kết quả làm sạch α - amylaza bằng sắc ký cột được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Nồng độ protein và hoạt độ α - amylaza của các mẫu sắc ký cột CMC

Qua kết quả trên cho thấy protein có hoạt tính α - amylaza thu được ở các mẫu từ số 28÷37. Protein làm sạch được chạy điện di trên gel polyacrylamit SDS để xác định trọng lượng phân tử, vạch hoạt tính và độ sạch của α - amylaza. Gel điện di bao gồm các băng 1, 2, 3 là protein biến tính; các băng 4, 5, 6, 7, 8 là protein không biến tính. Sau khi điện di phần gel chạy với protein không biến tính được cắt làm hai phần, một phần nhuộm Coomassie cùng với băng protein biến tính. Phần còn lại sau khi rửa sạch SDS được ủ với tinh bột trong dung dịch đệm natri axetat rồi nhuộm tiếp bằng dung dịch Lugol (hình 3).



Hình 3. Điện di đồ gel polyacrylamit- SDS α - amylaza của chủng tái tổ hợp

(1), (2), (3) – Protein biến tính; (M) – Protein chuẩn; (4), (5), (6) – Không biến tính, nhuộm Coomassie; (7), (8) – Không biến tính, nhuộm tinh bột

Khi không biến tính vạch protein có hoạt tính ở vị trí cao hơn so với khi biến tính do protein còn giữ cuộn xoắn của cấu trúc bậc ba. Trọng lượng phân tử được xác định chỉ với protein biến tính. Kết quả cho thấy MW của α - amylaza vào khoảng 58 kDa.

3.5. ảnh hưởng của một số chất hóa học lên hoạt tính α - amylaza

Đối với các α -amylaza khác nhau mối tương quan giữa hoạt độ và các hóa chất là khác nhau. So sánh tính chất này của α -amylaza cho thấy cả hai đều có các kết quả tương tự như nhau (bảng 4). Điều đó chứng tỏ α -amylaza của chủng tái tổ hợp và α -amylaza của chủng gốc là cùng một loại.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy Ca^{2+} , Na^+ và glyxerin đều ảnh hưởng tới hoạt tính α -amylaza của cả hai chủng gốc và tái tổ hợp. Chủng 3BT2 được phân lập từ môi trường nước biển có nồng độ muối cao. Có thể đó là nguyên nhân của khả năng chịu Na^+ của α -amylaza. Kết quả ở trên cho thấy glyxerin và NaCl đều làm giảm hoạt độ của nước nên có thể sử dụng làm chất bảo quản enzym của chủng 3BT2. EDTA ngược lại là chất khử Ca^{2+} nên làm giảm hoạt tính α -amylaza. Ion Cu^{2+} làm giảm hoạt tính α -amylaza mạnh nhất (gần 80%) ở nồng độ 5 mM.

Bảng 4. ảnh hưởng của một số chất hóa học lên hoạt độ α -amylaza

Hóa chất	Nồng độ, mM	Tương quan hoạt tính α -amylaza, %	
		Chủng 3BT2	Chủng tái tổ hợp
Mẫu đối chứng	0	100	100
CaCl_2	5	110,5	114,7
ZnSO_4	5	32,6	31,0
NaCl	5	115,3	106,0
EDTA	5	53,0	54,7
MnCl_2	5	85,4	87,0
Glyxerin	5	102,3	107,6
CuSO_4	5	21,8	22,3
MgCl_2	5	93,2	94,6

IV. KẾT LUẬN

1. Đã xác định được chế độ kết tủa phân đoạn bằng etanol để tách α -amylaza khỏi các protein khác. Sau khi kết tủa phân đoạn hoạt tính riêng của α -amylaza tăng lên từ 2,3÷3,9 lần.
2. Xử lý nhiệt ở 70°C đã tách α -amylaza ra khỏi các protein kém bền nhiệt. Hoạt tính riêng của α -amylaza tăng lên 3 lần so với trước khi xử lý nhiệt và 6,9÷11,7 lần so với enzym thô ban đầu.
3. Tách α -amylaza trên cột sắc ký CMC đã thu được enzym sạch. Hoạt tính riêng của α -amylaza đạt tới 3895 đv/mg protein. Điện di trên gel polyacrylamit cho thấy α -amylaza có trọng lượng phân tử khoảng 58000 Da.
4. So sánh ảnh hưởng của các hoá chất lên hoạt độ α -amylaza cho thấy cả hai enzym có tính chất tương tự nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Đình Mẫn, Th. Schweder (1999), "Khả năng sinh tổng hợp và đặc điểm α -amylaza chịu nhiệt của chủng vi khuẩn 3BT2", Kỷ yếu Hội nghị CNSH toàn quốc, Hà Nội – 1999, tr. 592-598.
2. Ramesh M. V., Lonsane B. K. (1989), "Purification of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* M 27 under solid state fermentation", Process Biochem., Oct., pp. 176-178.
3. Linden A, Niehaus F, Antrinikian G. (2000), "Single-step purification of a recombinant thermostable α -amylase after solubilization of the enzyme from insoluble aggregates", Chromatogr B Biomed Sci. Appl. Jan 14; 737 (1-2), pp. 253-259.
4. Nakao M., Nakayama T., Harada M., Kakudo A., Ikemoto H., Kobayashi S., Shibano Y. (1994), "Purification and characterization of a *Bacillus* sp. SAM1606 thermostable α -glucosidase with

THE GLOBAL STATUS OF CROP BIOTECHNOLOGY ACCEPTANCE

MARGARITA ESCALER

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) , DAPO 7777, Metro Manila, Philippines

Few agricultural technologies in history have matched the rate at which biotechnology-based crops, often called genetically modified (GM) crops are being adopted. In 1996, there were only 1.7 million hectares of biotech crops planted in the world. In 2000, this figure increased by 11% - up from 39.9 million hectares (mha) in 1999 to 44.2 mha in six continents.

In the early 1990s, many were skeptical that genetically improved crops could deliver improved products and make an immediate impact at the farm level. There were even doubts about the appropriateness of these crops for developing countries. However, experience of the last five years has demonstrated that the early promises of biotech crops are meeting expectations of large and small farmers in both industrial and developing countries.

During the five-year period 1996-2000, the global area of biotech crops increased by more than 25-fold and the number of countries growing these crops more than doubled. The number of countries planting these crops went up from only 6 in 1996 to 13 in 2000. Most of the planting occurred in industrialized nations such as the USA and Canada. Significantly, in 2000, one quarter of the global area was grown in five developing countries – Argentina, China, South Africa, Mexico, and Uruguay.

Farmers in both industrial and developing countries around the world made independent decisions to increase their GM crop areas by more than 25-fold in five years, after evaluating the technology following their first plantings. This speaks volumes for the confidence and trust farmers have placed in GM crops.

The adoption of GM crops is therefore predicted to grow rapidly in other parts of the world.

NORTH AMERICA

GM crops have been available in the marketplace in North America since the mid-1990s. However, research into crop modification by genetic engineering has been going on since the early eighties.

The USA is the leading grower of GM crops, with an area of 30.3 mha in 2000. There was a net increase of 1.6 mha from the previous year; this was due to an increase in the area of GM soybean, cotton and canola. The increase in GM crop area is testimony to the confidence and trust farmers have placed in GM crops. Canada is the third leading grower of GM crops, with a total area of 3 mha.

AUSTRALIA AND NEW ZEALAND

GM foods are currently in the marketplace in Australia and New Zealand and they include foods derived from soybeans, canola, corn, potato, sugar beet, and cotton. Most of these are imported foods derived from GM crops grown and processed overseas. However, Australia grew 200,000 ha of GM crops in 2000, three-fourths of which was grown to GM cotton. Field trials are being carried out in both countries.

EUROPE

Europe's rejection of imports of GM crops is weakening in the wake of the ban on feeding meat-and-bone meal to animals, following the mad cow disease. The ban has led to European farmers scrambling for alternative feeds, forcing them to import all available soybean. Much of this is herbicide-tolerant soybean because non - GM soybean has already been bought up following the campaign by

activists against GM soybean. Imports of soybeans are therefore expected to jump by 3.5 million tons this year, almost all of it GM soybean.

There are other signs of changing trends in Europe. The EU Parliament voted 338 to 52 on February 14, 2001 for new rules on the marketing and production of GM food that may end the EU's 3 year moratorium on the licensing of new biotech products as early as next year.

SOUTH AMERICA

Argentina is one of the world's major exporters of soybeans and wheat. It was one of only four countries that grew 99% of the global GM crop area in 2000. The others were the USA, Canada, and China. Argentina grew 10 mha of GM crops, second only to the USA. An increase of 3.3 mha was reported for 2000 as a result of significant growth in GM soybean and corn and a modest increase in cotton.

Brazil has recently signed a new law that gives the National Biosafety Technical Commission (CTNBio) overriding powers to authorize the production and sale of GM crops. This will end a legal battle that has prevented the sale of biotech seeds approved by CTNBio in 1998 and push biotechnology forward. Brazil is second in the world market for soybean exportation.

Uruguay reported the commercialization of GM crops for the first time in 2000, growing a small area, 3,000 ha, to herbicide tolerant soybean.

AFRICA

The need for increased productivity is nowhere greater than in Africa, which is currently experiencing the highest population growth rate and the highest levels of malnutrition of any region in the world. Provided they are properly integrated into production systems, biotechnology applications offer new opportunities to increase productivity. Often, too, they allow users to switch to more sustainable and ecologically friendly production systems, for example, by reducing dependence on chemicals to control pests and diseases.

South Africa is the only country in the continent to have commercialized any GM crop. It has been conducting research on crop biotechnology for the last 20 years. Three commercial approvals of GM crops have been obtained (insect resistant corn and cotton, and herbicide tolerant cotton). Field trials increased to 45 from only 12 in 1995. A significant increase of up to 100,000 ha of GM crops is reported for South Africa, where the combined area of GM corn and cotton is expected to almost double.

In Kenya, field trials are being carried out for virus resistant sweet potato while those for GM corn and cotton are still under negotiation.

Egypt is looking to biotechnology research to increase agricultural productivity. Laboratory work is being done on GM potato, tomato, corn, faba bean, wheat, cucurbits, cotton etc. Field trials are being conducted for insect resistant potato and virus resistant cucurbits. GM crops will be available soon on the commercial level.

ASIA

Despite skepticism that GM crops are able to deliver benefits to small-scale farmers, governments in Asia continue to support plant biotechnology research in several countries, with the help of national scientific institutions. Scientists and officials have joined hands to put in place rigorous regulatory systems to ensure safe and effective testing of GM crops and build public confidence in the new technology.

The Indonesian government recently issued a decree allowing the planting of Bt cotton in 7 regencies in the province of South Sulawesi.

India has just conducted extensive field trials of Bt cotton and seed production. Several government institutions are in advanced stages of research to tackle pest resistance using Bt in rice, cotton, tobacco, potato, tomato, eggplant, cauliflower, cabbage, and pigeonpea.

International Workshop on Biology. Hanoi – Vietnam 2-5 July 2001

China already ranks fourth in the world for the number of field experiments and acreage under cultivation using GM crops. It recently announced it would focus on eight technologies including biotechnology, to ensure its competitiveness with the West,

Singapore has established itself as the premier research center of biotechnology in Asia. Its Economic Development Board set up two \$1 billion funds in the space of six months – a Life Sciences R&D Fund and a Life Sciences Investment Fund.

Japan has approved 29 products derived from GM crops for food use, and 15 products for feed use though it has not commercialized any GM crops.

Except for Vietnam, all of the developing countries in ASEAN have successfully conducted field trials of GM crops.

Thailand is just finishing its last large-scale trials before commercialization. It was the first to initiate field-testing of GM crops with a delayed-ripening tomato in 1995, followed by Bt cotton in 1996. The Thailand national program is expected to have its own virus resistant papaya ready for field-testing shortly.

Malaysia has field tested GM rubber. It is drafting legislation to put the country at the forefront of biotech research and has renewed emphasis on R&D in oil palm to increase yields and reduce fatty acid content.

The Philippines tested its first GM crop, Bt corn, in field trials for the control of the Asia Corn Borer last year. The results: 30-60% yield increases.

Asia, the largest of the 6 continents and covering 30% of the world's total land area, stands to gain more than any other continent from GM crops. With land and water resources shrinking and expectations rising, these problems pose huge challenges for Asian governments. If Asia is to produce more food, feed and fiber with less land, water and resources, it will have to turn to science - to biotechnology - as an option.

SUMMARY

THE GLOBAL STATUS OF CROP BIOTECHNOLOGY ACCEPTANCE

MARGARITA ESCALER

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), DAPO 7777, Metro Manila, Philippines

Few agricultural technologies in history have matched the rate at which biotechnology-based crops, often called genetically modified (GM) crops are being adopted. During the five-year period 1996-2000, the global area of biotech crops increased by more than 25-fold and the number of countries growing these crops more than doubled. In 1996, there were only 1.7 million hectares (mha) of biotech crops planted in the world while in 2000, this figure increased to 44.2 mha. The number of countries planting these crops went up from only 6 in 1996 to 13 in 2000. Most of the planting occurred in industrialized nations such as the USA and Canada. Significantly, in 2000, one quarter of the global area was grown in five developing countries – Argentina, China, South Africa, Mexico, and Uruguay.

The experience of the last five years has demonstrated that the early promises of biotech crops are meeting expectations of large and small farmers in both industrial and developing countries. Benefits to farmers range from more convenient and flexible crop management, higher productivity, and a safer environment through decreased use of conventional pesticides.

While there is still skepticism over the use of GM crops, governments all over the world continue to support research and development of biotech crops, with the help of national scientific institutions. The adoption of GM crops is therefore predicted to grow rapidly in the next five years and most of the new hectareage will come from developing countries.

COLLECTION, CONSERVATION AND UTILIZATION OF LEGUME GENETIC RESOURCES IN VIETNAM

Tran Dinh Long
Ha Dinh Tuan

Vietnam Agricultural Science Institute

I. INTRODUCTION

Vietnam is located in the SouthEast Asia, one of the plant genetic resources richest regions in the world. Vietnam itself is very diverse in agroclimatic conditions that imply a great diversity of plant genetic resources. As a cradle of agriculture, Vietnam enjoys a unique and invaluable asset of agro-biological resources including legumes (table 1) capable of maintaining sustainable development of Vietnamese nation throughout its 4000 year history without any significant production fall or famine except that in 1945 because of war. At present, however, due to population pressure and industrialization, as well as, to overexploitation of natural resources, such a rich and diverse asset could no longer be able to keep the overall balance. Symptoms of unsustainability have started to exert. Soils become degraded, water resources become scarcer. Productivity becomes lower. More important is the genetic erosion of biodiversity of plant species, narrowing the options for the survival of future generations of world human kind.

Being aware of this danger, the Government of Vietnam started to invest in conservation and utilization of plant genetic resources right after the war completed in 1954. The main target groups were cultivated crop species such as rice, root and tuber crops, legumes as well as vegetables.

However, legume genetic resources, especially wild legumes received less or no attention. According to available literature, Vietnam has 669 different legume species. This number must be greater in the nature because they exist mainly in the wild and many of them have not been surveyed and identified. Nevertheless, the collection, conservation and research on the use of the known legumes is very crucial in terms of serving sustainable agricultural development. It is because when thinking about legumes, we always consider their possible multi-use: food, vegetable, fiber, oil, medicine, wood, timber, fodder, and very importantly their ability for soil improvement and protection. This paper deals with the activities on legume collection, conservation and use for sustainable agricultural production and development in Vietnam.

Table 1. The most popular crop groups in Vietnam
(N.D. Khoi 1995)

Crop groups	Number of species
-------------	-------------------

Food crops (starch)	39
Food crops (non-starch)	95
Fruit plants	104
Vegetables	55
Spices	39
Beverage	12
Fiber	16
Oil	44
Aroma	19
Soil improvement	28
Medicinal	179
Ornamental	50
Shading	5
Woody	49

II. Exploration, collection and conservation of legume genetic resources

Exploration and collection activities were started when the country was still under the French colonization. However, little was left for us. The boom of these activities has occurred since 1987 when National Plant Genetic Resources Program was formed. Numerous collection trips were conducted to all provinces of the country with special emphasis on cultivated crops, fruits, medicinal and industrial plants. From 1988 to 1991, Liakh6vkin, Tran Dinh Long and other staff of Vietnam Agricultural Science Institute (VASI) conducted 34 trips to 94 districts of 30 provinces of Vietnam. They collected 5516 samples of 70 cultivated species, 1533 of which belong to various legume genera.

In 1992 the first systematic collecting trip exclusive to wild legumes was conducted by Prof. Rainer Schultze-Kraff of Hoheheim University (HU) of Germany, Ha Dinh Tuan and Nguyen Phung Ha of Vietnam Agricultural Science Institute (VASI). The mission took place from 19 February to 4 March 1992. The collection route crossed essentially a North to South transect and covered a wide range of ecological conditions between Hanoi and Ho Chi Minh city. Altogether 195 samples of at least 25 genera were collected. Unfortunately, the samples have not been evaluated and utilized. In the 1999-2000 period, under the cooperation between VASI

Table 2. List of collected and introduced species

Collected species	Number of samples	Collected genera	Number of samples
Desmodium spp.		Abrus	1
D. gangenticum	19	Aeschynomene	3
D. heterocarpon	53	Alysicarpus	8

INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOLOGY. HANOI – VIETNAM 2-5 JULY 2001

D. heterophyllum	5	Cajanus	8
D. sequax	2	Calopogonium	4
D. styracifolium	3	Canavalia	4
D. triflorum	18	Centrosema	2
D. velutinum	8	Chamaecrista	5
D. sp (unid.)	1		
Dendrolobium spp.	12	Christia	1
Hegnera spp.	2	Crotalaria	13
Phyllodium spp.	21	Dunbaria	3
Tadehagi spp.	41	Flemingia	17
Puearia spp:		Galactia	5
P. montana	6	Indigifera	6
P. phaseoloides	10	Lablab	1
Leucaena	2		
Genera:		Millettia	2
Albizia	1	Mucuna	2
Caesalpinia	1	Pycnospora	4
Cassia	1	Stylosanthes	1
Dalbergia	4	Tephrosia	1
Derris	1	Teyletia	1
Gleditsia	1	Uraria	27
Glycine max	4	Vigna	21
Senna	1	Unid. genera	2
Introduced legume species		Introduce	

Grass species

Aschynomene hysterics

Cassia rotundifolia (Chamaecrita

Avenue saliva

Brachiaria brizantha

rotundifolia)

Calopogonium mucumoides	B. decubens
Centrosema pasquorum	B. humidicola
Stylosanthes guianensis	B. ruziziensis
S. hamata	Hordeum vulgare
Macula pruriens	Panicum maximum
Pueraria phaseoloides	Paspalum atrium

Pennisetum purpureum, *Setaria italica* and Hohenheim University (HU) of Germany, several collection missions were conducted by Rainer Shultze-Kraft, Bettina Heider, Ha Dinh Tuan to a northern mountainous province of Bac Kan (200 km north of Hanoi). Parallel to these activities, we also imported and tested foreign germplasm species for adaptation and potential use. The main purpose was to observe ability to grow in difficult ecological conditions, to control weeds, to improve the soil fertility and to produce high quality forage. As a result, a collection of wild legumes has been established (table 2).

III. Conservation of legume genetic resources

Long and medium-term conservation of basic and active collections of plant genetic resources in general and those of legumes in particular are carried out in National Germplasm Bank at An Khanh Campus of VASL. Working collections are maintained by various legume breeders at different institutions. A large number of samples were sent to VIR, CIAT, AVRDC,... for safer conservation. Accessions are multiplied to replace the low germination ones, as well as to supply seeds to users. This is always accompanied by further characterization and evaluation. The generated data are computerized for documentation and database management. However, it is necessary to mention that little has been done with evaluation and utilization of wild legume, a very important part of legume germplasm.

IV. Utilization of legume genetic resources

So far, more attention has been paid to the utilization of cultivated legume germplasm collections. The leading institution to carry out these activities is the Legume Research and Development Center of VASL.

In Vietnam, legume crops occupy only 570 ha (5% of total cultivation area) in 1997. The yield was generally low. In recent years, when the rice production achieved food surplus, the role of cash crops becomes more important. The legumes with high cash value and export potential, therefore, enjoy rapid development. The yield of peanut, for example, increased from 1.0 to 1.4 ton/ha during 1992-1997 period. The legume cultivated area was projected to reach 850,00 ha in 2000 and 1,370,000 ha. in 2010. The total production will be then more than tripled. It will be achieved not only by extensive, but also by intensive

means. The legume genetic collections play very important role in varietal improvement programs. Accessions with precious traits such as resistance to biotic and abiotic stresses, short growth duration, high oil and protein contents... will be evaluated and utilized. From 1985 to 2000, a large number of new varieties were released to production, of which soybean accounts for 14, peanut - 6, mungbean - 5. These varieties have played significant role in increasing farmer's income and improvement of our diet. They also contribute much to maintaining and increasing the soil fertility.

With regard to wild and semi-wild legumes, they have not received the due attention. Little has been done with their evaluation and utilization. This is a big gap that we need to fill up. Perhaps, the first efforts to facilitate these activities was the training course entitled Evaluation of Tropical Legume Germplasm for Livestock Nutrition and Soil improvement, jointly organized by VASI and HU in April 1999. The germplasm materials supplied by HU included some important genera and species like *Pueraria*, *Centrosema*, *Mucuna*, *Calopogonium*, *Stylosanthes*, and *Arachis pintoi*. Seeds were shown and the field collections of these species are maintained in an experimental field at Van Dien Campus of VASI. Parallel to this, the collection trips had been and will be organized. The foreign germplasm needs also to be introduced and evaluated. The first example of these activities was the experiments conducted by SAM project on sloping lands in Cho Don district of Bac Kan province. The legume test mainly aimed at, except the other purposes, identification of their ability to improve the soil nitrogen content. In the meanwhile, some grasses were tested for their ability to soil compaction breaking and restructuring by strong root system. In the tested fields, the soil became soft and pH became neutral under the thick mulch of grass and legume biomass and decomposition of organic litters. The positive influence of legume on soil fertility and crop yield was shown by many authors. Rainer Schultze Kraft (1999) indicated that legumes may increase the crop yield up to more than 2 times, even after one year. The results of our experiments were similarly impressive. Maize yield was 3 times higher than control after 3 months of *Mucuna* growing (from 0.7 to 2.0 ton/ha); Rice yield was increased by 4 times (from 0.5 to 1.95 ton/ha). Rice bean (*Vigna umbellata*) had the same effects. However, *Mucuna* produced more biomass and showed high ability to control strong weeds, such as *Imperata cylindrica*. Woody legumes like *Tephrosia caccida*, *Flemingia macrophylla*, *Grilicidica sepium* and *Indigofera teysmanii* are used for hedgerows in different SALT models or green fence to protect crops, improve soil fertility and produce animal feed.

Obviously, wild and semi-wild legumes have great advantage and high potential for promoting sustainable agricultural production, especially in mountainous regions.

V. Conclusions and suggestions

The legume genetic resources in Vietnam are rich and diverse, but their genetic erosion is also rapid. It's very urgent to promote their collection, conservation and utilization. We sincerely call for international cooperation from foreign and international organizations

such as HU, CIAT, IPGRI, VIR, TARI and AVRDC in collection, conservation, evaluation and utilization of legume genetic resources in Vietnam.

Although, considerable efforts have been done to conserve and use of legume genetic resources in Vietnam, much still need to be done with their evaluation, documentation and distribution to users.

The recent achievements in legume variew improvement programs are great but still not capable of meeting the production demands. More investment is needed to promote legume research and breeding.

Wild legumes have much advatage in growing in difficult conditions, hence they have great potential in promoting agricultural production in a very sustainable way, especially on sloping lands. However, these are big gaps in their research and utilization which can be considered as an abandoned field. Concerned offices at all levels have to pay due attention to facilitate all kind of activities related to wild legumes such as exploration, collection, conservation, evaluation and utilization.

LIST OF ABBREVIATIONS

AVRDC:	Asian Vegetable Research and Development Center
CIAT:	International Center for Tropical Agriculture
HU:	Hohenheim University
IPGRI:	International Plant Genetic Resources Institute
TARI:	Taiwan Agricultural Research Institute
VASI:	Vietnam Agricultural Science Institute
VIR:	Vavilov Institute of Plant Production

REFERENCE

1 .**Nguyen Dang Khoi**. *General Report of the Project Steering Committee. In: Plant Genetic Resources in Vietnam*. Proceeding of the National Workshop on strengthening of thp Plant Genetic Resources Program in Vietnam, Ha noi, 28-30 March 1995, Agricultural Publishing House, Hanoi 1996, p 9-27.

2. **Bettna Heider, Ha Dinh Tuan, Vu Van Can and Rainer Schultze Kraff (2000)**. *Collecting legume Genetic Resources in Bac Kan province, Northeast Vietnam* (unpublished).

3. Olivier Husson, Jean-Christophe Castella, Ha Dinh Tuan and Krisna Naudin (2000). Agronomic Diagnosis and Identification of Factors limiting Upland Rice Yield in Mountainous Areas of Northern Vietnam. (unpublished).

4. Rainer Schultze Kraff, Ha Dinh Tuan and Nguyen Phung Ha (1992). Collection of Native Forage Legumes in Vietnam. Paper submitted to an International Grassland Congress.

5. Rainer Schultze Kraff, M. Peter (1999). Tropical Legumes in Agricultural Production and Resources Management: an Overview. A lecture given to VASI - HU training course on Evaluation of Tropical Legumes for Animal Nutrition and Soil Improvement organized in Hanoi, April 1999.

6. Tran Dinh Long (1995). Strategies for Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources in Vietnam. Proceeding of the National Workshop on strengthening of the Plant Genetic Resources Program in Vietnam, Hanoi 28-30 March 1995. Agricultural Publishing House, Hanoi 1996, pp

7. Tran Dinh Long, Ha Dinh Tuan (2000). Biodiversity and Legume Genetic Resources in Vietnam. In: Proceeding of the 18th conf. of AFEO, Hanoi 22-24 Nov. 2000.

ABSTRACT

Legume genetic resources in Vietnam are very rich and diverse thanks to long history of agriculture, diversity of ethnic cultures and agro-climatic conditions. Of 14000 species estimated to exist in Vietnam, 669 belong to the Family Fabaceae or Leguminosae, which is very famous in nutrition value and nitrogen fixation ability. Beside cultivated species, the wild legumes have great potential for animal nutrition, soil improvement and natural resources management, especially in the conditions of rapidly changing environment. This paper deals with the present status of collection, conservation and utilization of legume genetic resources in Vietnam, especially wild ones in agricultural production and soil fertility management, indicating gaps and possible ways for their utilization.

ANTISENSE RECOMBINANTS FOR GENE THERAPY OF LIVER CANCER

LE HUNG AND VIJAY KUMAR

*Virology Group, International centre for Genetic Engineering and Biotechnology,
P.O. Box 10504, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi 110067*

SUMMARY

Hepatitis B virus (HBV) is one of the etiological agents of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC). Modulation of the nuclear and signal transduction pathways by the transactivator X protein (HBx) has been suggested to be associated with tumorigenesis. To understand the oncogenic cooperativity of HBx, we developed a transgenic mouse (X-myc) having liver-specific co-expression of HBx and the recombinant c-myc. These animals develop liver-specific tumors within 3 to 5 months and eventually die. The X-myc mouse therefore, is an excellent model to study the molecular biology of HCC and developing new therapeutics.

In order to develop gene therapy for HCC, we have developed six antisense recombinants. Among these, two constructs have antisense X gene under the regulatory control of either HBx promoter or SV40 early promoter. Other two constructs have anti-precure gene of HBV under either native core promoter or RSV-LTR to regulate the expression of recombinant c-myc. The remaining two constructs are bicistronic and therefore can co-express anti-sense HBx as well as anti-sense precure. All the six constructs confer neomycin selection in cell culture. These constructs have been evaluated for the regulation of HBx and c-myc genes in a CHO cell line stably expressing the X-myc transgene. Detailed strategies of the construction of antisense recombinants and data on their antisense efficacy in cell culture will be presented.

MỘT PHẦN CHUỖI ARN VÀ KẾT QUẢ PHÂN TYP CỦA CHỦNG VI RÚT VIÊM GAN E (HEV) PHÂN LẬP ĐƯỢC Ở VIỆT NAM

NGUYỄN TUYẾT ANH, NGUYỄN THU VÂN, HOÀNG THUY NGUYỄN¹

JIHONG MENG, MICHAEL A. PURDY, YURY E. KHUDYAKOV, HOWARD A. FIELDS²

¹(Viện Vệ sinh Dịch tễ học, Hà Nội)

²(Trung tâm kiểm soát bệnh tật và phòng chống Atlanta, Hoa Kỳ)

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virút viêm gan E (HEV) là tác nhân gây nên những vụ dịch và các trường hợp bệnh rải rác lan truyền theo đường tiêu hoá ở các nước đang phát triển. Đặc biệt bệnh gây ra tỷ lệ chết cao tới 20% ở phụ nữ có thai. Đã có những giả thuyết đề cập đến vấn đề HEV có khả năng là bệnh lan truyền từ động vật. Từ những thành công trong lĩnh vực tạo dòng và phương pháp xác định trình tự của genom HEV mang lại hiểu biết tương đối đầy đủ về cấu trúc sinh học phân tử. Genom HEV là ARN đơn sợi dương, polyadenyl hoá đầu 3'; xấp xỉ 7,5 kilobase chứa 3 khung đọc mở (open reading frame-ORF). ORF 1 nằm ở đầu 5' của genom dài khoảng 5 kilobase và mã hoá cho polyprotein không cấu trúc bao gồm methyltransferaza, papain – kiểu proteaza, ARN helicaza và ARN phụ thuộc ARN polymeraza. ORF 2 dài khoảng 2 kilobase và mã hoá cho protein cấu trúc. ORF 3 chỉ có khoảng 369 nucleotit nằm trong vùng ORF 1 và ORF 2 mã hoá cho protein không rõ chức năng. Cho đến nay HEV được biết đến chỉ có 1 serotyp. Đã có một số nghiên cứu ở Việt Nam đề cập tới tỷ lệ mang IgG HEV giao động từ 9-21% trong quần thể khoẻ mạnh và bệnh nhân viêm gan cấp. Đã có những dịch vụ liên quan đến HEV được thông báo ở Việt Nam.

Trình tự chuỗi ARN của vài chủng HEV từ Mehico, Mỹ, Mianma, Trung Quốc, Nepal... đã được thông báo một phần hoặc toàn bộ. Những nghiên cứu đã phân tích sự khác biệt giữa các chủng gợi ra khả năng có 3 genotyp của HEV: genotyp 1 hay còn gọi là genotyp Mianma, genotyp 2 – Mehico, genotyp 3- Mỹ. Gần đây có một vài nghiên cứu đã đề nghị khả năng có thêm genotyp mới từ Châu Âu với đại diện là chủng HEV phân lập được từ Italia và Hy Lạp. Sự biến đổi giữa các chủng HEV là vấn đề quan trọng liên quan đến chẩn đoán và phát triển HEV vắc xin. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm bước đầu thông báo một đoạn gen nằm trong vùng ORF 2 từ chủng HEV phân lập được ở Việt Nam và so sánh với 17 chủng khác trong Ngân hàng Gen để xác định vị trí trong genotyp và phân typ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Mẫu huyết thanh

Từ 400 mẫu huyết thanh thu thập được của bệnh nhân viêm gan cấp tại bệnh viện Bạch Mai (Hà Nội) chúng tôi tiến hành thử nghiệm ELISA phát hiện IgM HEV bằng sinh phẩm Prototype HEV IgM ELISA (Macfarlane Burnet Center for Medical Research) cùng với một số chỉ tiêu khác của HBV, HAV, HCV (số liệu không đề cập đến trong nghiên cứu này). 22 mẫu IgM HEV dương tính (5,5%) được tiến hành làm PCR kép với các đoạn môi chung và chỉ có 1 mẫu dương tính. Mẫu này được tiếp tục khuếch đại bởi PCR bán kép với một cặp môi khác và sử dụng một trong cặp môi chung. Sản phẩm PCR được cài vào véc tơ pCR 2.1 bằng sinh phẩm TA cloning. Cuối cùng clon này được xác định trình tự bằng cặp môi của véc tơ. Thử nghiệm ELISA tiến hành tại phòng thí nghiệm viêm gan (NIHE); thử nghiệm PCR, tạo dòng và xác định trình tự được tiến hành tại Trung tâm kiểm soát bệnh tật và dự phòng (CDC, Atlanta, Hoa Kỳ)

2. Các cặp môi

2.1. Cặp môi để chẩn đoán xác định được thiết kế dựa trên vùng ít biến đổi nhất giữa các chủng

2.2. Cặp môi để khuếch đại đoạn gen

Cặp môi dùng để khuếch đại đoạn gen bằng PCR kép được thiết kế dựa trên thứ tự ARN của chủng Mianma. Tất cả các đoạn môi được sinh tổng hợp tại Biotechnology Core Facility, CDC.

3. Tách chiết ARN

20 μ l huyết thanh được trộn với 500 μ l chloroform. Hỗn hợp được lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng 5 phút. Tiếp theo 15 phút ly tâm 13000 vòng/phút ở 4°C, phần nước nổi phía trên được chuyển sang ống nghiệm mới. ARN trong phần nước nổi được tủa bằng isopropanol và glycogen ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Hỗn hợp ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Sau khi loại bỏ nước nổi, ARN được rửa bằng 75% ethanol, để khô và hoà tan trong 20 μ l nước dùng cho PCR.

4. Phản ứng phiên mã ngược

Sau khi biến tính ở 95°C trong 5 phút, phản ứng phiên mã ngược được thực hiện ở 42°C trong 60 phút. Sau đó enzym được bất hoạt bởi nhiệt độ 95°C trong 10 phút và hỗn hợp được nhanh chóng đặt trong đá lạnh.

5. PCR

Vòng thứ nhất PCR được tiến hành với hỗn hợp 50 μ l trong 45 chu kỳ. Vòng thứ hai được tiếp tục 3 μ l sản phẩm PCR vòng thứ nhất như là khuôn mẫu với cùng điều kiện như trên trong 30 chu kỳ. Toàn bộ sản phẩm PCR được phát hiện bằng agarosa 1,2% nhuộm ethidium bromide.

6. Tạo dòng sản phẩm PCR

Chúng tôi sử dụng bộ sinh phẩm Original TA Cloning (Invitrogen, CA, USA). Sản phẩm PCR với đầu 3' đơn deoxyadenosine (A) hình thành do tác dụng của Taq polymeraza được cài trực tiếp vào plasmid có đầu 3' đơn deoxythymidine (T). Sau khi phản ứng được ủ qua đêm 14°C, plasmid có đoạn gen cần thiết được chuyển nạp bằng sốc nhiệt vào tế bào INV alpha F'. Clon được nuôi cấy trên môi trường LB có ampicillin và X-Gal ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Khuẩn lạc trắng được chọn lọc từ môi trường nuôi cấy và xác định dương tính (có đoạn gen cần thiết) bằng phân tích enzym giới hạn.

Plasmid được tinh k

7. Phân tích kết quả

Thứ tự chuỗi ARN và axit amin được so sánh bằng phần mềm Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI). Các chủng được so sánh bằng phương pháp chùm. Thứ tự chuỗi ARN của các chủng được lấy từ Ngân hàng Gen bao gồm: HEV Chad (U62121); HEV Mianma 1 (M73218); HEV Mianma 2 (D10330); HEV Trung Quốc 1 (D11092); HEV Trung Quốc 2 (L08816); HEV Trung Quốc 3 (L25547); Ấn Độ 1 (U22532); Ấn Độ 2 (X99441); HEV Ấn Độ 3 (X98292); HEV Morocco (AF065061); HEV Mexico (M74506); HEV Pakistan (M80581); HEV Ai Cập (AF051352). Đoạn gen HEV chủng Việt Nam đã được chuyển vào lưu trữ trong Ngân hàng Gen với mã số AF170450.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Sự biến đổi nucleotit giữa các chủng trong vùng so sánh

Qua phân tích, so sánh chúng tôi nhận thấy có 1 số vị trí nucleotit đặc hiệu trong vùng 5966-6582. Tại vị trí số 6718, Guanine được quan sát thấy ở hầu hết các chủng trong genotyp 1 trong khi Uracil thay thế ở genotyp 2 và Adenine – genotyp 3. Tương tự như vậy Uracil ở vị trí số 6226 trong genotyp 1 và Guanine – genotyp 2; Cytosine – genotyp 3. Các nucleotit đặc hiệu còn được quan sát ở các vị trí số 6283, 6322, 6502, 6556 với Guanine, Uracil và Guanine ở genotyp 1 và Cytosine, Adenine – genotyp 2; Uracil, Guanine, Uracil – genotyp 3.

3.2. Sự biến đổi axit amin giữa các chủng HEV

Axit amin số 286 của chủng ấn Độ 3 là Leucine trong khi toàn bộ các chủng khác là Serine. Tương tự như vậy chúng tôi quan sát thấy vị trí axit amin số 309 của ấn Độ 3 là Phenylalanine khác biệt với Leucine của các chủng khác. Sự khác biệt axit amin cũng được nhận thấy ở chủng Mehico ở vị trí số 316, 317, 376, 428 với Threonine, Cysteine, Leucine và Valine. Trong vùng so sánh, chủng Việt Nam có 1 vị trí axit amin duy nhất khác biệt là Serine 337 thay thế Glycine ở các chủng khác. Axit amin ở vị trí số 328 của genotyp 3 (US genotyp) là Threonine trong khi các chủng khác là Serine. Axit amin đặc hiệu của genotyp 1 còn được quan sát thấy ở vị trí số 357, 360, 368. Đó là Tyrosine, Serine và Isoleucine. Threonine được quan sát thấy ở toàn bộ genotyp US ở vị trí số 430 cũng như Glutamic axit ở vị trí số 438 của genotyp 1. Tuy nhiên chúng tôi cũng nhận thấy sự đồng dạng cao của các axit amin giữa các chủng. Điều này cũng phù hợp với một số tác giả khác cho rằng HEV chỉ có 1 serotyp và kháng nguyên tái tổ hợp phản ứng tốt với các mẫu huyết thanh từ các vùng khác nhau.

BẢNG 1

VỊ TRÍ NUCLEOTIT ĐẶC HIỆU CHO GENOTYP TRONG VÙNG 5966-6582

Chủng	Genotyp	Vị trí nucleotit đặc hiệu					
		6178	6226	6283	6322	6502	6556
Chad	1	G	U	G	U	G	G
Việt Nam	1	G	U	G	U	G	G
Mianma 2	1	G	U	G	U	G	G
Mianma 1	1	G	U	G	U	G	G
Trung Quốc 1	1	G	U	G	U	G	G
Trung Quốc 2	1	G	U	G	U	G	G
Trung Quốc 3	1	G	U	G	U	G	G
ấn Độ 1	1	G	U	G	U	G	G
ấn Độ 2	1	G	U	G	U	G	G
ấn Độ 3	1	G	U	G	U	G	G
Morocco	1	G	U	G	U	G	G
Pakistan	1	G	U	G	U	G	G
Ai Cập	1	G	U	G	U	G	G
Nepan	1	G	U	G	U	G	G
Mehico	2	U	G	C	C	C	A
US 1	3	A	C	U	G	U	U
US 2	3	A	C	U	G	U	U

3.3. Phân typ

Chủng HEV phân lập được ở Việt Nam có tỷ lệ đồng dạng cao với 1 số chủng trong genotyp 1 như sau: 95,5% giống Mianma 2, 96,3% giống Mianma 1 và 92-95,9% giống các chủng ấn Độ. Tuy nhiên, HEV Việt Nam có tỷ lệ đồng dạng thấp hơn so với các chủng Trung Quốc, Pakistan (91,1 – 92,1%) cũng như là Morocco, Chad, Ai Cập (87,5-90,8%) biểu hiện phân typ riêng rẽ. Tỷ lệ nucleotit đồng dạng với Mehico genotyp hoặc US genotyp (77,3-77,8%) của chủng Việt Nam giống như các chủng Châu á khác. Chủng Mehico khác biệt với các chủng khác từ 22,0-22,5% biểu hiện 1 genotyp tương tự như nghiên cứu của nhiều tác giả khác đề nghị sự

khác biệt trên 15% thuộc về genotyp riêng rẽ. Tương tự như vậy các chủng US1, US2 có sự khác biệt lớn với các chủng khác trên 22,7%. Khi so sánh các chủng và thiết lập cây phát sinh loài bằng 617 nucleotit trong khung đọc mở 2, chúng tôi nhận thấy sự phân bố rõ ràng của 3 genotyp như các nghiên cứu khác. Genotyp 1 bao gồm các chủng Châu á và Châu Phi; genotyp 3 gồm các chủng phân lập được ở US và genotyp 2 với đại diện duy nhất là chủng Mehico. Genotyp 1 bao gồm 2 phân týp: phân týp Châu á và Châu Phi với sự khác biệt lớn hơn 7,5% biểu hiện phân týp riêng rẽ. Trong phân týp Châu á chúng tôi nhận thấy có sự phân bố thành các nhánh nhỏ. Các chủng phân lập được từ Trung Quốc và Pakistan với sự khác biệt nhỏ (1,8-2,7%) tạo thành một nhánh và các chủng Việt Nam, Mianma, ấn Độ, Nepal khác nhau 1,5-6,4% tạo thành nhánh riêng. Tuy nhiên, chủng ấn Độ 3 với khoảng khác biệt lớn hơn 6,6% có vẻ riêng rẽ với các nhánh khác trong phân týp Châu á. Gần đây có nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra sự khác biệt lớn giữa các chủng mới phân lập được ở Trung Quốc và đề nghị một phân týp riêng rẽ. ở phân týp Châu Phi, chủng Ai Cập với 93,7% giống chủng Chad biểu hiện nhóm riêng biệt với chủng Morocco (12,1-12,5% khác biệt).

IV. KẾT LUẬN

So sánh 617 nucleotit trong vùng khung đọc mở 2 (5966-6582) của chủng HEV phân lập được ở Việt Nam với các chủng khác cho thấy 1 số thay đổi về nucleotit và axit amin. Đồng thời cho thấy 1 số vị trí nucleotit và axit amin đặc hiệu cho từng genotyp. Kết quả phân tích ban đầu xếp loại HEV Việt Nam thuộc về genotyp 1 và cùng một nhánh với chủng Mianma, ấn Độ, Nepal.

ứng dụng kết quả nghiên cứu

Từ kết quả phân týp của chủng vi rút viêm gan E (HEV), chúng tôi tiến hành nghiên cứu tiếp theo để tạo dòng (cloning) kháng nguyên tái tổ hợp HEV đặc hiệu cho genotyp 1 với cặp môi được thiết kế đặc biệt dựa trên vùng ORF 2 của chủng Mianma và được gắn thêm vị trí cắt của enzym giới hạn, chuỗi Kozaks. Đoạn gen mã hoá cho protein tái tổ hợp HEV sau khi cài đặt trong plasmit véc tơ pPICZA được chuyển nạp vào tế bào nấm men *Pichia pastoris* chủng GS 115 (Mut +). Protein biểu thị trên *Pichia pastoris* được tinh khiết bằng sắc ký cột ái lực. Protein tái tổ hợp HEV có tính kháng nguyên cao và đang được nghiên cứu sử dụng trong các kỹ thuật chẩn đoán anti HEV.

TÓM TẮT

617 nucleotit từ vị trí số 5966-6582 của genom HEV phân lập từ huyết thanh bệnh nhân viêm gan cấp tại bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam đã được xác định bằng kỹ thuật xác định trình tự (sequencing). Đoạn gen này khi so sánh với 17 chủng HEV khác từ Ngân hàng Gen ở cùng vị trí cho thấy chủng Việt Nam thuộc về genotyp 1 và nằm trong cùng một phân týp với chủng Mianma, ấn Độ, Nepal. Kết quả phân tích cho thấy có một số vị trí nucleotit và axit amin đặc hiệu cho từng genotyp trong vùng so sánh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Meng J., Cong M., Dai X., Pillot J., Purdy M.A., Fields H.A., Khudyakov Y.E. Primary structure of open reading frame 2 and 3 of the hepatitis E virus isolated from Morocco. *J. Med. Virol.*, 1999, 57, 126-133.
2. Fields H.A., Favorov M.Q., Margolis H.S. The hepatitis E virus: a review. *J. Clin. Immunoassay*, 1993, 16, 215-223.
3. Tam A.W., Smith M.M., Guerra M.E., Huang C.C., Bradley D.W., Fry K.E., Reyes G.R.

Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full length viral genome. *Virology*, 1991, 185, 120-131.

4. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A., Rozanov M.N., Reyes G.R., Bradley D.W.

Computer-assisted assignment of functional domains in the non structural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive – strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 8259-8263.

5. Aye T.T., Uchida T., Ma X.Z., Iida F., Shikata T., Zhuang H., Win K.M.

Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from Xinjiang epidemic (1986 – 1988) of China. *Nucl. Acids. Res.*, 1992, 20, 3512 – 3512.

6. Hau C.H., Hien T.T., Tien N.T., Khiem H.B., Sac P.K., Nhung V.T., Larasati R.P., Laras K., Putri M.P., Doss R., Hyams K.C., Corwin A.L.

Prevalence of enteric hepatitis A and E viruses in the Mekong river delta region of Vietnam. *Am.J.Trop. Med.Hyg.*, 1999, 60 (2), 277-280.

Partial sequence and phylogenetic analysis of hev isolated from vietnam

Nguyen Tuyet Nga, Nguyen Thu Van, Hoang Thuy Nguyen¹

¹(National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam)

Jihong Meng, Michael A. Purdy, Yury E. Khudyakov, Howard A. Fields²

² (Hepatitis Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, National Center for Infectious Diseases, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA).

The nucleotide sequence from position 5966 to 6582 of the hepatitis E virus (HEV) genome was determined from a Vietnamese isolate obtained from the acute-phase sera of a sporadic case of acute hepatitis. This sequence was compared with the corresponding sequences of 17 HEV belongs to genotype 1 closely related to the Mianma, India, and Nepal subtypes. Phylogenetic analysis demonstrated genotype-specific nucleotides and amino acids within this region.

Partial sequence and phylogenetic analysis of HEV isolated in Vietnam

Nguyen Tuyet Nga, Nguyen Thu Van, Hoang Thuy Nguyen¹

Jihong Meng, Michael A. Purdy, Yury E. Khudyakov, Howard A. Fields²

¹National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi

²Hepatitis Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, National Center for Infectious Diseases, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is an enterically transmitted agent that causes epidemic and sporadic cases of hepatitis predominantly in developing countries. Especially, the disease has a high mortality rate, up to 20% in infected pregnant women. HEV is a positive sense, single-stranded RNA, polyadenylated at the 3' end, approximately 7,5 kb containing 3 open reading frames (ORF) Hepatitis E is known to exist as a single serotype. A number of surveys in Vietnam have revealed a rate of HEV antibody (anti HEV) IgG about 9-21% in healthy populations and acute viral hepatitis patients. A number of outbreaks with epidemiological characteristics of hepatitis E have been reported in Vietnam.

The sequence of several HEV strains from Mexico, US, Myanmar, China, Nepal... have been reported partially or entirely. Phylogenetic analysis of different HEV sequences showed the existence of at least 3 HEV genotypes: genotype 1 or Mianma genotype, genotype 2 – Mexico and genotype 3 – US. Recently, a novel HEV strains from Italy and Greek may represent the fourth genotype – Europe genotype. A heterogeneity was identified by comparison among some strains isolated from the same geographical region. The heterogeneity of HEV genome is important, which deals with diagnosis and developing HEV vaccine.

The purpose of this research is reporting a partial sequence in ORF 2 of HEV isolated in Vietnam and comparison with 17 other strains available in Genbank to classify it.

400 serum samples collected from acute viral hepatitis in Bach Mai hospital (Hanoi, Vietnam) were tested by ELISA for IgM anti HEV by prototype HEV IgM ELISA kit (Macfarlane Burnet Center for Medical Research) and markers for HBV, HAV, HCV (data not shown). The nested PCR was performed with 22 IgM anti HEV positive samples using a set of universal primers and only one positive. This PCR positive sample was continued to amplify by semi-nested PCR using other set of primers and 1 of universal primers. The PCR product was inserted in PCR 21.1 vector by TA cloning kit. Finally, this clone was sequenced by vector's primers. ELISA was performed in Hepatitis Laboratory (NIHE, Vietnam); PCR, cloning and sequencing were carried out in Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA.

Nucleotide and amino acid sequence comparisons were performed with the Lagergene software package (DNASTAR Inc., Madison, WI). The sequences were compared using cluster method. The following corresponding sequences deposited in Genbank were: HEV-Chad (U62121); HEV-Myanmar 1 (M73218); HEV Myanmar 2 (D10330); HEV China 1 (D11092); HEV China 2 (L08816); HEV China 3 (L25547); HEV India 1 (U22532); HEV India 2 (X99441); HEV India 3 (X98292); HEV Morocco (AF065061); HEV Mexico (M74506); HEV Pakistan (M08581); HEV-US1 (AF035437); HEV-US2 (AF060669); HEV Nepal (AF051830); HEV Egypt (AF051352). The partial sequence of HEV isolated in Vietnam was deposited in Genbank with accession number AF170450.

The analysis revealed that there were some specific – nucleotide positions within 5966-6582 region. Whereas Guanine was seen in almost strains within genotype 1 at position 6718; Uracil was replaced in genotype 2 and Adenine – genotype 3. Similarly, Uracil was seen at position 6226 within genotype 1 and Guanine – genotype 2; Cytosine – genotype 3. The specific nucleotides were also seen at positions 6283, 6322, 6502, 6556 with Guanine, Uracil and Guanine within genotype 1; Cytosine, Adenine – genotype 2; Uracil, Guanine, Uracil – genotype 3

Amino acid number 286 of India strain was Leucine whereas Serine was seen in all other strains. Similarly, we revealed that position 309 of India 3 strain was Phenylalanine differed with Leucine in other strains. The difference of amino acid was also seen in Mexico strain at positions 316, 317, 376, 428 with Threonine, Cysteine, Leucine and Valine. Within the comparative region, HEV Vietnam strain has a unique different amino acid – Serine 357 replaced Glycine in other strains. Amino acid at position 328 of genotype 3 (US genotype) was Threonine meanwhile Serine was substitute in others. The specific – amino acids of genotype 1 were also observed at positions 357, 360, 368 – Tyrosine, Serine and Isoleucine. Threonine was seen in all strains within US genotype at position 430 as well as Glutamic acid at position 438 within genotype 1. However, we revealed that the highly homogeneity of amino acids was determined within HEV strains. Similar to other observations, HEV is known to exist as a single serotype and recombinant proteins react equally well with serums from different geographical regions.

The HEV isolated in Vietnam is most similar to other sequences of genotype 1 as follow: 95,5% similar to Myanmar 2; 96,3% similar to Myanmar 1 and 92-95,9% similar to India strains. However, HEV Vietnam has a lower similarity to China, Pakistan (91,1 – 92,1%) as well as Morocco, Chad, Egypt (87,5 – 90,8%) strains, which represent a separate subtype. The homogeneity of HEV Vietnam strain with Mexico genotype or US genotype (77,3-77,8%) is similar to other Asia strains. The HEV Mexico strains, which represent a separate subtype. The homogeneity of HEV Vietnam strain with Mexico genotype or US genotype (77,3-77,8%) is similar to other Asia strains. The HEV Mexico strain is distinct from other strains by 22,0 – 22,5% as a separate genotype. Which is similar to numerous researches by other authors who suggested that a difference of over 15% represented a separate genotype. The similarity was also seen in US1, US2 strains, which significantly differ by over 22,7% from other strains. When the 617 nucleotides sequences in ORF2 were analyzed and phylogenetic tree was built, 3 HEV genotypes were identified. Genotype 1 includes 2 subtypes: Asian and African subtypes; genotype 3 has a new isolate from US and

genotype 2 has Mexico strain as single representative. Genotype 1 includes 2 subtypes: Asian and African subtype with over 7,5% difference as a separate subtype. We revealed that there were a smaller groups in Asian subtype. The new isolates from China and Pakistan with a little difference (1,8-2,7%) constitute 1 branch and Vietnam, Myanmar, India, Nepal strains which differ by 1,5-6,7% form a separate branch. However, India 3 strain with a difference of over 6,6% seems to be a separate branch within Asian subtype. Recently, some observation shows a great difference within isolates from China and suggested as a separate subtype. Within the African subtype, Egypt strain with 93,7% homology a Chad strain represented a separate group with Morocco (12,1-12,5% differ)

Comparison of 617 nucleotides in ORF 2 of HEV isolated in Vietnam, with other strains revealed that there were some changes of nucleotides and amino acids. It also showed some specific nucleotides and amino acids position within genotype. The primary analysis results grouped HEV Vietnam to genotype 1 and within the same branch with Myanmar, India, Nepal.

PHÂN LOẠI VÀ ĐỊNH TÊN MỘT SỐ CHỦNG NẤM MEN TRONG SẢN XUẤT NƯỚC QUẢ CÓ ĐỘ RƯỢU THẤP

LÊ VIỆT ANH¹, NGÔ TIẾN HIỂN¹, TRẦN THỊ CHÂU¹, NGUYỄN THUYẾT HƯỜNG¹, ERKO STACKEBRANDT², PETER HOFFMANN², INA KRAMER³, CATHRIN SPOERER³, GUENTER STOSCHEK², NGUYỄN THỊ HIỂN⁴.

¹ Bộ môn Vi sinh vật. Viện công nghiệp thực phẩm. Hà nội Việt nam.

² Khoa Vi sinh vật. Trung tâm sưu tập giống quốc gia cộng hoà liên bang Đức. DSMZ, Germany.

³ Khoa Sinh học phân tử. Trung tâm sưu tập giống quốc gia cộng hoà liên bang Đức. DSMZ, Germany.

⁴ Bộ môn Công nghệ lên men. Viện công nghiệp thực phẩm, công nghệ sinh học và môi trường. Đại học Bách khoa Hà nội. Việt nam.

I. MỞ ĐẦU

Để tiến hành nghiên cứu công nghệ lên men nước quả có độ rượu thấp, một số chủng nấm men có khả năng lên men rượu hoặc sinh zymocin có sẵn trong các sưu tập giống của Việt nam, Anh, Đức hoặc từ cơ sở sản xuất cider của Australia đã được sưu tầm. Bên cạnh đó, chúng tôi đã phân lập được một số chủng nấm men tự nhiên trong sản phẩm nước quả trước và sau lên men. Tất cả các chủng nấm men này đều chưa được phân loại và định tên hoặc mới chỉ được phân loại sơ bộ.

Nhằm mục đích tìm hiểu các đặc tính sinh lý và sinh hoá của nấm men hay bất cứ vi sinh vật nào thì yêu cầu đầu tiên đối với các nhà vi sinh vật là nhận biết, phân loại và định tên các vi sinh vật này (7). Phân loại định tên nấm men đã được biết đến từ hơn 100 năm trước với những phương pháp cổ điển như: phương pháp hình thái học phân loại dựa vào hình dạng của khuẩn lạc, bào tử và hình dạng tế bào sống dưới kính hiển vi; phương pháp sinh hoá phân loại dựa trên test thử sinh hoá của nấm men; phương pháp sinh lý phân loại dựa trên các điều kiện sinh trưởng như nhiệt độ, a_w , áp suất, pH... của nấm men (3); (5).

Ngày nay cùng với sự tiến bộ của sinh học phân tử nhiều phương pháp phân loại mới với độ chính xác cao đã được nghiên cứu và ứng dụng. Trong đó, phương pháp phân tích trình tự chuỗi ARN ribosom của tế bào nấm men đã được biết đến như một phương pháp phân loại hiện đại, nhanh chóng và có độ tin cậy cao (4);(9). Nhiều loài nấm men mới đã được phát hiện khi so sánh trình tự chuỗi rARN với các thông tin chủng giống đã biết của các ngân hàng Gen như Gen Bank, EMBL (Anh), DDBJ (Nhật bản) (1); (2); (6); (10). Mười ba chủng giống nấm men có liên quan đến lên men nước quả có độ rượu thấp đã được chúng tôi tiến hành định tên bằng những phương pháp phân loại cổ điển khác nhau, sau đó được đọc trình tự chuỗi ARN ribosom các gen 18S, 26S, ITS1 và ITS2 và so sánh với các trình tự mẫu trong các ngân hàng Gen. Cuối cùng, kết quả phân loại chính xác cho 13 chủng nấm men này đã được chúng tôi khẳng định.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vi sinh vật

- Hai chủng nấm men sinh zymocin (killer yeast) có ký hiệu NCYC738 từ Sưu tập giống nấm men quốc gia Anh (NCYC- England) và DSM70799 từ Sưu tập giống quốc gia Cộng hoà

liên bang Đức (DSMZ- Germany) được lựa chọn để nghiên cứu khả năng sinh zymocin của nấm men.

- Tám chủng nấm men thường có mặt trong lên men rượu quả có ký hiệu DSM70471, DSM70412, DSM70449, DSM70487, DSM70547, DSM70800, DSM6580 từ sưu tập giống quốc gia Cộng hoà liên bang Đức (DSMZ- Germany).

- Hai chủng men rượu vang LE1 (Y 7028) từ sưu tập giống nấm men Viện công nghiệp thực phẩm (FIRI- Việt nam) và LE2 là nấm men sản xuất cider của Australia .

- Một chủng nấm men gây hại trong công nghiệp đồ uống : LE3- phân lập từ siro Dừa Việt nam được bảo quản bằng axit sorbic nồng độ 500ppm.

2. Phương pháp phân loại nấm men

Nấm men được phân loại bằng các phương pháp sinh lý, sinh hoá, hình thái học (3); (5) và sinh học phân tử (1); (2); (4); (6), (8); (9); (10); (11).

2.1. Phương pháp sinh lý sinh hoá

- 13 chủng: DSM70471, DSM70412, DSM70449, DSM70487, DSM70547, DSM70799, DSM70800, DSM6580, DSM6581, NCYC 738, LE1, LE2, LE3 đã được phân loại bằng các test thử sinh lý sinh hoá bao gồm: lên men trên môi trường lỏng chứa glucoza (2% glucoza), thử khả năng sinh trưởng trên môi trường agar chứa muối nitrat (0.08% KNO₃) và sử dụng API kit (France) để khảo sát khả năng phát triển của nấm men trên các nguồn các bon khác nhau trong thời gian 15-21 ngày ở nhiệt độ 25°C. Các kết quả được phân tích bằng phần mềm máy tính Yeast Identification PC Program Version 2.0 (5).

- Test nhận biết đặc tính *Z. bailii* trên môi trường 1% axit axetic (3).

2.2 Phương pháp hình thái học

Mười ba chủng nấm men được cấy vào các đĩa petri chứa môi trường thạch Mc Clay's chứa muối axetat (5) và nuôi cấy tại 20°C trong 2-7 ngày. Bào tử nang được quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi Zeiss Axiophot- Germany với sự trợ giúp của phần mềm máy tính ImagePro Plus (The proven Solution™, version 4.0 for Window 95). Hình dạng bào tử được so sánh với các hình dạng bào tử mẫu của nấm men trong cuốn sách phân loại nấm men: The yeast- A Taxonomic study (3).

2.3. Phương pháp xác định trình tự chuỗi rARN

Việc định tên 13 chủng giống được dựa trên trình tự chuỗi ARN của các gen r18s, 26S và ITS.

Phương pháp khuếch đại gen sử dụng phản ứng PCR cho gen18S rRNA và ITS rRNA được tiến hành theo protocols của T. J. White và cộng sự (8).

Các cặp mồi (primers) được sử dụng (OliGold -EUROGENTECH- Bel S.A.) và có trình tự axit nucleic như sau:

Mồi cho khuếch đại gen 18S rRNA:

NS1: GTAGTCATATGCTTGCTC

NS8: TCCGCAGGTTACCTACGGA

Mồi cho khuếch đại gen ITS rRNA:

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

Môi cho khuếch đại một phần gen 26S rRNA vùng D1/D2 theo protocol của Wolfgang Schweigkofler and Hansjörg Prillinger (11)

NC1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG

NC4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG

Chu trình nhiệt của phản ứng được áp dụng: 98 °C/giây, 58°C/60giây, 72 °C/120giây với 35 chu kỳ và một thời gian mở rộng 72 °C/15 phút trên máy PCR.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega, Southampton, United Kingdom) theo hướng dẫn sử dụng của hãng.

Xác định trực tiếp trình tự các gen 18S rRNA, IST rRNA, 26S rRNA được tiến hành bằng việc sử dụng các kit phản ứng Applied Biosystem ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Các cặp môi được sử dụng cho xác định trình tự chuỗi của gen 18S rRNA là:

NS1: GTAGTCATATGCTTGTCTC

NS2: GGCTGCTGGCACCAGACTTGC

NS3: GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC

NS4: CTCCGTCAATTCCTTTAAG

NS5: AACTTAAAGGAATTGACGGAAG

NS6: GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC

NS7: GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC

NS8: TCCGCAGGTTACCTACGGA

Các cặp môi được sử dụng cho xác định trực tiếp trình tự chuỗi của gen ITS1 rARN là:

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS2: GCTGCGTTCTTCATCGATGC

Các cặp môi được sử dụng cho xác định trực tiếp trình tự chuỗi của gen ITS2 rARN là:

ITS3: GCATCGATGAAGAACGCAGC

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

Các cặp môi được sử dụng cho xác định trực tiếp trình tự chuỗi của gen 26S rARN vùng D1/D2 là:

NC1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG

Chu trình nhiệt tiến hành theo các bước: 96°C/10giây, 50°C/ 5 giây và 60°C/ 4 phút với 25 chu kỳ được thực hiện trên máy PCR Perkin Elmer 9600 .

Sản phẩm PCR này được tinh sạch và điện di trên gel polyacrylamide. Trình tự chuỗi được đọc tự động bằng máy Sequencer 373A DNA (Applied Biosystems GmbH- Germany).

Kết quả trình tự chuỗi các gen 18S rARN, ITS rARN, 26S rARN của nấm men được phân tích so sánh với các trình tự chuỗi có sẵn trong ngân hàng Gen (EMBL-Anh và Gen Bank) với sự trợ giúp của phần mềm editor (ae2) alignment (DSMZ- Germany). Phần trăm giống nhau (similarity) giữa các trình tự chuỗi của các gen của nấm men được trình bày dưới dạng ma trận. Bảng 1 giới thiệu tên của các trình tự ARN ribosom trong các ngân hàng gen được sử dụng làm mẫu để so sánh định tên cho 13 chủng nấm men cần phân loại

Bảng 1. Các trình tự rARN mẫu được dùng để so sánh phân loại nấm men

S T T	Giống nấm men cần so sánh	18S rARN mẫu		26S rARN mẫu		ITS1rARN mẫu		ITS2rARN mẫu	
		Tên tra dữ liệu	Tên ngân hàng	Tên tra dữ liệu	Tên ngân hàng	Tên tra dữ liệu	Tên ngân hàng	Tên tra dữ liệu	Tên ngân hàng
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JO1353	Gen Bank	L10643	EMBL	SCZ959 29		SCZ959 29	EMBL
2	<i>Saccharomyces bayanus</i>	X97777	EMBL	AF 113892	EMBL	SBZ959 48	EMBL	SBZ959 48	EMBL
3	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	X97805	EMBL	AF1138 93	EMBL	Z75731	EMBL	Z75732	EMBL
4	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	X91083	EMBL	U72161	EMBL	X84640 X84732 X87129	EMBL EMBL EMBL	X84641 X84733 X87130	EMBL EMBL EMBL
5	<i>Kluyveromyces lactis</i>	D83431 D83432 D83433 X87402	EMBL EMBL EMBL DDBJ	U94919	EMBL	AZ2290 69	EMBL	X80274	EMBL
6	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	AF20129 99	EMBL	U94924	EMBL	U09325	EMBL	U09235	EMBL
7	<i>Torulaspora delbruekii</i>	X98120	EMBL	U72156	EMBL	Z48309	EMBL	Z48309	EMBL

III. KẾT QUẢ VÀ BÌNH LUẬN

1. Các kết quả phân loại định tên theo phương pháp hình thái học và phương pháp đặc điểm sinh lý sinh hoá

13 chủng men được định tên như sau:

DSM70417, DSM70449, DSM70487, NCYC 738, LE1, LE2 : *Saccharomyces cerevisiae*

DSM70547, DSM70412 : *Saccharomyces bayanus*

DSM6580, DSM6581 : *Saccharomyces pastorianus*

LE3 : *Zygosaccharomyces bailii*

DSM70799, DSM70800 : *Kluyveromyces lactis*.

*Kết quả phân loại bằng các phương pháp cổ điển này không được khẳng định chắc chắn vì độ chính xác thường thấp hơn 70%. Ví dụ như chủng LE2 và LE3 chỉ được khẳng định tên của chúng với độ chính xác xấp xỉ 60% khi phân tích các số liệu của test thử sinh lý và sinh hoá API bằng phần mềm máy tính Yeast Identification PC Program Version 2.0.

Hai chủng DSM70799, DSM70800 đều bị gặp khó khăn khi phân loại bằng phương pháp hình thái học do chúng rất hiếm khi tạo bào tử.

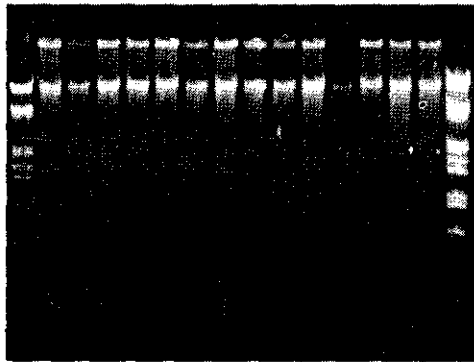
*Thời gian tiến hành phân loại theo *phương pháp cổ điển thường kéo rất dài, từ 2 đến 3 tuần.*

2. Cả 13 chủng được thử lại bằng *phương pháp sinh học phân tử xác định trình tự ARN các gen 18S, 26S và ITS thuộc ribosom.* Thời gian để tiến hành phân loại theo *phương pháp đọc trình tự chuỗi rất nhanh (từ 1 đến 2 ngày).*

Hình 1 là kết quả điện di ADN được chiết tách của 13 chủng nấm men (M: Marker III)

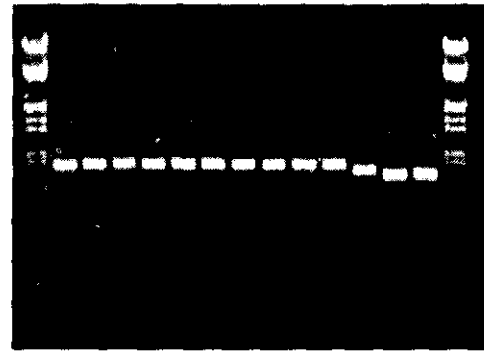
Hình 2, 3 và 4 là kết quả điện di trên gel agarose 1% của các sản phẩm sau khi khuếch đại trên máy PCR của các gen 18S rARN, 26S rARN D1/D2 và ITS rARN

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M



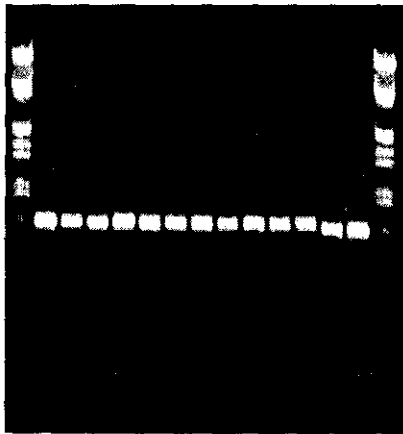
Hình 1. AND của bộ gen tách từ 13 chủng nấm men

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M



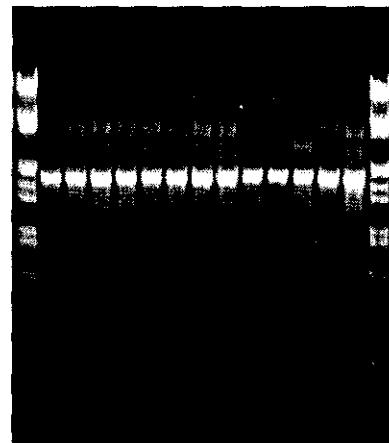
Hình 2. Sản phẩm PCR của ITS rARN của 13 chủng nấm men

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M



Hình 3. Sản phẩm PCR của gen 26S rARN của 13 chủng nấm men

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M



Hình 4. Sản phẩm PCR của gen 18S rARN của 13 chủng nấm men.

- Đã định tên chính xác chủng nấm men đại gây hỏng siro quả và sản phẩm nước quả lên men có độ rượu thấp là *Zygosaccharomyces bailii* LE3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **C.P. Kurtzman and C.J. Robnett** (1997) Identification of Clinically Important Ascomycetous Yeasts Based on Nucleotide Divergence in the 5' End of the Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Gene. *J. Clin. Microbiol.* 35(5), 1216-1223.
2. **C.P. Kurtzman and C.J. Robnett** (1998) Identification and Phylogeny of ascomycetous Yeasts from Analysis of Nuclear Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Partial Sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.
3. **C.P. Kurtzman and J.W. Fell** (1998) *The yeast- A taxonomic study*. pp. 69-74, 424. Elsevier Science B.V publisher.
4. **Erko Stackebrandt and Werner Liesack** (1993) *Nucleic Acid and Classification. Handbook of New Bacterial Systematics*. pp. 151-191. Academic Press Ltd.
5. **J.A. Barnett , R.W. Payne & D. Yarow**. *Yeasts : Characteristics and identification*. Second sediton. p686. Cambridger University press., 1990.
6. **Hazel Steels, Christopher J. Bond, Matthew D. Collins, Ian N. Roberts, Malcolm Stratford and Stephen A. James**. (1999) *Zygosaccharomyces lentus* sp. nov., a new member of the yeast genus *Zygosaccharomyces* Barker. *Int. J. Syst. Bacterio.* 49, 319-327.
7. **H.J. Phaff, M.W. Miller and E.M. Mrak** (1978) *The life of Yeast*. pp. 394. Havard University press.
8. **Maidak B.L., Cole J.R., Parker C.T.Jr., Garrity G.M., Larsen N., Li B., Liburn T. G., McCaughey M.J., Olsen G.J., Overbeek R., Pramanik S., Schmidt T.M., Tiedje J.M. and Michale A. Innis , David H. Gelfand , John J. Sninsky, Thomas J. White** (1990) *PCR protocols. A Guide to methods and Applications*. Academic Press, Inc. USA
9. **Susamu Ando, Kozaburo Mikata, Yasukata Tahara and Yuza Yamada** (1996) Phylogenetic Relationships of Spieces of the *Saccharomyces* Meyen ex Peess Deduced from Partial Base Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae). *Biosci. Biothec. Biochem.* 60(7), 1070-1075.
10. **S.A. James, M.D. Collins, and I.N. Roberts** (1996) Use of an rRNA Internal Transcribed Spacer Region to distinguish Phylogenetically Closely Related Species of the Genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*. *Int. J. Syst. Bacterio.* 46(1),189-194 Wolfgang
11. **Schweigkofler and Hansjürg Prillinger** (1999) Molekulare Identifizierung und phylogenetische Analyse von endophytischen und latent pathogenen Pilzen der Weinrebe. *Mitteilungen Klosterneuburg* 49, 65-78.

SUMMARY

13 strains yeasts which are involved to alcohol fermentation were identified by morphological, physiological and molecular systematic methods. Extent of divergence in partial nucleotide sequences from large unit (26S D1/D2), full small subunit (18S) ribosomal RNAs and internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) RNA was used to estimate genetic relationship among ascomycetous yeast. One dangerous strain of spoilage yeast in Vietnamese fruit juice preserved by sorbic acid 500 ppm was exactly identified as *Zygosaccharomyces bailii*. The comparison of results identified by different methods for the same strains was also shown.

NGHIÊN CỨU HIỆU LỰC CỦA SULFIT NATRI (Na_2SO_3), CHẤT KÌM HÃM QUÁ
TRÌNH QUANG HÔ HẤP Ở ỚT NGỌT (*CAPSICUM ANNUML*)

NGUYỄN DUY MINH

Đại học Sư phạm Hà Nội

Thực vật dạng C_3 như lúa, lúa mì, khoai tây, cà chua, ớt ngọt, tất cả các cây ôn đới có sự cố định sơ cấp CO_2 thu được sản phẩm carbon (C_3).

Quá trình quang hô hấp chỉ thực hiện ở cây C_3 , đó là một hiện tượng cạnh tranh với quá trình quang hợp, nó thể hiện bằng một số lượng lớn CO_2 thải ra ngoài ánh sáng và sự tiêu thụ những sản phẩm trung gian của quang hợp, do đó làm hạ thấp một cách đáng kể sản lượng của cây C_3 .

Dưới tác động của ánh sáng mạnh và nhiệt độ cao (trên 30°C), quá trình quang hô hấp ở cây C_3 mạnh gấp 3 đến 5 lần so với quá trình hô hấp ở ty thể. Nó làm hạ thấp quang hợp thuần, giảm đi 30 đến 40%.

Các hợp chất hoá học nghèo ôxy như các dạng sulfit, nitri, monôxyt carbon, azôtua natri, enzym xytochrômoxydaza phức hợp có thể ngăn cản quá trình quang hô hấp và nâng cao sản lượng cây trồng.

I. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Ớt ngọt có dạng quả rỗng, có vị ngọt hay cay tùy theo giống. Quả ăn rất ngon và dễ hấp thụ. Quả chứa nhiều vitamin, đặc biệt là vitamin C.

Chất ức chế (sulfit natri - Na_2SO_3) dùng phun lên lá trong các giai đoạn phát triển của cây (các giai đoạn: 7 lá, 9 lá, ra hoa, tạo quả) sẽ thu nhận các phần tử oxy, giảm bớt hàm lượng oxy trong các tế bào, kéo theo là sự xáo trộn và giảm sút quá trình quang hô hấp gây ra trong quá trình quang hợp.

Những nồng độ Na_2SO_3 (SS) dùng trong thí nghiệm

SS ₀ (đối chứng)	: 0 mg/l
SS ₁	: 20 mg/l
SS ₂	: 40 mg/l
SS ₃	: 60 mg/l
SS ₄	: 80 mg/l

Các thông số đo đạc được phân bố vào 4 nhóm chỉ tiêu: chỉ tiêu hình thái, chỉ tiêu sinh lý, phân tích sinh khối, năng suất và chất lượng.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Chỉ tiêu hình thái

Các kết quả nghiên cứu và ảnh hưởng của Na_2SO_3 đối với các chỉ tiêu hình thái của ớt ngọt đã được trình bày trên bảng 1.

Việc sử dụng chất kìm hãm quá trình quang hô hấp đã được thể hiện bằng sự phát triển của cây và được thể hiện tương đối mạnh mẽ ở các nồng độ tối ưu (SS₁ = 20mg/l). Các nồng độ cao hơn sẽ có tác dụng độc, dẫn đến sự ngăn cản và bao vây quá trình phát triển. (Minh, 1988; Rey 1989).

Bảng 1. Hiệu lực của sulfite natri đối với thân và lá của ớt ngọt

Nồng độ	SS₀	SS₁	SS₂	SS₃	SS₄
Giai đoạn					
Chiều cao cây (cm)					
7 lá	15,85	15,31	14,90	14,72	15,11
9 lá	26,15	26,85	25,07	25,90	24,75
Ra hoa	42,19	42,13	38,56	38,00	38,23
Tạo quả	67,55	69,66	66,21	61,24	60,20
Đường kính của thân (mm)					
7 lá	04,91	04,92	04,83	04,64	04,78
9 lá	09,10	09,39	09,18	08,77	08,66
Ra hoa	15,12	15,20	14,92	15,25	14,85
Tạo quả	20,85	21,00	20,82	19,38	19,17
Diện tích lá (dm²)					
7 lá	01,11	01,10	01,08	01,10	01,90
9 lá	02,85	03,19	02,91	02,97	03,15
Ra hoa	17,90	18,70	17,95	18,13	17,61
Tạo quả	42,20	43,70	42,60	42,30	41,10

2. Chỉ tiêu sinh lý

2.1. Cường độ thoát hơi nước (Bảng 2)

Bảng 2. Cường độ thoát hơi nước

Nồng độ	SS₀	SS₁	SS₂	SS₃	SS₄
Giai đoạn					
7 lá	2,12	1,85	2,15	1,93	2,51
9 lá	0,94	1,19	1,25	0,97	1,01
Ra hoa	2,24	1,87	1,98	2,12	2,10
Tạo quả	1,42	1,13	1,61	1,64	1,73

Sulfite natri, nhất là ở nồng độ SS₁(20mg/l) đã làm giảm sút sự thoát hơi nước ở lá và cho phép cây có thể chịu đựng tốt hơn các điều kiện khô hạn gây ra khi nhiệt độ cao và ánh sáng mạnh.

2.2. Hàm lượng sắc tố đồng hoá và cường độ quang hợp. Kết quả nghiên cứu về vấn đề này đã được trình bày trên bảng 3.

Ở nồng độ 20 mg/l (SS₁) xem như nồng độ tối thích, hàm lượng diệp lục tổng số (a+b) cao hơn 35% so với cây đối chứng. Sulfite natri kích thích việc tạo thành số lượng diệp lục. Điều này đã xác nhận ý kiến của Heller và tập thể (1989) và Mazliak (1974) vốn có liên quan đến chức năng của lưu huỳnh trong sự tổng hợp diệp lục và khi thiếu nó sẽ gây nên vùng vàng úa trên lá.

Sự kích thích mạnh mẽ của nồng độ SS₁ đối với quá trình quang hợp sẽ gây nên sự hạn chế ít nhiều quá trình quang hô hấp.

Bảng 3. Hàm lượng sắc tố đồng hoá và cường độ quang hợp

Nồng độ	SS₀	SS₁	SS₂	SS₃	SS₄
Giai đoạn					
Hàm lượng diệp lục (a+b) (mg/g tươi)					
7 lá	0,13	0,14	0,12	0,11	0,08
9 lá	2,04	2,40	2,07	1,87	1,75
Ra hoa	2,00	2,71	2,21	2,13	1,65
Tạo quả	2,05	2,65	2,14	2,12	1,68
Đường kính của thân (mm)					
7 lá	28,30	32,70	25,20	24,00	16,80
9 lá	21,80	28,00	27,00	22,00	16,50
Ra hoa	51,00	73,00	52,00	43,00	13,00
Tạo quả	51,10	61,00	58,20	52,70	23,60

3. Phân tích sinh khối. Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của Na₂SO₃ đối với sinh khối của ớt ngọt đã được trình bày trên bảng 4

Bảng 4. Hiệu lực của sulfite natri sinh khối của ớt ngọt

Giai đoạn	Nồng độ	SS₀	SS₁	SS₂	SS₃	SS₄
Bề mặt tương đối của lá (dm²/g)						
7 lá		0,812	0,657	0,724	0,878	0,890
9 lá		0,210	0,230	0,237	0,249	0,316
Ra hoa		0,395	0,390	0,391	0,423	0,445
Tạo quả		0,542	0,497	0,509	0,518	0,584
Bề mặt tương đối của lá (dm²/g)						
7 lá		0,475	0,390	0,392	0,356	0,290
9 lá		0,188	0,199	0,202	0,186	0,180
Ra hoa - Tạo quả		0,133	0,160	0,155	0,160	0,130
Sản lượng chất khô - C (g/ ngày)						
7 lá		0,475	0,406	0,359	0,356	0,292
9 lá		1,440	1,546	1,475	1,410	1,345
Ra hoa - Tạo quả		1,610	1,971	1,930	1,920	1,492
Năng suất						
Năng suất (kg/ cây)		01,15	01,21	01,14	01,13	01,10
Năng suất (tấn/ha)		41,60	43,17	40,71	40,35	39,29

So với các cây đối chứng, các cây ở công thức thí nghiệm SS₁ đạt sử dụng chừng 8% ít hơn về diện tích lá (LAR) để tổng hợp cùng một số lượng chất khô.

Nhưng giá trị NAR thu được, Zelitch (1987) đã cho ta một khái niệm về tốc độ đồng hoá của các yếu tố thô và sự chuyển hoá của chúng thành chất khô chúng cho đánh giá hiệu lực của Na₂SO₃ ở SS₁.

Tác động của các chất kìm hãm đặc trưng đối với quá trình quang hô hấp thể hiện một khái quát bằng sự nâng cao trọng lượng khô và năng suất: Sự tăng thêm năng suất ở SS₁ hiệu lực dương tính của Na₂SO₃ trong các pha dinh dưỡng được thực hiện bằng sự tích các chất dự trữ ở quả sau khi giao phối (Heller 1969 ; Mazliak) 1974.

4. **Chất lượng của quả.** Các kết quả nghiên cứu về hiệu lực của Na₂SO₃ đối với chất lượng các quả đã được trình bày trên bảng 5.

Bảng 5. Hiệu lực của sulfil natri đối với hàm lượng chất khô trong quả (%) và hàm lượng vitamin C (mg/100g quả)

Hàm lượng	SS ₀	SS ₁	SS ₂	SS ₃	SS ₄
Chất khô trong quả (%)					
	12,20	12,35	12,00	11,90	11,80
Vitamin C (mg/100g quả)	155	210	180	113	95

Na₂SO₃ đã có ảnh hưởng đối với hàm lượng chất khô trong quả ở một mức độ vừa phải. Ở nồng độ SS₁ hàm lượng chất khô của ớt ngọt cao hơn .

Theo Anonyme (1985) hàm lượng vitamin C trong quả ớt ngọt giao động trong phạm vi 9-331 mg/100g quả tươi. Sulfote matri kích thích sự thành vitamin C và điều này đã được thể hiện rõ nhất ở công thức SS₁ và SS₂

III. KẾT LUẬN CHUNG

1. Viện kiểm tra sự quang hô hấp có vai trò quan trọng đặc biệt trong việc xác định sản lượng của các cây C₃.

2. Dưới tác dụng có hiệu quả của sulfil, sự mất mát carbon bị giảm bớt, quá trình quang hợp được thể hiện nổi bật, sản phẩm chất khô được tăng lên Na₂SO₃ đã thúc đẩy sự phát triển dinh dưỡng ở ớt ngọt đã kích thích sự phân chia tế bào và các sắc tố đồng hoà ở là và vitamin ở quả .

3. Đã có tác động đối với quá trình thoát hơi nước và đối với sự đóng mở của khí khổng, tăng cường sự chống chịu với khô hạn.

4. Kết quả thực nghiệm cho thấy rõ việc phun trên lá dung dịch 20mg Na₂SO₃/L là tối thích hơn cả và đã cho các kết quả tốt ở hầu hết các chỉ tiêu nghiên cứu .

5. Các nồng độ khác cao hơn 20mg/l đã làm ngưng trệ hoạt động vo với công thức đối chứng hoặc có trường hợp giống như đối chứng .

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chollet R. Ogren W.L., 1975, Regulation of photorespiration in C₃ and C₄ Species - New York and London.
2. Laché J.C.; Viala G, Calmés J, 1978, Etude comparative du métabolisme photorespiratoire chez différentes variétés de soja - Paris,
3. Heller R., 1989 Abrégeé de physiologie végétale - Paris
4. Mazliak P, 1974. Nutrition et métabolisme - Paris
5. Minh. N. D, 1988, Les peroxysomes, Ha Noi
6. Moyse A, 1978, Laphotrespiration - Paris
7. Ogren W.L, 1984, Photorespiration, New Your

EFFECTS OF CHITIN AND ITS DERIVATIVES ON THE GROWTH, CROP YIELD AND THE TOTAL- NITROGEN OF RICE

THAI DUY NINH

The Pedagogies Institute of Ha noi

I. INTRODUCTION

In recent years, chitin and its derivatives in acetic acid were used to stimulate the growth and yield of wheat, barley, rice..... L.A. Hadwiger (1987, 1990) have tested on barley. D.E. Freepons (1990) has applied on wheat. R.E. Lewis (1990) and T.D.Ninh (1995) has studied on rice. The crop yield increased more significantly when these plants were treated with them. Particularly the grain yield of barley was enhanced remarkably from 32 to 50 percent.

In this work the positive effects were presented by the experiments on CR-203 rice. The experiments were carried out on Dich Vong's field and in the green- house of the Faculty of Biology and Agronomy of Pedagogic University.

II. MATERIAL AND METHODS

CR-203 rice was used in the experiments. Seedling was dipped for 12 hours in suitable concentrated solution. Then it was foliarly sprayed twice in the same concentration after transplanting. The grain yield was determined by method of S.Yoshida (1981). The total- nitrogen of husked rice was analyzed by the method of microkjeldahl.

III. RESULTS AND DISCUSSION

The dry matter of seedling under the influence of chitin and its derivatives was shown in table 1. The dry weight of applied seedling increased 8 percent in comparison with control.

Table 2 presents the stem length of seedling of 7 days old. The length of treated plants was higher than untreated one from 2 to 12 percent.

The chlorophyll content of leaf at different stages was shown in table 3. The chlorophyll content of leaf of treated plants at the tillering stage was higher than control from to 12 percent and at the heading stage was higher about 17 percent.

The quantities of tiller per hill, the spikelets per panicle, the weight of 1,000 grains and crop yield under the effect of chitin and its derivatives were presented in table 4, 5, 6 and 7. The grain yield of treated plant was higher than control from 24 to 43 percent.

The total- nitrogen content of husked rice of treated plan increased from 32 to 39 percent (Table 8).

Table 1. Effect of chitin and its derivatives on dry weight of seedlings

Variant —	Treatment (mg/pl.)	Control (mg/pl.)	Comparison with control (%)
	X ± SD	X ± SD	
1	22.5 ± 1.00	20.6 ± 2.88	108
2	22.3 ± 0.50	20.7 ± 2.51	108
3	22.5 ± 1.10	21.0 ± 2.30	108

Table 2. Effect of chitin and its derivatives on stem length of seedlings

Variant —	Treatment (cm)	Control (cm)	Comparison with control (%)
	X ± SD	X ± SD	
1	12.88 ± 1.50	11.45 ± 1.34	112
2	12.12 ± 1.62	11.85 ± 1.35	102
3	12.55 ± 1.60	11.65 ± 1.10	107

Table 3. Effect of chitin and its derivatives on chlorophyll content of leaf

Variant	Treatment (cm)	Control (cm)	Comparison with control (%)
	X ± SD	X ± SD	
Telling stage			
1	9.11 ± 0.11	9.25 ± 0.51	99
2	9.78 ± 0.74	9.59 ± 1.65	102
3	9.20 ± 1.04	8.21 ± 0.75	112
Heading stage			
4	9.33 ± 0.70	9.91 ± 1.41	117

Table 4. Effect of chitin and its derivatives on quantities of tiller per hill

Variant	Treatment (tiller/hill)	Control (tiller/hill)	Comparison with control (%)
	X ± SD	X ± SD	
1	10.50 ± 0.64	9.00 ± 0.26	116
2	08.00 ± 0.36	17.22 ± 0.32	111
3	08.80 ± 0.32	8.07 ± 0.30	109

Table 5. Effect of chitin and its derivatives on quantities of spikelet per panicle

Variant	Treatment (tiller/hill)	Control (tiller/hill)	Comparison with control (%)
	X ± SD	X ± SD	
1	10.50 ± 0.64	9.00 ± 0.26	116
2	08.00 ± 0.36	17.22 ± 0.32	111
3	08.80 ± 0.32	8.07 ± 0.30	109

Table 6. Effect of chitin and its derivatives on the weight of 1,000 grains

Variant	Treatment (g) X (mean)	Control (g)X (mean)
1	22.8	22.6
2	23.0	22.8
3	23.1	23.0

Table 7. Effect of chitin and its derivatives on the weight of 1,000 grains

Variant	Treatment (T/ha) X (mean)	Control (g) X (mean)	Comparison with control (%)
1	5.67	3.95	143
2	7.25	5.83	124
3	6.56	5.16	127

Table 8. Effect of chitin and its derivatives on the total- nitrogen

Variant	Treatment (mg%)	Control (mg%)	Comparison with control (%)
	X ± SD	X ± SD	
1	2.50 ± 0.48	1.79 ± 0.21	139
2	2.66 ± 0.39	2.01 ± 0.31	132
3	5.58 ± 0.40	1.93 ± 1.40	133

Results obtained from experiments confirm its positive effects in comparison with control. The same results were obtained by Bai et al. (1988), Motosugi et al. (1988), Uragami (1988), Freepons (1991), and Lewis (1990). The increase of growth and crop yield in the treated plants may be due to the action of chitin and its derivatives as regulator, fertilizer and antifungi.

LITERATURE CITED

1. Arnon D. J. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. (1949) 24, 1- 15.
2. Bai Ruke, Hoang Meiyu, Jiang Yingyan. Selective permeability of chitosan acetic acid complex membrane and chitosan polymer complex membranes for oxygen and carbon dioxide. Polym. Bull. (Berlin) (1988) 20 (1), 83- 8 (Eng.). C.A. (1988) 20. p. 172457 (q).
3. Freepons Donald E. Plant growth regulator comprising chitosan and an acid. US. Us 4, 1964, 894 (1990). C. A. (1991) 23, p. 223534 (a).
4. Hadwiger L. A., Kendra D. F., Fristensky B. W., Wagoner W. Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. Chitin Nat. Technol., (1985), 3rd, 209- 214 (Eng.). C. A (1987), 19, p. 122965 (p).
5. Lewis Robert E. Chitosan salts as plant growth regulator. PTC Int. Appl. Wo. 07, 395 (1989). C. A. (1990), p. 212475 (q).
6. Ninh T.D. Dẫn xuất chitin như một loại phân bón vi lượng hữu cơ có giá trị lớn. Hội thảo quốc gia chiến lược phân bón với đặc điểm đất Việt Nam, 7/1995, tr. 106- 108.
7. Shouichi Y. Fundamentals of rice crop science. The International Rice Research institutes. Los Banos, Laguna, Philippines (1981).
8. Motosugi Kenzo, Yamaguchi Yasuhiko, Kibune Koji. Chitin membrane with high oxygen permeability. Jpn. Kokai Tokyo Koho. JP (1988) 63, 139, 924. C. A. (1988) 24, p. 212663 (n).
9. Uragami Tadashi. Functional membrane from chitin and chitosan derivatives. Nippon Nogei Kagaku Kaishi (1988), 62 (8), 1228- 31 (Japan). C. A (1988) 109 (18), p. 152146 (j).
10. Hadwiger Lee A. Treating cereal crop seed with chitosan to enhance yield roots growth and stem strength. PCT Int. Appl. WO 89, 01, 228 (CL A01 N 43/16). C. A. (1991), p. 92329 (a).

SUMMARY

EFFECTS OF CHITIN AND ITS DERIVATIVES ON THE GROWTH, CROP YIELD AND THE TOTAL- NITROGEN OF RICE

THAI DUY NINH

The Pedagogies Institute of Ha noi

The experiments were carried out on the field and in the green- house. The CR-203 rice was used for the experiments. Chitin and its derivatives were used in suitable concentration.

The dry matter of seedling, growth, the chlorophyll content. Grain yield and the total- nitrogen of husked rice increased in comparison with control when chitin and its derivatives were treated for CR-203 rice at the seedling stage and the tillering and heading stage.

ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC BÓN $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ĐẾN CÁC QUÁ TRÌNH SINH LÝ, SINH HOÁ, NĂNG SUẤT VÀ PHẨM CHẤT HẠT THóc CR.203 Ở HAI MỨC NITƠ N_{90} VÀ N_{180} LÚC TRỒNG Ở TRÊN ĐẤT TỪ LIÊM, HÀ NỘI

THÁI DUY NINH

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự thiếu Zn trong đất trồng là hiện tượng phổ biến ở nhiều nước trồng lúa vùng Đông Nam Á như Ấn Độ, Pakistan, Philippin, Việt Nam... Tiwari K.N. and Dwivedi B.S. (1993) [10], Frisland.

Lúa lại là cây trồng rất nhạy cảm với sự thiếu kẽm nên phản ứng mạnh với phân bón Zn Tiwari K.N. and Dwived B.S. (1993) [10], Sing and Abrol 1986 [8]. Katyal and Rattan (1990) [3]. Lúa cũng là cây có nhu cầu Zn cao Tiwari and Pathak 1976 [9], Sillanpaa and Vlek 1985 [7]. Cho nên thiếu kẽm, sinh trưởng lúa rối loạn Jones et al 1981 [1].

Bài báo này giới thiệu sự phản ứng của cây lúa CR 203 trồng trong chậu khi bón $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ nồng độ 0,02% trên nền nitơ là 90N và 180N ở đất Từ Liêm - Hà Nội.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Giống lúa trồng thí nghiệm là CR203, giống này trồng phổ biến ở Từ Liêm. Lúa được trồng trong các chậu sành kích thước: đường kính 20 cm, chiều cao 45cm, chứa 9 kg đất đã đập nhỏ, sàng kỹ. Thí nghiệm có 6 lần lặp lại. Đất có các tính chất sau: pH là loại kiềm nhẹ, mùn 0,25- 0,75%, ca tự do 0,5- 3,5%, P từ 7,8 – 20,5 ppm.

Các chỉ tiêu nghiên cứu:

1. Chiều cao cây: Đo bằng thước kẻ ly, đo từ mặt đất đến đỉnh của lá cao nhất.
2. Số nhánh: Đến lúc cây mới bắt đầu đẻ nhánh và lúc nhánh nhiều nhất.
3. Khối lượng khô của cây
4. Diện tích lá: Tính theo Yoshida S. (1976) [11]
5. Hàm lượng diệp lục: Tách và đo theo Yoshida S. [11]
6. Năng suất: Bao gồm số bông trên chậu, số hạt chắc trên bông, khối lượng 1000 hạt.
7. Nitơ tổng số và Nitơ Protein theo phương pháp micro Kjeldahl và hệ số 5,95 dùng để tính protein thô ở hạt.

II. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

1. Chiều cao của cây lúa

Vụ chiêm, khi cây lúa bắt đầu đẻ nhánh, chúng tôi tiến hành đo chiều cao lần 1. Lần đo thứ hai cách lần thứ nhất 20 ngày. Bảng 1 giới thiệu các số liệu đo được.

Số liệu trong bảng 1 cho chúng ta thấy ở thời kỳ đẻ nhánh chiều cao cây lúa ở lô có xử lý Zn dạng muối Sunfat cao hơn 3% ở mức N_{90} và 12% ở mức N_{180} so với cây không xử lý. Ở kỳ làm đòng, chiều cao ở cây có xử lý lớn hơn 4% ở mức N_{90} và 6% ở mức N_{180} so với không xử lý. Jones et al 1981 [1] cũng đã nhận xét kẽm có ảnh hưởng đến sinh trưởng của lúa. Lúc thiếu Zn thì sinh trưởng của lúa rối loạn.

Bảng 1. Chiều cao cây lúa dưới tác động của $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ trên nền N_{90} và N_{180} (cm)

Ngày đo	Mức urea	Loại thí nghiệm	$X \pm \delta$	% so sánh với Đ/c
15/ 3	N_{90}	ĐC	$19,9 \pm 0,20$	100
		Zn	$20,6 \pm 0,30$	103
	N_{180}	ĐC	$19,1 \pm 0,53$	100
		Zn	$21,4 \pm 0,39$	112
4/ 4	N_{90}	ĐC	$49,5 \pm 0,80$	100
		Zn	$51,8 \pm 0,76$	104
	N_{180}	ĐC	$50,3 \pm 1,60$	100
		Zn	$53,7 \pm 1,02$	106

Độ chính xác thống kê $\leq 0,1\%$.

2. Sự đẻ nhánh

Sức đẻ nhánh của lúa cũng là một trong các chỉ tiêu quan trọng phản ánh sức sinh trưởng của lúa. Chúng tôi cũng đếm số nhánh vào hai thời điểm cách nhau 20 ngày. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của Zn đến sức đẻ nhánh của lúa CR203 trồng trong chậu ở nền đất có N_{90} và N_{180} (số nhánh trên chậu).

Ngày đo	Mức urea	Loại thí nghiệm	$X \pm \delta$	% so với ĐC
16/ 3	N_{90}	ĐC	$5,3 \pm 0,57$	100
		Zn	$6,0 \pm 0,24$	109
	N_{180}	ĐC	$5,2 \pm 0,34$	100
		Zn	$7,0 \pm 0,37$	122
4/ 4	N_{90}	ĐC	$13,2 \pm 0,60$	100
		Zn	$16,3 \pm 0,80$	123
	N_{180}	ĐC	$14,7 \pm 0,70$	100
		Zn	$19,7 \pm 1,60$	134

Mức độ tin cậy thống kê $\leq 0,1\%$.

Khác với ảnh hưởng đến chiều cao cây, Zn đã tác động mạnh hơn đến sự đẻ nhánh. Lúc đầu mới đẻ nhánh, số nhánh của cây lúa có xử lý tăng 9% đến 22% ở mức urea N_{90} và N_{180} so với không xử lý Zn. Lúc gần kết thúc đẻ nhánh thì số nhánh tăng đến 23% ở mức urea N_{90} và 34% ở mức N_{180} . Đúng với nhận xét trước đây của Tiwari K.N và Dwived B.S 1993 [10], Sing and Abrol 1986 [8] là cây lúa có nhu cầu Zn khá cao nhất là giai đoạn đẻ nhánh.

3. Ảnh hưởng của Zn lên khối lượng khô của lúa CR203 khi trồng ở đất có hai mức urea là N_{90} và N_{180}

Khối lượng khô của lúa được xác định giai đoạn đẻ nhánh và làm đòng. Các số liệu được trình bày trong bảng 3.

Lượng chất khô tích lũy được là một chỉ tiêu đánh giá chắc chắn nhất về ảnh hưởng của Zn lên sự sinh trưởng của lúa CR203. Qua bảng 3, chúng ta thấy ở N_{90} khối lượng chất khô tích lũy được khi Zn được bón là 27% ở mức N_{90} trong lúc đó chất khô tích lũy được khi bón Zn ở N_{180} là 39% so với cây không bón Zn. Ở lần đo thứ hai khối lượng chất khô tích lũy được lúc có bón Zn trên nền N_{90} là 18% và trên nền N_{180} là 34% khi so sánh với lúa không bón Zn trên nền

N_{90} và N_{180} . 1986 Sing và Abrol [8], 1976 Tiwari và Pathak [9], 1985 Sillanpaa và Vlek [7], 1990 Katyal và Rattan [3] đều đã xác nhận cây lúa yêu cầu Zn trong quá trình sinh trưởng của mình. T.D.Ninh và CTV 1987 [5,6] cũng đã xác nhận phân bón hỗn hợp có chứa Zn làm khối lượng khô của lúa tăng nhanh.

Bảng 3. Ảnh hưởng của Zn đến khối lượng khô tích lũy được của lúa CR203 ở mức N_{90} và N_{180} (g/ khóm)

Thời kỳ đo	Mức urea	Loại thí nghiệm	$X \pm \delta$	% so sánh với ĐC
Đẻ nhánh	N_{90}	ĐC	$2,70 \pm 0,10$	100
		Zn	$3,45 \pm 0,20$	127
	N_{180}	ĐC	$3,10 \pm 0,10$	100
		Zn	$4,70 \pm 0,20$	139
Làm đòng	N_{90}	ĐC	$15,19 \pm 0,49$	100
		Zn	$18,03 \pm 0,55$	118
	N_{180}	ĐC	$17,62 \pm 0,47$	100
		Zn	$23,66 \pm 0,52$	134

Độ tin cậy số liệu 0,1%.

4. Ảnh hưởng của Zn đến sự phát triển diện tích lá lúa trồng trên nền N_{90} và N_{180}

Với cách đo diện tích lá lúa theo Yoshida S. et al 1976 [11] và hệ số k lúc đo diện tích là 0,725, chúng tôi đã xác định được diện tích lá lúa. Lá lúa chọn để đo là lá thứ 3, 4 kể từ ngọn. Chiều dài đo từ thìa lia tới đỉnh, chiều rộng đo ở vị trí rộng nhất của lá. Chúng tôi lập bảng số liệu 4 sau đây.

Bảng 4. Ảnh hưởng của $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ đến chỉ số diện tích lá lúa CR203 ở trên nền N_{90} và N_{180} ($cm^2/lá$)

Mức urea	Loại thí nghiệm	$X \pm \delta$	% so sánh với ĐC
N_{90}	ĐC	$24,72 \pm 1,14$	100
	Zn	$26,97 \pm 1,64$	109
N_{180}	ĐC	$25,29 \pm 0,90$	100
	Zn	$28,41 \pm 1,42$	113

Độ tin cậy thống kê 0,1%

Lá tạo nên bề mặt quang hợp, nên chất lượng lá liên quan tới chất lượng quang hợp. Khi lúa ở thời đứng cái, chúng tôi đo và tính diện tích lá thứ 3, 4 kể từ ngọn. Số liệu cho thấy lúa CR khi dùng $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ để bón thì diện tích lá tăng so với đối chứng ở mức N_{90} là 9% và ở mức N_{180} là 13%.

5. Về hàm lượng diệp lục

Cùng với diện tích lá, hàm lượng diệp lục cũng là một yếu tố quan trọng để đánh giá khả năng quang hợp của lá. Tách chiết diệp lục bằng axeton khan, đo ở hai bước sóng 662 và 644 nm trên máy Spekol, chúng tôi có số liệu trong bảng 5.

Từ số liệu của bảng 5, chúng ta thấy Zn có tác dụng đến hàm lượng diệp lục tổng số. Giai đoạn lúa đẻ nhánh, Zn ở mức N_{90} làm tăng hàm lượng diệp lục tổng số lên 25% và ở mức N_{180}

tăng 26% so với đối chứng không xử lý Zn. Giai đoạn lúa đứng cái, hàm lượng diệp lục tổng số ở lá có xử lý Zn tăng 24% ở mức N_{90} và 32% ở mức N_{180} .

Bảng 5. Ảnh hưởng $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ đến hàm lượng diệp lục tổng số lá lúa ở hai mức N_{90} và N_{180} (mg/l)

Thời điểm đo	Mức urea	Loại thí nghiệm	$X \pm \delta$	% so sánh với ĐC
Đẻ nhánh	N_{90}	ĐC	$1,50 \pm 0,05$	100
		Zn	$1,80 \pm 0,04$	125
	N_{180}	ĐC	$1,70 \pm 0,06$	100
		Zn	$2,10 \pm 0,06$	126
Đứng cái	N_{90}	ĐC	$1,30 \pm 0,05$	100
		Zn	$1,60 \pm 0,04$	124
	N_{180}	ĐC	$1,40 \pm 0,02$	100
		Zn	$1,90 \pm 0,04$	132

Độ tin cậy thống kê $\leq 0,1\%$.

6. Năng suất lúa (bao gồm các yếu tố cấu tạo nên năng suất)

Để đánh giá năng suất thu hoạch, chúng tôi lần lượt đếm số bông trên chậu, số hạt chắc trên bông, cân khối lượng ngàn hạt. Từ đó chúng tôi đánh giá năng suất trên chậu. Số liệu thu được được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ lên năng suất lúa trồng trên nền mức N_{90} và mức N_{180} .

Nền N	Loại TN	Bông/ chậu	Hạt chắc/ bông	Khối lượng 1000 hạt	NS g/chậu	%
		$X \pm \delta$	$X \pm \delta$	$X \pm \delta$		
N_{90}	ĐC	$25,9 \pm 1,6$	$52,3 \pm 1,5$	$23,70 \pm 0,17$	30,9	100
	Zn	$29,8 \pm 3,4$	$60,9 \pm 1,6$	$23,62 \pm 0,05$	42,8	138
N_{180}	ĐC	$32,2 \pm 2,6$	$54,9 \pm 1,6$	$23,34 \pm 0,18$	41,3	100
	Zn	$42,5 \pm 1,2$	$68,7 \pm 2,9$	$23,01 \pm 0,11$	62,4	151

Độ tin cậy thống kê $\leq 0,1\%$.

Năng suất g/ chậu ở N_{90} có bón $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ tăng 38% so với đối chứng. Còn ở mức N_{180} năng suất g/ chậu tăng 51% so với đối chứng. Tiwari K.N, Dwivedi B.S [10] trên đất Ấn Độ cũng thấy phân bón chứa kẽm tăng năng suất lúa, Tiwari K.N, Pathak A.N [9] cũng thấy tác dụng của phân bón chứa kẽm đến thu hoạch của lúa, lúa mì, Jones U.S, Katyal, D.C, Mamaril C.P and Park C.S [1] cũng thấy phân Zn ảnh hưởng tốt đến năng suất lúa, Sillanpaa M and Vlek P.L.G [7] cũng xác nhận phân Zn tăng năng suất nhiều loại ngũ cốc khác nhau.

7. Ảnh hưởng của $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ đến hàm lượng Nitơ tổng số và N protein thô của hạt thóc trồng trên nền N_{90} và N_{180} .

Bằng phương pháp microkjeldhl chúng tôi xác định nitơ tổng số và nitơ protein thô của hạt thóc CR203 khi có xử lý $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ và trồng trên nền N_{90} và N_{180} . Số liệu được chúng tôi trình bày trong bảng 7.

Bảng 7 cho chúng ta thấy là khi bón kẽm $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ cho lúa có mức N_{90} và N_{180} thì hàm lượng protein thô ở hạt cao ở mức N_{90} còn ở mức N_{180} hàm lượng đạm có xu hướng không tăng so với mức N_{90} . Điều đó chứng tỏ N_{180} chỉ làm tăng các chỉ tiêu có tính chất sinh khối như trọng lượng khô, số lượng nhánh đẻ, diện tích lá, hàm lượng diệp lục và năng suất, còn Nitơ tổng số và N protein thô thì ở mức N_{180} lại thấp hơn ở mức N_{90} do vậy việc trồng lúa ở trên đất Từ Liêm có thể chỉ nên dùng nước đạm N_{90} khi có bón Zn trong vụ chiêm thì năng suất và phẩm chất sẽ tăng.

Bảng 7. Ảnh hưởng của $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ đến hàm lượng N tổng số và N protein của hạt trồng trên đất có bón N_{90} và N_{180} .

Mức N	Loại thí nghiệm	Nitơ TS (%/gam)	So sánh với ĐC (%)	N protein (%/ gam)	So sánh với ĐC (%)
		$X \pm \delta$		$X \pm \delta$	
N_{90}	ĐC	$0,56 \pm 0,05$	100	$3,34 \pm 0,17$	100
	Zn	$0,76 \pm 0,01$	135	$4,54 \pm 0,08$	135
N_{180}	ĐC	$0,65 \pm 0,04$	100	$3,87 \pm 0,24$	100
	Zn	$0,09 \pm 0,03$	121	$4,72 \pm 0,16$	121

Độ tin cậy của số liệu $\leq 0,1\%$.

TÀI LIỆU DẪN

- Jones, U.S., Katyal, J.C., Mamaril, C.P. and Park, C.S. (1981)
Rice Research strategies for the Future, IRRI,
Los Banos, Phillipines pp. 327- 378.
- Katyal, J.C. (1985)
Research achievements of All India Coordinated Scheme of Micronutrients in Soils and
Plants,
Fertil. New. 30 (4) pp. 67- 80.
- Katyal, J.C. and Rattan, R.K. (1990)
Micronutrients use in the 90's, Soil fertility and fertlires use. Vol. IV in: Nutrient
Management and Supply System for Sustaining Agriculture in 1990's (eds. Kumar, V. et al.
IFFCO ltd. New Delhi pp. 119 – 135.
- Lindsay, W.L. and Norwell, W.A. (1978) Development of a DTPA soil test for Zinc,
Iron, Manganese and Copper, Soil
Sci. Soc. Am. J. 42 pp. 421 – 428.
- Thái Duy Ninh, Nguyễn Quang Chương, Trần Mạnh Hùng, Nguyễn Thị Hương
(1987).
Tác dụng của phân bón hỗn hợp vi lượng và đa lượng Luvina I đến một số chỉ tiêu sinh lý,
sinh hoá và năng suất lúa Việt nam.
Thông báo khoa học ĐHSP Hà Nội I (c) 1987 pp. 55 – 58.
- Thái Duy Ninh, Trần Mạnh Hùng, Phạm Đình Thái (1990).

ảnh hưởng của Zn đối với năng suất và hàm lượng Nitơ trong hạt gạo lúa CR203 khi bón các mức lân khác nhau.

Tạp chí Sinh học 12(2) pp. 12 – 15.

7. Sillanpaa, M. and Vlek, P.L.G. (1985)

Microelements in Tropical Foods (ed. Vlek, P.L.G). Fertil. Res. 7 pp. 151 – 167.

8. Sing. M.V. and Abrol, I.P. (1986).

Transformation and availability of zinc in alkali soils, Fertil. News 31 97) pp. 17 – 27.

9. Tiwari, K.N. and Pathak, A.N. (1976).

Direct residual and cumulative effect of zinc fertilization on yield and iron absorption by rice and wheat crops in a fixed rotation, I. Effect on rice crop.

Fertil, News 21 (7) pp. 31 – 37.

10. Tiwari K.N and Dwivedi B.S (1994).

Fertilizer Zn Needs of rice (*Oryza Sativa* L.) as influenced by native soil Zn in Udic Ustochrepts of the Indo- Gangetic plains. Trop. Agric. (Trinidad) Vol. 71 N1 January (1994) pp. 17 – 21.

11. Yoshida S., Donghasa, F, Jamesh, C.

Kwanchai A.G.(1976)

Laboratory manual for physiological studies of rice.

SUMMARY

THE EFFECTS OF THE APPLICATION OF $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ON THE PROCESSES OF PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY, YIELD AND QUALITY OF PADDY GROWN ON SOIL APPLIED TWO LEVELS OF UREA OF N_{90} AND N_{180} .

THAI DUY NINH

The Pedagogics Institute of Hanoi

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ was used at three stages of rice, soaking seed, tillering, and the ear formation with concentration of 0,02%. The application of Zn enhanced the height, tillering quantity, leaf area, dried matter, chlorophyll content, grain yield, nitrogen – total and nitrogen-protein content.

The increasing magnitude was much at the level N_{180} as comparison with level N_{90} . Except, nitrogen of protein was also increased, but at the level N_{90} increased higher than at the level N_{180} .

MỘT CHƯƠNG TRÌNH THỰC NGHIỆM XỬ LÝ NƯỚC THẢI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC Ở VIỆT NAM

X

THÂN TRỌNG NINH

Chuyên gia về thực vật của dự án Đầm Rong

Đầm Rong là tên của một cái hồ nhỏ ở trung tâm một khu phố dân cư của Thành phố Đà Nẵng (Miền Trung Việt Nam). Đây là nơi tiếp nhận xử lý nước thải thành phố bằng phương pháp sinh học, thực hiện với sự giúp đỡ của vùng Nord - Pas de Calais (Cộng hoà Pháp).

Dự án được nghiên cứu từ tháng 09/1994 bởi một nhóm hỗn hợp kỹ sư và kiến trúc sư cảnh quan người Pháp và Việt Nam. Thi công từ tháng 03/1996 công trình xử lý nước thải Đầm Rong được khánh thành vào tháng 09/1997. Kinh phí ước tính 324.800 đô la Mỹ. Trong Hội nghị Quốc Tế về Nước tổ chức bởi UNESCO vào tháng 03/1998 ở Paris với chủ đề Nước và sự phát triển bền vững công trình Đầm Rong được giới thiệu ra thế giới.

Đầm Rong có một diện tích là 03 hecta, nó tiếp nhận nước thải sinh hoạt từ các cụm dân cư, lò mổ, bệnh viện, xí nghiệp của nhiều khu phố của Thành phố Đà Nẵng qua hệ thống cống ngầm. Các bể chứa trong đầm này trở thành các thùng rác tự nhiên. Khu vực rất là ô nhiễm tạo ra một nguồn dịch bệnh nguy hiểm do ruồi muỗi, mùi thối và ổ vi khuẩn gây bệnh. Mỗi khi trời mưa to, các bể chứa sẽ đầy nước bắn tràn qua các bờ đất xung quanh đầm, tạo ra một môi trường ô nhiễm nhất, bẩn thỉu nhất của Thành phố.

Dự án Đầm Rong được thiết kế làm thế nào để xử lý nước thải bằng phương pháp lọc tự nhiên, không phải bằng cơ giới, hoặc hoá học. Người ta cho nước thải chảy theo những dòng ngoằn ngoèo và trong quá trình chảy chúng sẽ được lọc sạch. Tại các bể lắng, nước thải sẽ được tập đoàn các vi sinh vật bao gồm vi khuẩn, tảo xanh và tảo lục, phù du động vật xử lý. Vi khuẩn có khả năng phân huỷ và hấp thụ chất hữu cơ. Tảo các loại sản xuất ra oxy ở lớp bề mặt. Phù du động vật giúp làm giảm các chất rắn lơ lửng. Dọc theo chiều dài của các dòng chảy ngoằn ngoèo và các bể, nước chảy nổi trên lại gặp các loại cây thủy sinh, bộ rễ sống chìm, hoặc trôi nổi, thân vươn lên mặt nước như các bèo Nhật Bản (*Eichhornia crassipes*), rau muống (*Ipomea aquatica*), bèo tấm (*Lemna Minor*). Những thực vật này góp phần tạo ra nguồn oxy cho môi trường và thải các chất rắn lơ lửng. Các nước thải sau khi được xử lý sẽ chảy đến bể chứa cuối cùng và từ đó chúng được dẫn đến một hồ khác trước khi đổ ra biển.

Tại Đầm Rong cảnh quan được đẹp hơn là bởi những hàng cây trồng xung quanh bờ và những cái cầu bằng tre hoặc bằng composite bắc qua các con đường ở giữa hoặc với bờ bao quanh.

Công trình xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học tại Đầm Rong này là một thí nghiệm đầu tiên thực hiện ở Việt Nam. Nó còn rất nhiều vấn đề tồn tại cần phải tiếp tục nghiên cứu và giải quyết, như là mùi hôi, muỗi, sự giáo dục quần chúng quanh hồ về ý thức trách nhiệm bảo quản hồ sao cho sạch đẹp và có hiệu quả sử dụng cao.

**BIOTECHNOLOGY AS APPLIED BIOLOGY: INTEGRATION INTO IPM SYSTEMS,
SOCIAL AND ECONOMIC BENEFITS AND RESEARCH NEEDS**

PAUL S. TENG

Monsanto Company

SUMMARY

Advances in knowledge on the basic biology of the inheritance of plant and animal traits (through genetics), the functional processes of organisms (through biochemistry and physiology), and the gene x environment interactions (through breeding and agronomic disciplines) in the past half century have led to an accelerated application of this knowledge to improve agriculture. This knowledge "explosion" is best exemplified by the role of biotechnology in changing the nature and diversity of the main food, feed and fiber crops of the world. Modern biotechnology includes a suite of tools, technologies and their supporting science, which collectively allow the characterization and manipulation of plant genomes. The most well-known of these is the recombinant-DNA technology used for the genetic engineering of foreign genes conferring useful traits into specific agronomic species. An example is introduction of the gene from *Bacillus thuringiensis* into cotton or corn, resulting in plants with the trait of improved resistance to lepidopteran insect pests such as the Asian corn borer. Some authors have predicted that this new millennium will be one for biology, especially applied biology. However, the speed and the magnitude at which this new biology is changing agriculture specifically, and the life sciences in general, has raised concern on the part of some that the integration of the new biotechnology products (like transgenic plants) into current ecologically-sound farming practices (like Integrated Pest Management, or IPM) have received insufficient study. To date, almost 44 Million ha of transgenic crop varieties have been grown worldwide, with almost all expressing pest management traits. There is strong evidence to show the benefits of such plants for the environment, and to support IPM systems in general. In Asia, *B.t.* cotton in China has given small farmers there increased income, and has significantly reduced the loading of insecticides in cotton ecosystems while concurrently, increasing the diversity of faunal food webs in these systems. Farming communities in the *B.t.* cotton areas have also reported significant reductions in cases of pesticide-related ailments. The social, economic and ecological benefits of *B.t.* cotton growing have been overwhelmingly positive. The experience with cotton is likely to be repeated with food crops such as rice, corn and soybeans. However, both *ex ante* (before widespread field releases) and *ex post* (after field releases) research needs to be done on these other crops and their ecosystems to provide the information that will allow a rational deployment of this important new tool from applied biology. Research needs especially to focus on the role that biotechnology can play to help small scale farmers, on its potential benefits to ecosystems and human health, and on its contributions to alleviating rural poverty and food insecurity. More than at any other time, this aspect of applied biology will require creative multi-sectoral partnerships forged between industry, government, academia and social organizations.

NEW FASCICULOL-TYPE STEROL COMPOUNDS FROM HYPHOLOMA FASCICULARE

PETER KLEINWACHTER, UDO LUHMANN, BRIGITTE SCHLEGEL,

STEFAN HEINZE, ALBERT HARTL, UDO GRAFE

Hans-Knoll-Institute of Natural Products Research,

Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena, Germany

TRINH TAM KIET

The Centre for Mycological Research, College of Natural Sciences,

Key word index - *Hypholoma fasciculare*, new fasciculol-type sterols, isolation and structure elucidation of fasciculic acids D, E and F, inhibition of 3α -hydroxysteroid dehydrogenase

I. INTRODUCTION

Fasciculols and fasciculic acids are lanostane-type sterol metabolites from the mushroom *Hypholoma fasciculare* which is a rich source of homologous structures (Fig. 1). The fungus is a holarctic species of the genus *Hypholoma* occurring frequently in Vietnam, too. Nine derivatives of the basic lanostane skeleton have been reported which are discernible by the side chain at either C-2 or C-3 (R_1 or $R_2 = 3\alpha$ -hydroxy- 3β -methylglutaric acid (Y); N-(3α -hydroxy- 3β -methylglutaryl)-glycine (X) or its methylester (X) and hydroxyl substituents at C-12 (R_3) and/or C-21^{1,2,3}). Recent work on these compounds focused on their toxicity⁵, activity as calmodulin antagonists^{2,6,7} and plant growth inhibitors^{8,9,10}. In the course of a screening for new fungal metabolites an extract of *Hypholoma fasciculare* by HPLC-coupled NMR spectroscopy and electrospray mass spectrometry. Comparison of the mass spectrometric and ¹H NMR data suggested the occurrence of the three hitherto not reported fasciculol-type compounds 1, 2 and 3 (Fig. 1). Here we describe their isolation, structure and biological activity.

II. RESULTS AND DISCUSSION

1. Discovery and isolation

Freshly harvested fruit bodies of *Hypholoma fasciculare* were extracted with ethyl acetate with ethyl acetate. The extract was analysed by TLC, LC-MS and LC-NMR. In addition to fasciculols E, F, and D and fascicularic acid B (Fig. 1), three minor compounds were disclosed which appeared as new due to their ESI mass spectrometric data ($[M+H]^+$), and their ¹H chemical shift and ¹H, ¹H-coupling pattern in the LC-coupled NMR. Thus, in the ¹H NMR spectra of 1 and 2 the methoxyl proton signal was missing which is a characteristic of the fasciculols E and F. But otherwise the other ¹H NMR data of 1 and 2 were nearly identical. A third metabolite (3) was detected due to the upfield chemical shift and the coupling pattern of the H-12 and H-21 protons which was caused by the presence of hydroxyl substituents. ESI-MS of 3 (m/z 653 ($[M+H]^+$)) suggested that there is a 3α -hydroxy- 3β -methylglutaryl substituent at O- 3β position, (see Fig. 1: Y).

1, 2 and 3 were isolated by several subsequent steps of chromatographical purification. The residue of the ethyl extract of *Hypholoma fasciculare* was chromatographed first on a silica gel 60 column (6 x 40 cm; Merck 0.063 - 0.1 mm, CHCl₃, CHCl₃/MeOH 95.5, 9:1 and 8:2, each 5 column volumina). Thereafter the compounds were purified by preparative HPLC (Spherisorb RP₁₈ ODS-2,5 μ m. 2.5cm x 2.5cm, 10ml/min, 210nm, gradient water to 83% acetonitrile, 25min, subsequently isocratic run with 83% acetonitrile). The purified compounds 1, 2, and 3 were subjected to physico-chemical analysis.

2. Biological activities of 1, 2, and 3

Low antimicrobial activity was established against some Gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (MIC > 500 $\mu\text{m}/\text{ml}$) but not against Gram-negative bacteria and fungi. However, 1, 2 and 3 inhibited moderately the 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase with $\text{IC}_{30} = 14 \mu\text{M}$.

Occurrence of 1, 2 and 3 in related mushrooms such as *Hypholoma sublaterium* and *Hypholoma capnoides*:

Through *H. sublaterium* is capable of producing fasciculols B, C, D and F there was no evidence suggesting the presence of 1, 2 and 3 in this organism. *H. capnoides* was incapable of producing fasciculols.

The new metabolites 1, 2 and 3 (fasciculic acids D, E and F) enlarge the spectrum of the known fasciculol-type sterol compounds from *Hypholoma* species. their occurrence in *H. fasciculare* could be predicted due to the production of closely related compounds such as fasciculols A-F and fasciculic acids A-C. however, sensitive analytical methods such as LC-NMR and MS were suitable to discover the presence of these new minor components amongst the bulk of recurrent metabolites. The optical rotations of 1, 2 and 3 were similar to those reported for fasciculol D, fasciculol E and fasciculic acid B²) suggesting that there is an identical stereochemistry.

III. EXPERIMENTAL

1. Analytical methods

Mp. uncorr.; NMR, 300 MHz instruments (Bruker AVANCE DPX 300 and Bruker AVANCE DRX 500); HREI-MS on an AMD 402 instrument (AMD Intectra, Harpstedt near Bremen, Germany), electrospray-MS (ESI-MS) on a triple quadrupole instrument Quattro (VG Biotech, Altrincham, England) and a Finnigan LCQ instrument equipment with an ion-trap mass analyser; optical rotation on a Propol polarimeter (Kernchen Optics, Seelze, Germany), IR spectra on Shimadzu FT IR 470 spectrometer, UV-VIS spectra on a Beckman DU 640 scanning instrument (Beckman, USA).

2. Isolation of 1, 2 and 3

Fruit bodies of *Hypholoma fasciculare*, *H. sublaterium* and *H. capnoides* were collected in the forestal region of Hummelshain/Neustadt (Thuringia, Germany) as well as in the Nord Vietnam. 2.5 kg of wet fruit bodies were extracted threetimes by 5 l ethyl acetat. The extract was dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness.

The residue obtained from the extract of *H. fasciculare* was subjected to the top of a column (silica gel 60, 0.063 - 0.1mm, Merck, 5cm x 40 cm) and elution occurred by stepwise addition of 5 column volumes of CHCl_3 and $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:1, 9:1, 8:2 v/v). The eluate fractions were checked by TLC (silica gel 60 aluminium sheets, Merck, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1 v/v). 1, 2 and 3 were visualized by bluish staining with 3% vanillin in conc. H_2SO_4 (R_f : 0.35, 0.2 and 0.13 respectively, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 v/v). Final purification was achieved by preparative HPLC (Spherisorb RP₁₈ ODS-2; 2.5 x 2.5 cm, 5 μm , 10ml/min, 210 nm, gradient water to 83 % acetonitrile, 15 min, subsequently isocratic run with 83 % acetonitrile). The purity of the fractions thus obtained was checked by analytical HPLC (GROM-SIL RP₁₈ ODS-0 AB, 4 x 250 mm, 3 μm , 0.5 ml/min, 210 nm, acetonitrile/ H_2O , 83:17, 0.1%TFA).

3. Compound 1

Colorless solid, mp. 124 - 126^oC (uncorrected); $[\alpha]_D^{25} + 11.5$ (c=0.5mg/ml, MeOH), ESI-MS: m/z 710 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 732 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HRFAB-MS: m/z 732.44269 (calcd. 732.4309 for $\text{C}_{38}\text{H}_{63}\text{NO}_{11}\text{Na}$; intensity 10%), m/z 305.1 (100%), m/z 220.6(60%). IR $_{\text{vmax}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3415, 2965, 1721, 1653, 1542, 1457, 1375, 1199, 1076, 1037, UV $_{\lambda\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm)log ϵ : 205 83.71). ¹H NMR (CD_3OD): δ 1.23 ($\text{H}_{\text{A}-1}$, m), 2.10($\text{H}_{\text{B}-1}$, m), 5.02 (H-2,t,d, 10.8, 4.3Hz), 3.20 (H-3, d, 10.8 Hz), 1.20(H-5, br), 1.74 ($\text{H}_{\text{A}-6}$, m), 1.56 ($\text{H}_{\text{B}-6}$, m), 2.09 (2H-7, m), 1.98 ($\text{H}_{\text{A}-11}$, br), 2.70 ($\text{H}_{\text{B}-11}$, br), 4.01 (H-12, dd, 9.1, 2.3 Hz), 1.21 ($\text{H}_{\text{A}-15}$, m), 1.74 ($\text{H}_{\text{B}-15}$, m), 2.08 ($\text{H}_{\text{A}-16}$, m), 1.44 ($\text{H}_{\text{B}-16}$, m), 2.42 (H-17, q, 3.4 Hz), 0.63 (3H-18, s), 1.10 (3H-19, s), 1.38 (H-20, m), 3.79 ($\text{H}_{\text{A}-21}$, d, 11.6 Hz), 3.69 ($\text{H}_{\text{B}-21}$, d, 11.6 Hz), 1.65 ($\text{H}_{\text{A}-22}$, m), 1.43 ($\text{H}_{\text{B}-22}$, m), 1.42 ($\text{H}_{\text{A}-23}$, m), 1.55 ($\text{H}_{\text{B}-23}$, m), 3.25 (H-24, dd, 10.2, 2.0 Hz), 1.13 (3H-26, s), 1.16

(3H-27, s), 1.06 (3H-28, s), 1.06 (3H-29, s), 0.88 (3H-30, s), 2.65 (H_A-2', d, 14.2 Hz), 2.69 (H_B-2', d, 14.2 Hz), 1.39 (3H-4', m), 2.57 (H_A-5', d, 14.2 Hz), 2.61 (H_B-5', d, 14.2 Hz), 3.91 (H_A-7', d, 17.9 Hz), 3.95 (H_B-7', d, 17.9 Hz), ¹³C NMR (CD₃OD): δ 41.75 (C-1), 74.43 (C-2), 80.88 (C-3), 40.62 (C-4), 51.84 (C-5), 19.30 (C-6), 27.52 (C-7), 136.68 (C-8), 133.89 (C-9), 39.31 (C-10), 33.12 (C-11), 74.30 (C-12), 51.08 (C-13), 51.19 (C-14), 32.82 (C-15), 28.83 (C-16), 39.21 (C-17), 17.35 (C-18), 20.11 (C-19), 44.23 (C-20), 61.95 (C-21), 28.04 (C-22), 29.37 (C-23), 79.43 (C-24), 73.84 (C-25), 24.94 (C-26), 25.67 (C-27), 24.16 (C-28), 28.94 (C-29), 17.15 (C-30), 172.71 (C-1'), 47.07 (C-2'), 71.48 (C-3'), 27.98 (C-4'), 47.22 (C-5'), 174.04 (C-6'), 41.75 (C-7'), 172.94 (C-8').

4. Compound 2

Colorless solid, mp. 122 - 125^oC (uncorrected); [α]_D²⁵+15.4 (c=0.4mg/ml, MeOH), ESI-MS: m/z 694 [M+H]⁺, 716 [M+H]⁺, HRFAB-MS: m/z 716.4618 (calcd. . 4870 for C₃₈H₆₃NO₁₀Na; intensity 10%) m/z 304.0 (20%), m/z 220.6 (100%). IR λ_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3410, 2955, 1726, 1679, 1625, 1459, 1438, 1378, 1343, 1251, 1232, 1138, 1109, 1027. uv λ_{max}^{MeOH} nm (log ε): 205 (3.72). ¹H NMR (CD₃ OD): δ 1.25 (H_A-1, m), 2.09 (H_B-1), 5.02 (H-2), 3.21 (H-3, d, 10.7 Hz), 1.21 (H-5, br), 1.57 (H_A-6, m), 1.74 (H_B-6, m), 2.10 (2H-7, m), 2.02 (H_A-11, br), 2.62 (H_B-11, br), 4.00 (H-12, dd, 7.7, 1.5 Hz), 1.16 (H_A-15, m), 1.68 (H-15, m), 2.04 (H_A-16, m), 1.38 (H_B-15, m), 2.22 (H-17, q, 9.2 Hz), 0.65 (3H-18, s), 1.10 (3H-19, s), 1.43 (H-20, m), 1.03 (3H-21, d, 6.3 Hz), 1.34 (H_A-22, m), 1.52 (H_B-22, m), 1.39 (H_A-23, m), 1.53 (H_B-23, m), 3.23 (H-24, dd, 10.6, 2.0 Hz), 1.13 (3H-26, s), 1.16 (3H-27, s), 1.09 (3H-28, s), 1.06 (3H-29, s), 0.88 (3H-30, s), 2.65 (H_A-2', d, 14.2 Hz), 2.69 (H_B-2', d, 14.2 Hz), 1.39 (3H-?), 2.57 (H_A-5', d, 14.2 Hz), 2.6 (H_B-5', d, 14.2 Hz), 3.91 (H_A-7', d, 17.9 Hz), 3.95 (H_B-7', d, 17.9 Hz),

¹³C NMR (CD₃OD): δ 42.03 (C-1), 74.51 (C-2), 80.88 (C-3), 40.65 (C-4), 51.78 (C-5), 19.33 (C-6), 27.42 (C-7), 136.77 (C-8), 133.56 (C-9), 39.25 (C-10), 34.53 (C-11), 73.57 (C-12), 50.61 (C-13), 50.74 (C-14), 33.22 (C-15), 28.98 (C-16), 44.10 (C-17), 16.98 (C-18), 20.25 (C-19), 37.57 (C-20), 18.00 (C-21), 34.39

(C-22), 29.02 (C-23), 79.78 (C-24), 73.91 (C-25), 25.0 (C-26), 25.62 (C-27), 25.26 (C-28), 28.96 (C-29), 17.17 (C-30), 172.71 (C-1'), 47.09 (C-2'), 71.48 (C-3'), 27.96 (C-4'), 47.22 (C-5'), 174.04 (C-6'), 41.74 (C-7'), 172.95 (C-8').

5. Compound 3

Colorless solid, mp. 109 - 111^oC (uncorrected); [α]_D²⁵ 14.7 (c= 0.3mg/ml, MeOH); HRESI-MS: m/z 651.4116 ([M-H]⁻, calcd. .4187 for C₃₆H₅₉O₁₀). IR λ_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3420, 2945, 1698, 1677, 1454, 1425, 1375, 1200, 1138, 1083, 1033. uv λ_{max}^{MeOH} nm: 207. ¹H NMR (CD₃ OD): δ 1.23 (H_A-1, m), 2.10 (H_B-1, m), 5.01 (H-2, td, 10.8, 4.3 Hz), 3.19 (H-3, d, 10.8 Hz), 1.20 (H-5, br), 1.74 (H_A-6, m), 1.57 (H_B-6, m), 2.09 (2H_A-7, m), 1.96 (H_A-11, br), 2.70 (H_B-11, br), 4.00 (H-12, dd, 8.9, 2.5 Hz), 1.21 (H_A-15, m), 1.75 (H_B-15, m), 2.08 (H_A-16, m), 1.44 (H_B-16, m), 2.42 (H-17, q, 9.6 Hz), 0.63 (3H-18, s), 1.10 (3H-19, s), 1.38 (H-20, m), 3.69 (H_A-21, d, 11.7 Hz), 3.79 (H_B-21, d, 11.7 Hz), 1.43 (H_A-22, m), 1.65 (H_B-22, m), 1.55 (H_A-23, m), 1.42 (H_B-23, m), 3.25 (H-24, dd, 10.1, 1.9 Hz), 1.13 (3H-26, s), 1.16 (3H-27, s), 1.06 (3H-28, s), 1.05 (3H-29, s), 0.88 (3H-30, s), 2.71 (2H-2', s), 1.40 (3H-4', s), 2.64 (H_A-5', d, 15.3 Hz), 2.68 (H_B-5', d, 15.3 Hz), ¹³C NMR (CD₃ OD): δ 41.83 (C-1), 74.31 (C-2), 80.93 (C-3), 40.65 (C-4), 51.85 (C-5), 19.30 (C-6), 27.53 (C-7), 136.68 (C-8), 133.90 (C-9), 39.30 (C-10), 33.09 (C-11), 74.31 (C-12), 51.08 (C-13), 51.20 (C-14), 32.82 (C-15), 28.83 (C-16), 39.22 (C-17), 17.35 (C-18), 20.11 (C-19), 44.22 (C-20), 61.94 (C-21), 28.04 (C-22), 29.38 (C-23), 79.43 (C-24), 73.84 (C-25), 24.95 (C-26), 25.67 (C-27), 24.17 (C-28), 28.95 (C-29), 17.16 (C-30), 172.70 (C-1'), 46.71 (C-2'), 70.87 (C-3'), 27.90 (C-4'), 45.87 (C-5'), 174.87 (C-6').

Assay of 3α-hydroxysteroid dehydrogenase. The NADPH-dependent reduction of 5β-dihydrocortison ⁽¹¹⁾ by 3α-hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni* (Sigma) was measured in presence of increasing concentration of **1**, **2** and **3**.

ACKNOWLEDGEMENT

We gratefully acknowledge support given to this work by FCI Frankfurt a.M., Germany. The skillful technical assistance of Mrs. H. Heinecke, A. Perner, C. Koch and C. Karkowski is appreciated. This work was supported by BMBF/DLR (Bonn, Germany; Project VIE 008/97).

REFERENCES

- 1 Turner, B.: Fungal Metabolites II, Academic Press, New York, London, pp. 321-326
- 2 Takahashi, A., Kusano, G., Ohta, T., Ohizumi, Y. and Nozoe, S. (1989) Chem. Pharm. Bull. 37, 3247
- 3 Kikuchi, T., Kanaoka, M., Hanagaki, S. and Kadota, S. (1979) Chemistry Letters (Japan) 1979, 1495
- 4 De Bernardini, M., Mellerio, G., Vita-Finzi, P. and Fronza, G., Kocor, M. and Pyrek, J. (1981) J. Nat. Prod. 44, 351
- 5 Suzuki, K., Fujimoto, H. and Yamazaki, M. (1983) Chem. Pharm. Bull. 31, 2176
- 6 Kubo, I., Matsumoto, A., Kozuoka, M. and Wood, W.F (1985) Chem. Pharm. Bull. 33, 3821
- 7 Nozoe, S. Takahashi, A. and Ohta, T. (1993) Chem. Pharm. Bull. 41, 1738
- 8 Ikeda, M., Sato, Y., Izawa, M., Sassa, T. and Miura, Y (1977) Agric. Biol. Chem. 41 1539
- 9 Ikeda, M., Watanabe, H., Hyakawa, A., Sato, K., Sassa, T. and Miura, Y (1977) Agric. Biol. Chem. 41 1543
- 10 Ikeda, M., Niwa, G., Tohzama, K., Sassa, T. and Miura, Y. (1977) Agric. Biol. Chem. 41, 1803
- 11 Penning, T.M. (1985) J. Pharmaceut. Sci. 74, 651

TÓM TẮT

Những hợp chất fasciculol dạng mới **1**, **2** và **3** đã được phát hiện trong những chiết xuất của nấm *Hypholoma fasciculare* bởi những kỹ thuật LC-NRM và MS. Sự sàng lọc và nghiên cứu cấu trúc được trình bày: Fasciculol và việc sản sinh acid fasciculic của *H. fasciculare* đã được so sánh với sự tương ứng ở *H. sublaterium* và *H. capnoides*. Hợp chất **1** và **2** đã kìm hãm cấu trúc 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (IC₅₀ 14.0 μ M).

SUMMARY

New fasciculol-type sterol compounds **1**, **2** and **3** were discovered in extracts of the mushroom *Hypholoma fasciculare* by LC-NRM and MS methods. Isolation and structure elucidation is reported. Fasciculol and fasciculic acid production of *H. fasciculare* was compared with that of *H. sublaterium* and *H. capnoides*. **1** and **2** inhibited moderately 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (IC₅₀ 14.0 μ M).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Structures of fasciculols A-F, fascicularic acids A-C and new metabolites **1** (fascicularic acids D), **2** (fascicularic acids E) and **3** (fascicularic acids F)

GENETIC ENGINEERING IN THE DIAGNOSIS OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

NGUYEN DINH PHUC*, DAI DUY BAN**, TRUONG NAM HAI**, et al.

* Hanoi Medical University. ** Institute of Biotechnology.

I. PROBLEM STATEMENT

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a malignant tumor arising in the epithelial lining of Nasopharyngeal space. It is the most common cancer of digestive and upper respiratory tract and in the same time, the most frequent in Vietnam. NPC is related to geographic area, nutritional status, ethnic particularities, and genetic make-up.

Studies on hypothetic causes of NPC have suggested that in fermented food and drink, there is the presence of Nitrosamide, an agent that can cause gene mutation, and, in the other hand, familial genetic make-up or viruses are such important factors the predispose the development of the condition.

In recent years, Epstein – Barr virus (EBV) has been detected in NPC tissues and immunologic testing can reveal anti – EBV antibodies (IgA, IgG/VCA-EA-EBNA). Thus, early diagnosis and prognosis of NPC can be made.

The Department of Oncology, Central Institute of Oto – Rhino – Laryngology, has examined and treated about 200 – 300 NPC patients annually, of which, two-third were in advanced stages, restricting considerably the therapeutic outcome. By this reason, during recent years, the Institute of Biotechnology (National Center for Natural Sciences and Technology) has established a steady genetic engineering to diagnose the disease on the basis of EBV gene detection in NPC epithelial cells. The Central Institute of ORL, has applied this technique in the diagnosis of NPC from EBV origin, aiming at confronting with other diagnostic approaches for obtaining an early and accurate definite diagnosis of NPC.

II. MATERIALS AND METHODS

1. Materials

- Samples of NPC obtained from biopsy of patient with clinical diagnosis of NPC (performed by Dr. Nguyen Dinh Phuc, Central Institute of ORL).

- DNA isolation and PCR reagent supplied by Perkin – Elmer manufactures (USA).

- Analysis performed at the Institute of Biotechnology.

- Materials and equipment for clinical diagnosis and histologic samples have been supplied and performed at the Central Institute of ORL.

2. Methods

a. DNA isolation and assay

DNA obtained from NPC biopsy sample has been isolated according to the method previously established¹ by the study group.

b. Polymerase chain reaction for the detection of EBV gene

The presynthetic primer couple TH1 and TH2 containing 25 bases have been constructed, namely:

TH1: 5' – AGCCAATTGGTCAGTTCTAGGGAGGG – 3'

TH2: 5' – GCTTGGATGGCGGAGTCAGCGACGG – 3'

Running condition of polymerase chain reaction with the above mentioned primer couple has been described in previously published study²

c. Electrophoresis on agarose gel

DNA product isolated from the tumor, as well as PCR product have been controlled by electrophoresis on 1% agarose gel.

d. Clinical and laboratory examinations

In order to confront with previous diagnostic approaches, we have designed a form of case – record for NPC with details of physical and functional examination, laboratory testing, histopathologic examination, endoscopy, etc.

III. RESULTS AND DISCUSSION

1. Findings in DNA isolation from biopsy sample of NPC

DNA isolated from biopsy sample of tumor has been determined its purity by spectrophotometry and electrophoresis on agarose gel.

2. Findings in EBV gene detection by polymerase chain reaction

PCR product has been run using primer couple TH1 and TH2 and template of 100 ng DNA isolated from tumor biopsy. 15 µL of PCR product have been controlled by electrophoresis on 1% agarose gel.

3. Confrontation between genic diagnosis and other diagnostic procedures

Results in confrontation between genic diagnosis basing on EBV gene detection using PCR and clinical combined with histopathologic diagnosis on 14 patients are shown on the following table:

Table 1. Confrontation between EBV genic diagnosis using PCR and other diagnostic procedures in Nasopharyngeal carcinoma

No	Patients' name	Age (years)	Clinical and histopathologic		PCR EBV genic diagnosis	Comparison between 2 methods
			Clinical	Histopathologic		
1	Vu Thi C.	49	Physical signs of NPC (+)	Undifferentiated epithelioma (+)	EPV gene (+)	Positive coincidence (+)
2	Hoang Huy H.	63	(+)	(+)	(+)	(+)
3	Trieu Quyet T	30	(+)	Malignant lymphoma	(+)	(+)
4	Nguyen Duc K.	52	(+)	(+)	(+)	(+)
5	Vu Van P.	47	(+)	(+)	(+)	(+)
6	Le Van D.	47	(+)	(+)	(+)	(+)
7	Ngo Duy T.	40	(+)	(+)	(+)	(+)
8	Nguyen Thi V.	43	(+)	(+)	(+)	(+)
9	Nguyen Van T.	68	(+)	(+)	(+)	(+)
10	Do Thi C.	43	(+)	(-)	(+)	Non - coincidence
11	Nguyen Van K.	45	(+)	(+)	(+)	(+)
12	Nguyen Van H.	43	(+)	(+)	(+)	(+)
13	Le The M.	58	(+)	(+)	(+)	(+)
14	Phan Vinh D.	57	(+)	(+)	(+)	(+)

From the above table, some observations can be presented as follows:

1. There are 12 positive coincidences between genic and histopathologic/clinical diagnostic. Among these cases, there is a patient with EBV (+) in blood analysis, i.e patient No 4.

2. There is a case with positive coincidence, but with histopathologic finding of malignant lymphoma and EBV genic diagnostic (+).

3. There is a non – coincidence case with histopathologic finding of no cancer and unclear clinical findings, however, EBV genic diagnostic is positive (patient No 10).

Three possibilities could occur:

- Biopsy has been made at inappropriate site. Repeated biopsies should be made at different time to determine more accurately whether cancer is present.

- Finding of EBV gene could be false positive. The procedure should be repeated parallelly with biopsy, in eliminating unfavourable factors the can lead to erroneous interpretation of polymerase chain reaction.

- EBV gene could be true in PCR but clinical manifestation is still not evident. Long – term follow – up of patient is required to reveal the onset of cancer.

IV. CONCLUSION

In sum, among 14 patients presented at the Central Institute of Oto – Rhino – Laryngology with Nasopharyngeal carcinoma, all cases showed EBV gene positive through polymerase chain reaction findings, one of which even showed EBV (+) from blood analysis. Histopathologic findings were positive in only 13 cases, the negative case required further follow – up during clinical progression.

REFERENCES

1. Dai Duy Ban et al. "Study on genic diagnosis of some viral diseases in Vietnam". Medical Biochemistry: Publication of the Vietnam General Association of Medicine and Pharmacy, 1997, pp 1-12.

2. Truong Nam Hai et al. Epstein – Barr virus detection using polymerase chain reaction with TH1 and TH2 primer couple. Review of Medical Study No 2 (2), 1997.

3. Lu Cam Van. "Relationship between clinical and histopathologic findings in Nasopharyngeal carcinoma". Thesis of Philosophiae Doctor of Medicine, 1990.

SUMMARY

GENETIC ENGINEERING IN THE DIAGNOSIS OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

NGUYEN DINH PHUC * DAI DUY BAN**, TRUONG NAM HAI**, et al.

** Hanoi Medical University. ** Institute of Biotechnology.*

In the present study, 13 cases of Nasopharyngeal carcinoma were diagnosed on the basis of EBV gene detection using polymerase chain reaction. Confrontation with histopathologic examination has shown coincidence in 13 cases with non-coincidence, EBV gene detection has been positive by PCR but NPC cells have been not detected histologically. Further follow-up of clinical pregression should be made in order to obtain accurate diagnosis or to determine the clinical onset of NPC.

LƯU GIỮ CHỦNG VI KHUẨN TRONG NITƠ LỎNG

+

NGUYỄN NGỌC QUYÊN, NGUYỄN THU HÀ, TRẦN TÚ THUY

Viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lưu giữ trong nitơ lỏng các chủng vi khuẩn cố định đạm và phân giải lân với các chủng *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus polymyxa*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas striata* có thể duy trì khả năng sống sót của các chủng ít nhất là 36 tháng, hoạt tính sinh học của chủng giống không bị ảnh hưởng trong quá trình bảo quản. Lưu giữ trong nitơ lỏng đơn giản và thuận tiện có thể thay thế cho lưu giữ đông khô trong việc bảo quản chủng giống vi khuẩn này.

Các chủng vi khuẩn có thể được bảo quản theo nhiều phương pháp khác nhau, theo đặc tính riêng biệt mỗi loài. Dẫu rằng không có phương pháp riêng biệt nào có thể thành công cho tất cả các loài nhưng riêng bảo quản nitơ lỏng có thể áp dụng rộng rãi vì nó có khả năng bảo quản thành công nhiều dạng vật chất sinh học. Hàng loạt yếu tố khác nhau có ảnh hưởng đến khả năng sống sót của vi khuẩn trong quá trình bảo quản trong nitơ lỏng (như việc lựa chọn môi trường làm băng, mật độ tế bào, thời gian làm băng và tan băng, hồi phục tế bào...)(1,2,3,4,5,6). Báo cáo đề cập tới những kết quả nghiên cứu đầu tiên đánh giá tiềm năng bảo quản dài hạn nitơ lỏng một số chủng vi khuẩn cố định nitơ và phân giải lân.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

2.1. Chủng vi khuẩn, môi trường và điều kiện nuôi cấy

Chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu (bảng 1)

Bảng 1

Các chủng vi khuẩn dùng trong nghiên cứu

TT	Tên chủng giống	Ký hiệu	Nguồn gốc	Hoạt tính sinh học
1	<i>Bradyrhizobium Jap.</i>	RG57	LB Nga	Cố định nitơ cộng sinh
2	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	RV11	LB Nga	Cố định nitơ cộng sinh
3	<i>Bacillus polymyxa</i>	B14	Ấn độ	Phân giải photphat
4	<i>Azotobacter vinelandii</i>	AT25	Viện CNSH	Cố định nitơ tự do
5	<i>Azotobacter</i>	AT19	LB Nga	Cố định nitơ tự do
6	<i>chroococcum</i>	Az12	LB Nga	Cố định nitơ hội sinh
7	<i>Azospirillum sp D.II.8</i>	Az14	LB Nga	Cố định nitơ tự do
8	<i>Azospirillum brasilenze</i> <i>Pseudomonas striata</i>	Ps12	Ấn độ	Phân giải photphat

Các chủng được kiểm tra độ thuần và hoạt tính trước khi đưa vào nghiên cứu phương pháp bảo quản.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Xác định mật độ tế bào vi khuẩn theo phương pháp pha loãng, nuôi cấy gạt trên môi trường thạch đĩa.

2.2.2 Xác định hoạt tính Nitrogenaza (khả năng cố định nitơ) bằng phương pháp khử Axetylen trên máy sắc ký khí.

2.2.3 Xác định khả năng phân giải photphat bằng phương pháp nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường có nguồn photphat là $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Đo đường kính vòng phân giải sau 3-5 ngày nuôi cấy 20-30°C

2.2.4 Lưu giữ, bảo quản chủng giống vi khuẩn

2.2.4.1. Giữ trên môi trường thạch: tùy từng loại chủng được nuôi cấy trên môi trường thích hợp. Sau khi tế bào đã phát triển ổn định thì bắt đầu đưa ống giống vào bảo quản ở nhiệt độ 4-10°C.

2.2.4.2. Giữ ở dạng đông khô: Làm thăng hoa phân nước có trong môi trường trong điều kiện chân không. Giống được bảo vệ trong môi trường sữa tách bơ 10%. Môi trường bảo vệ cần được thanh trùng ở 121°C trong 15 phút. (đã tiến hành thí nghiệm các phương pháp khử trùng sữa như: Pasteur, Tyldan, hơi nước). Trước khi tiến hành thí nghiệm các chủng giống phải được cấy trên môi trường đặc và nuôi ở những điều kiện thích hợp sau một thời gian để giống phát triển tốt.

Bảo quản mẫu giống đông khô ở nhiệt độ 4-10°C, nhiệt độ phòng. Định kỳ kiểm tra độ thuần, đặc điểm hình thái sinh lý, hoạt tính sinh học mẫu giống bảo quản.

2.2.4.3. Giữ trong nitơ lỏng:

Các chủng giống vi khuẩn phát triển ổn định, sinh khối được hoà loãng trong môi trường bảo vệ sữa loại mỡ 10%, hoặc nước cất vô trùng. Phân đều vào các ampun 2ml, đưa nhanh vào bình đựng mẫu có chứa nitơ lỏng, hoặc để mẫu đông lạnh -20°C trong 4-6 giờ rồi chuyển vào nitơ lỏng.

Kiểm tra định kỳ hoạt tính sinh học các mẫu vi khuẩn, xác định độ sống sót theo thời gian bảo quản trong nitơ lỏng: trước bảo quản, sau 7 ngày, sau 1, 3, 6, 9, 12, 18, 36 tháng sau khi mẫu được làm tan băng trong nồi cách thuỷ ở T° 40-45°C trong 10-15 giây trước khi kiểm tra.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lưu giữ trong nitơ lỏng

Mật độ vi khuẩn của tất cả các mẫu ampun có chứa vi khuẩn trước lưu giữ có chứa khoảng 10^8 - 10^{10} tế bào/ml; Riêng chủng *AT25*, *AT19* và *Az12* là 10^7 tế bào/ml, riêng *Ps12* là 10^{11} tế bào/ml. Khả năng sống sót của các mẫu ngay sau đông băng trong nitơ lỏng và sau 7 ngày tương đối ổn định, hầu như không bị giảm,

Lưu giữ trong nitơ lỏng cho phép duy trì khả năng sống sót của vi khuẩn lâu hơn 36 tháng với cả 8 chủng nghiên cứu. Mật độ tế bào các chủng *RG57*, *RV11*, *AT19* cũng bị giảm từ 10 - 100 lần, riêng chủng *Az12*, *Az14*, *Ps12* khả năng giảm lớn hơn 100 lần. Riêng chủng *AT25* cho khả năng sống sót tương đối ổn định, sau 36 tháng bảo quản vẫn đạt mật độ tế bào $1,04 \times 10^7$ tế bào/ml, đảm bảo mật độ tế bào cho phép cấy chuyển trên môi trường dinh dưỡng. Như vậy lưu giữ trong nitơ lỏng cho phép bảo quản thành công một số chủng vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn cố định ni tơ và phân giải photphat. Độ sống sót của các chủng này khá ổn định sau khi gây sốc “đông băng” đầu tiên. Hoạt tính sinh học không thay đổi trong quá trình lưu giữ (bảng 2). Độ sống sót của các chủng vi khuẩn trong quá trình bảo quản với môi trường bảo vệ sữa loại mỡ 10% cao hơn môi trường nước cất.

Quy trình bảo quản chủng vi khuẩn trong ni tơ lỏng đơn giản và nhanh chóng, không cần hoá chất đắt tiền.

3.2. So sánh 3 phương pháp bảo quản: thạch nghiêng, đông khô, nitơ lỏng (đồ thị 1,2)

Lưu giữ ở dạng thạch nghiêng: Lưu giữ chủng vi khuẩn trên môi trường thạch thường xảy ra hiện tượng mất nước của môi trường. Các chủng giống có thể bị chết. Hơn nữa việc giữ trên môi trường thạch nghiêng thường bị nhiễm tạp, mất nhiều thời gian do phải cấy chuyển nhiều lần, (định kỳ 1-3 tháng phụ thuộc vào chủng giống). Tuy nhiên cho đến nay phương pháp nuôi cấy thạch nghiêng vẫn được coi là phương pháp thích hợp, đơn giản, có thể sử dụng lưu giữ, bảo quản nhiều nhóm chủng giống vi khuẩn.

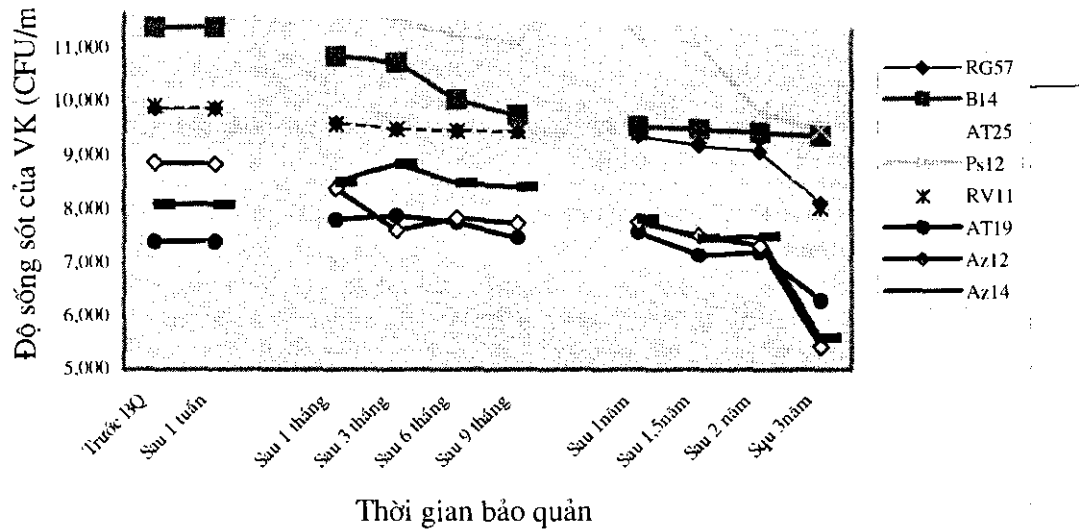
Lưu giữ đông khô: Các tài liệu, công trình nghiên cứu cho rằng đông khô là phương pháp thích hợp để bảo quản dài hạn các chủng giống vi khuẩn. Phương pháp đông khô có thể lưu giữ chủng giống ổn định trong nhiều năm mà không cần điều kiện bảo dưỡng đặc biệt, sự phân phối chủng giống dễ dàng, nhưng lại không thích hợp với một số chủng như các chủng cố định nitơ, mặc dù có sử dụng một số chất bảo vệ như sữa loại mỡ 10-20%, mật ong hoặc các loại đường inositol, raffinose 5-10% nhưng khả năng sống sót của chủng vi khuẩn trong quá trình bảo quản thấp, một số đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá bị thay đổi (kích thước tế bào, hệ enzym, sự có mặt của plasmid, poly B-hydroxybutyrat, không tạo bào tử, dạng *Cyst.*...). do các chủng này quá nhạy cảm với quá trình làm khô. Nhưng Các mẫu giống vi khuẩn cố định nitơ và phân giải photphat, được làm đông khô ở $t^{\circ}4-10^{\circ}C$ cho phép duy trì khả năng sống sót của chủng vi khuẩn lên tới 18 tháng lâu hơn so với lưu giữ trên môi trường thạch (6 tháng). Sau đông khô mật độ tế bào bị giảm, điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây(1,2). Các chủng vi khuẩn *Ps12*, *B14*, *AT25* được làm đông khô và bảo quản ở $t^{\circ} 4-10^{\circ}C$ cho khả năng sống sót cao hơn nhiệt độ phòng, chúng được lưu giữ đông khô, giữ được hoạt lực ổn định trong thời gian dài hơn 18 tháng.

Lưu giữ trong nitơ lỏng thật sự được coi như một kỹ thuật tiến tiến lưu giữ lâu dài nhóm vi khuẩn cố định nitơ và phân giải lân. Quá trình chuẩn bị cũng được đơn giản hoá so với một số kỹ thuật lưu giữ khác như đông khô, đặc điểm sinh học, đặc tính sinh học chủng giống vẫn giữ được ổn định. Phương pháp này tuy tốn kém trang thiết bị sản xuất và dụng cụ đựng mẫu nhiệt độ thấp, nhưng có thể áp dụng rộng rãi để bảo quản virus, *Mycoplasma*, vi khuẩn, nấm men, nấm sợi, vi khuẩn lam .

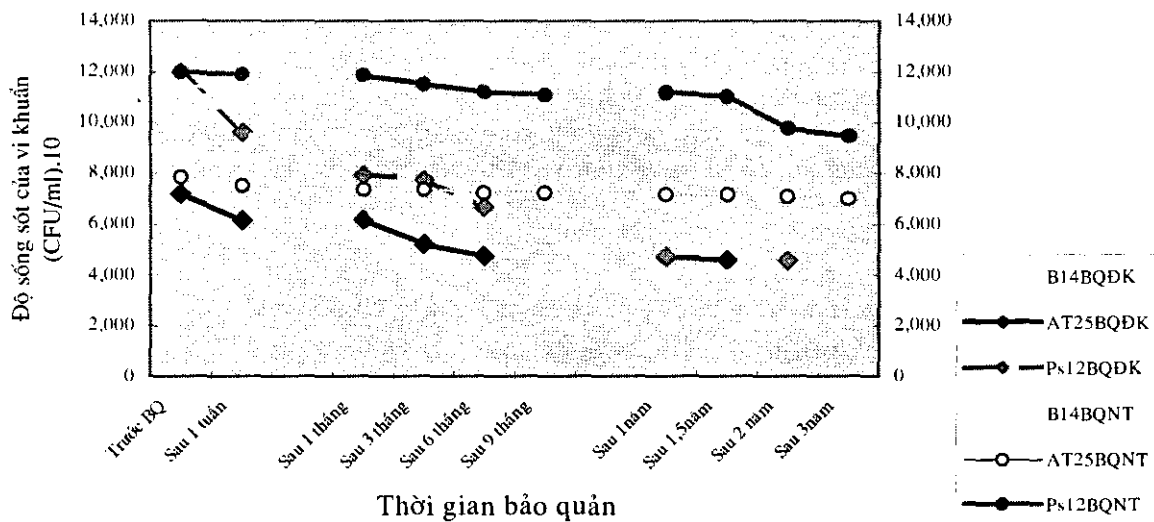
Bảng 2

Hoạt tính sinh học của các chủng giống trước và sau bảo quản

Chủng giống	Thời gian bảo quản	Đơn vị đo	Hoạt tính sinh học	
			Đông khô	Nitơ lỏng
RG57	Trước bảo quản	Khả năng cố định nitơ (nà/cây/h)	2570,00	2700,07
	Sau bảo quản		2800,06	2900,00
AT19	Trước bảo quản	Khả năng cố định nitơ (nà/ml/h)	163,24	150,00
	Sau bảo quản		193,06	178,09
Az12	Trước bảo quản	Khả năng cố định nitơ (nà/ml/h)	121,57	130,59
	Sau bảo quản		120,92	145,17
B14	Trước bảo quản	Đường kính vòng phân giải photphat (mm)	9,0±0,8	8,9±0,9
	Sau bảo quản		8,5±0,7	8,8±0,7
AT25	Trước bảo quản	Khả năng cố định nitơ (nà/ml/h)	124,80	128,00
	Sau bảo quản		130,50	130,00



Đồ thị 1: Khả năng sống sót của vi khuẩn trước và sau bảo quản trong nơ lỏng



Đồ thị 2: Khả năng sống sót của vi khuẩn trước và sau bảo quản đông khô và nơ lỏng

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết quả cho thấy lưu giữ chủng vi khuẩn trong nơ lỏng cho khả năng sống và độ ổn định hoạt tính của chủng vi khuẩn cao hơn so với lưu giữ lạnh đông. Việc lưu giữ các chủng vi khuẩn cố định nitơ và phân giải lân theophương pháp này đơn giản và thuận tiện.

Lưu giữ trong nơ lỏng các chủng vi khuẩn RG57, RV11, B14, AT25, AT19, Az12, Az14, Ps12 có thể duy trì khả năng sống sót của các chủng lâu hơn 36 tháng, hoạt tính sinh học của chủng khá ổn định.

Summary

LIQUID NITROGEN STORAGE OF BACTERIA

NGUYEN NGOC QUYEN, NGUYEN THU HA, TRAN TU THUY

Vietnam Agricultural Science Institute

By storage in liquid nitrogen, the viability and biological activity of the strains of *Bradyrhizobium Japonicum*, *Bacillus polymyxa*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas stritaca* can be maintained for at least 36 months. This storage method can replace the freeze-drying method in preservation of these strains.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Lan Phương, Hồng Huỳnh ánh, 1995, Giữ chủng thử thách ho gà 18323 trong nitơ lỏng thay thế chủng đông khô. Tạp chí vệ sinh phòng dịch số 2 (20), 1995.
2. Malik, K.A, 1988-A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. *Journal of Microbiological method*, 8 ,1988. 259-271p.
3. Malik, K.A, 1991. Maintenance of microorganism by simple methods. In *Maintenance of microorganism 2nd* 122-131 Edu ISBN 012-410351-0.
4. Thevor V. Suslow & Milton N. Schroth, 1981. Bacterial culture preservation in frozen and dry-film methyl cellulose. *Applied and Environmental Microbiology* 5, 1981.872-877p.
5. Moore. L.W, Rene V. Carlson, 1974. Liquid nitrogen storage of phytopathogenic bacteria *Phytopathology* 3, 1975 246-250p.
6. Souzan E. El-Kest, Ahmed. youself and H. Marth, 1991. Fate of listeria monocytogenys during Freezing and Frozen storage-*Journal of Food Science* 4, 1991...

**KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG ONG MẮT ĐỎ *TRICHOGRAMMA*
SPP. (HYM., TRICHOGRAMMATIDAE) PHÒNG TRỪ SÂU TƠ
PLUTELLA XYLOSTELLA L. (LEP., YPONOMEUTIDAE) Ở CHƯƠNG
DƯƠNG VÀ LIÊN PHƯƠNG, THƯỜNG TÍN, HÀ TÂY**

MAI PHÚ QUÝ

Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Trung tâm KHTN&CNQG

Hàng ngày và quanh năm người dân tiếp xúc với các chất hoá học trừ sâu bệnh thông qua việc sử dụng rau- quả chưa an toàn. Ngoài sự nỗ lực quản lý dịch hại rau- quả theo hướng sử dụng thuốc hoá học hợp lý của ngành nông nghiệp, chúng tôi tiến hành các nghiên cứu theo hướng sử dụng các tác nhân không độc trong sản xuất rau - quả

Các loài thuộc giống ong mắt đỏ *Trichogramma* là côn trùng ký sinh trứng có khả năng diệt sâu ngay từ giai đoạn trứng sâu. Hai ưu điểm lớn của ong mắt đỏ nói riêng và ong ký sinh trứng nói chung là tuyệt đối an toàn và diệt sâu tận gốc. Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu và hiện đang sử dụng nhiều loài ong mắt đỏ trừ nhiều loài sâu hại rau quả trên diện rộng. Sử dụng loài OMĐ *T. voegelei*, *T. cacoeciae*, *T. brassicae* và *T. buesi* để trừ sâu xanh *Pieris brassicae* (Kostadinov D, S. Turgari and M. Shojaei, S. Maini, J. Javares oliveira), sử dụng loài *T. evanescens*, *T. buesi* trừ sâu xanh bướm trắng *P. rapae* (Fen Yang, M.S.T. Abbas, Pinitureau B.), sử dụng loài *T. maidis*, *T. evanescens* trừ loài *Mamestra brassicae* (Kostadinov D., S.A.Hassan and W.M. Rost.).

Ở Việt Nam lần đầu tiên chúng tôi tiến hành thí nghiệm sử dụng loài *Trichogramma sp.*, gần với loài *T. evanescens* để phòng trừ sâu hại rau vụ đông xuân năm 1998 ở Chương Dương và vụ đông xuân 1999 ở Liên Phương, Thường Tín, Hà Tây.

Công trình được hoàn thành nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình KHCB Nhà nước.

I. ĐỊA ĐIỂM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Địa điểm nghiên cứu

Chương Dương nằm trên vùng đất dọc sông Hồng, phía trong đê, cách Hà Nội về phía Nam hơn 30 km đường giao thông. Khu thí nghiệm rộng hơn 2.500 m² trong đó 1.080 m² là ruộng thí nghiệm trồng bắp cải và cải xanh, phần còn lại trồng các cây rau khác (su hào, cà chua, đậu...). Bắp cải và cải xanh trồng ngày 1 đến 2/11/1998 theo chế độ chăm sóc, bón phân như kỹ thuật trồng rau đại trà.

Khác với Chương Dương, Liên Phương có vùng rau chuyên canh quanh năm diện tích khu thí nghiệm rộng 1080m² trồng 2 loại bắp cải giống k k và giống ép nổ.

2. Phương pháp nghiên cứu

+ *Điều tra đồng ruộng*: Điều tra 7 ngày/lần, mỗi lần điều tra 5 điểm theo đường chéo góc, mỗi điểm 5 cây. Lần điều tra sau tịnh tiến theo 1 hướng nhất định để các điểm không trùng lặp trong 2 lần điều tra liên tiếp. Điều tra theo tuyến để thu các mẫu sâu hại và ký sinh, tính tỷ lệ cây bị hại và bổ xung tư liệu cho điều tra điểm.

+ *Trong phòng thí nghiệm*: Khi mẫu mới thu về tiến hành phân tích ngay. Các mẫu sâu và trứng sâu hại được nuôi tiếp tục để thu ký sinh theo cá thể hoặc theo quần thể. Nhân nuôi ong mắt đỏ *Trichogramma spp.* theo qui trình nhân nuôi ong mắt đỏ của Phòng Công nghệ Nhân nuôi Côn trùng. Để điều chỉnh thời gian nở ong đực thả đã tiến hành bảo quản ong trong 8°C bằng máy Medicoool với thời gian bảo quản không quá 10 ngày. Kỹ thuật bảo quản hoàn toàn không ảnh hưởng tới chất lượng của ong.

+ *Thả ong mắt đỏ trên đồng ruộng*:

Vụ đông xuân năm 1998. Mỗi tuần thả 1 đợt. Số lượng ong mắt đỏ và thời gian thả ong trình bày ở bảng 6. Trong mỗi đợt thả ong, tiến hành thu các ổ ong mắt đỏ lần trước để tính tỷ lệ ong nở trên đồng ruộng. Bằng phương pháp tính tỷ lệ ong nở trên đồng ruộng, tỷ lệ ong nở trong phòng thí nghiệm, mật độ (số cá thể ong mắt đỏ/cm²) và diện tích các ổ ong ký sinh, chúng tôi đã xác định số lượng ong mắt đỏ thực tế trên đồng ruộng.

Vụ đông xuân năm 1999. Thí nghiệm thả ong mắt đỏ phòng trừ sâu tơ được lặp lại như năm 1998 ở Liên Phương.

Để xác định trứng ký sinh chúng tôi đã cấy các cây su hào đã có trứng sâu tơ để trong phòng thí nghiệm vào ruộng thí nghiệm. Trứng sâu tơ được đẻ từ đêm hôm trước ngày thả; 7 ngày sau chúng tôi thu về để tính tỷ lệ trứng ký sinh. Phương pháp này bổ sung cho việc điều tra trứng sâu tơ ngoài ruộng khi mật độ sâu tơ thấp.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tình hình trồng rau ở Chương Dương và Liên Phương

Chương Dương là vùng rau chuyên 1 vụ đông. Nó hoàn toàn khác vùng chuyên canh rau Mai Dịch, Hà Nội có đặc điểm rau trồng quanh năm và nhiều loại rau. Vùng rau ở đây được trồng sau khi thu hoạch lúa mùa. Có 3 loại rau - quả chính với tỷ lệ diện tích trồng như sau: Su hào, bắp cải 60% diện tích, đậu trạch Trung Quốc 20%, cà chua, cải xanh và các loại rau khác 20% diện tích.

Trong vụ đông có nhiều lứa rau. Rau bắp cải, su hào trồng sớm vào giữa và cuối tháng 9. Bắp cải trồng sớm rất được giá. Rau thí nghiệm của chúng tôi là lứa rau chính vụ. Do đặc điểm kinh tế hộ gia đình, ruộng bị chia cắt nhỏ nên các lứa rau, các loại rau được trồng đan xen với nhau tạo ra 1 bức tranh đa màu trên cánh đồng được viền giữa con đê cao và các dây tre làng. Đất tương đối màu mỡ, có mương tưới nước và sự cần cù của dân nên rau - quả rất tươi tốt và năng suất cao.

Ở Liên Phương thành phần các loại sâu hại không có gì khác so với Chương Dương. Sâu tơ là sâu hại chủ yếu, xuất hiện quanh năm. Khi vụ bắp cải đầu tiên của vụ đông xuân năm 1999 thì mật độ sâu tơ cũng cùng xuất hiện và tăng lên không ngừng. Cũng chính vì vậy ở Liên Phương người ta đã sử dụng nhiều chủng loại thuốc và số lần phun cao hơn vùng Chương Dương.

Hầu hết các loại thuốc có độ độc cao (màu vàng), và thời gian cách ly dài. Như vậy trong suốt cả vụ rau không bao giờ hết mùi thuốc trừ sâu, thuốc phun lần trước chưa tan hết thì đã phun tiếp đợt sau. Do sử dụng thuốc trừ sâu tràn lan, liên tục, rộng khắp với nhiều loại thuốc có độ độc cao đã tiêu diệt cả sâu và thiên địch của chúng là các loài côn trùng ăn thịt và ong ký sinh. Đây là chưa kể thuốc trừ sâu theo rau xanh vào các chợ phố xá, đến tận tay người tiêu dùng. Không thể đánh giá được mức độ độc hại cho con người và môi trường của thuốc trừ sâu trên các vùng rau xanh vành đai Hà Nội. Tuy vậy sâu tơ vẫn sinh sôi nảy nở nhanh, thách đố người nông dân buộc phải sử dụng thuốc hoá học. Theo ông Nguyễn Văn Như, một ông già có kinh nghiệm trồng rau

lâu năm thì riêng tiền thuốc trừ sâu mất tới khoảng 80.000 - 100.000 nghìn đồng cho một sào Bắc bộ.

2. Một số đặc điểm sinh học của ong mắt đỏ ký sinh trứng sâu tơ

2.1. Khả năng sinh sản của ong mắt đỏ *T. chilonis* trên trứng ngài gạo và trứng sâu tơ

Nghiên cứu khả năng sinh sản của ong mắt đỏ được biểu thị bằng số trứng bị ký sinh của vật chủ bởi ong cái của ong mắt đỏ. Kết quả thí nghiệm nuôi từng ong mắt đỏ cái đã giao phối trong các ống nghiệm với 50 - 70 trứng ngài gạo hoặc 30 - 40 trứng sâu tơ được trình bày ở (bảng 1) và (bảng 2).

Bảng 1. Khả năng ký sinh của ong mắt đỏ *T. chilonis* trong phòng thí nghiệm trên trứng ngài gạo

Các lần thí nghiệm	Số trứng bị ký sinh trung bình/ 1 ong cái		Tỷ lệ vũ hoá (%)		Tỷ lệ ong cái (%)		Điều kiện thí nghiệm
	n	$x \pm m$	n	$x \pm m$	n	$x \pm m$	
1	20	41.4 ± 3.09	20	84.9 ± 3.19	20	71.1 ± 3.85	- Nhiệt độ trung bình phòng nuôi từ 26 - 29°C
2	18	38.6 ± 2.79	18	81.4 ± 5.84	18	66.5 ± 4.48	- Độ ẩm 82 - 85%
3	22	40.2 ± 4.41	22	89.4 ± 1.72	22	61.6 ± 5.05	- Ong cho ăn
4	19	41.5 ± 3.04	19	80.2 ± 2.01	19	68.6 ± 3.27	dung dịch mật
5	17	39.5 ± 5.59	17	83.5 ± 2.39	17	66.4 ± 4.53	ong 10%

Bảng 2. Khả năng sinh sản của ong mắt đỏ *T. chilonis* trong phòng thí nghiệm trên trứng sâu tơ

Các lần thí nghiệm	Số trứng bị ký sinh trung bình/1 ong cái		Tỷ lệ vũ hoá (%)		Tỷ lệ ong cái (%)		Điều kiện thí nghiệm
	n	$x \pm m$	n	$x \pm m$	n	$x \pm m$	
1	15	22.4 ± 3.90	15	46.5 ± 5.74	15	70.2 ± 5.29	- Nhiệt độ trung bình phòng nuôi từ 26 - 29°C
2	13	20.0 ± 4.41	13	43.9 ± 1.74	13	61.5 ± 3.25	- Độ ẩm 82 - 85%
3	15	21.2 ± 4.85	15	41.9 ± 1.56	15	67.2 ± 5.04	- Ong cho ăn
4	17	21.4 ± 6.19	17	41.6 ± 3.31	17	62.5 ± 3.57	dung dịch mật
5	15	19.3 ± 5.51	15	37.2 ± 2.37	15	68.9 ± 2.93	ong 10%

Kết quả của bảng 1 và bảng 2 cho thấy ở điều kiện nhiệt độ trong phòng nuôi từ 26 - 29°C, ẩm độ trung bình 80 - 85% khả năng ký sinh của ong mắt đỏ trên trứng ngài gạo khá cao trung bình mỗi ong ký sinh được 40,5 trứng, tỷ lệ vũ hoá cao trên 80%, tỷ lệ ong cái trên 60%.

Nhưng ngược lại, số trứng bị ký sinh bởi 1 ong cái với trứng sâu tơ lại thấp hơn nhiều trung bình chỉ đạt 20,9 trứng, tỷ lệ vũ hoá thấp trung bình 42,2%, tỷ lệ ong cái tương đương với tỷ lệ ong cái vũ hoá từ trứng ngài gạo. Điều này có thể giải thích bởi tính nhạy cảm đặc biệt của ong mắt đỏ đối với sự phát triển phôi trong trứng vật chủ. Trong điều kiện nhiệt độ 26 - 29°C ở phòng thí nghiệm, trứng sâu tơ phát triển phôi rất nhanh, thời gian từ trứng đến sâu non là 2 - 3 ngày, trong khi đó trứng ngài gạo có thời gian phát triển kéo dài hơn từ giai đoạn trứng đến sâu non hết 3 - 5 ngày. Như vậy ong có thời gian đẻ trứng dài hơn và đẻ được nhiều trứng hơn trên trứng ngài gạo.

2.2. Ảnh hưởng của trứng ký chủ lên kích thước ong trưởng thành

Kết quả (bảng 3) cho thấy nhìn chung, kích thước ong đực đều nhỏ hơn ong cái trên cả 2 loại trứng ký chủ là trứng sâu tơ và trứng ngài gạo. Kích thước của ong đực trên trứng sâu tơ là $0,41 \pm 0,02$, trên trứng ngài gạo là $0,46 \pm 0,02$. Kích thước của ong cái trên trứng sâu tơ là $0,50 \pm 0,01$, trên trứng ngài gạo là $0,55 \pm 0,04$. Như vậy có sự sai khác về kích thước ong mắt đỏ ký sinh trên 2 loại trứng ký chủ. Điều đó chứng tỏ kích thước của ong mắt đỏ trưởng thành phụ thuộc vào kích thước của trứng ký chủ.

Bảng 3. Ảnh hưởng của trứng ký chủ lên kích thước ong trưởng thành

Công thức	Ong đực				Ong cái			
	Dài thân (mm)		Rộng ngực (mm)		Dài thân (mm)		Rộng ngực (mm)	
	n	x+m	n	x+m	n	x+m	n	x+m
Trứng ký chủ ngài gạo	26	$0,46 \pm 0,02$	26	$0,21 \pm 0,03$	26	$0,55 \pm 0,04$	26	$0,24 \pm 0,01$
Trứng ký chủ sâu tơ	24	$0,41 \pm 0,02$	24	$0,18 \pm 0,02$	24	$0,50 \pm 0,01$	24	$0,20 \pm 0,01$

2.3. Sự ký sinh trứng sâu tơ của ong mắt đỏ *Trichogramma sp.* ở Mai Dịch, Hà Nội

Bằng phương pháp thu trứng sâu tơ ngoài đồng rau, 7 ngày 1 lần, tiếp tục nuôi trong ống nghiệm ở điều kiện phòng thí nghiệm chúng tôi xác định được khả năng của ong mắt đỏ ký sinh trứng sâu tơ ngoài tự nhiên (bảng 4).

Bảng 4. Tỷ lệ ký sinh trứng sâu tơ của ong mắt đỏ *Trichogramma sp.* ở Mai Dịch, Hà Nội 1999 (điều tra 7 ngày 1 lần)

Thời gian điều tra	Loại rau	Tổng số trứng sâu tơ (quả)	Tỷ lệ trứng bị ký sinh (%)	Tỷ lệ nở (%)	Tỷ lệ ong cái (%)
4.V - 29.VI 7 lần	Cải xanh, cải trắng	1030	0.00 - 4.12	100	50
6.VII - 30.VIII 8 lần	Cải xanh, cải củ	1055	0.51 - 20.31	8.33 - 100	33.3 - 100
7.IX - 23.XI 12 lần	Bắp cải	1243	0.80 - 7.22	0 - 52	

Sâu tơ phát triển trong điều kiện mùa hè nóng và mưa nhiều chỉ trên các loại rau cải (cải xanh, cải trắng, cải củ). Mật độ sâu tơ không cao. Tỷ lệ trứng sâu tơ bị ong mắt đỏ ký sinh tăng dần từ đầu tháng 5 đến cuối tháng 8, cao nhất đạt 20,31%. Bắp cải sống được trồng từ đầu tháng 9 cho đến mùa xuân năm sau (năm 2000). Trên bắp cải, tỷ lệ trứng sâu tơ bị ký sinh thấp hơn trên rau cải, cao nhất đạt 7,22%. Nguyên nhân chủ yếu là trên bắp cải do sâu tơ nhiều hơn nên nông dân phun thuốc nhiều hơn để trừ sâu tơ và tất nhiên gây hại tới ong mắt đỏ.

Ngược lại, trong tháng 11 - 12/1999, trên cánh đồng bắp cải ở Phương Liên, chúng tôi hoàn toàn không thu được trứng sâu tơ bị ong mắt đỏ ký sinh

2.4. Khả năng sinh sản của ong mắt đỏ *Trichogramma sp.* trên trứng sâu tơ trong phòng thí nghiệm.

Loài ong này được thu từ trứng sâu tơ ở vùng rau Mai Dịch, Hà Nội. Loài này được nhân nuôi trong phòng thí nghiệm trên trứng ngài gạo. Ong mắt đỏ ở thế hệ F7 và F20 cho ký sinh trở lại trên trứng sâu tơ. Tỷ lệ ong cái ký sinh trên trứng sâu tơ lớn, đạt 73,9 đến 88,2 %. Như vậy, sau thời gian nuôi bằng trứng ngài gạo, loài ong này vẫn không quên ký chủ tự nhiên ngoài đồng ruộng là trứng sâu tơ (bảng 5). Tuy nhiên, khả năng ký sinh trứng sâu tơ của 1 ong cái còn thấp.

Bảng 5. Khả năng sinh sản của ong mắt đỏ *Trichogramma sp.* trên trứng sâu tơ trong phòng thí nghiệm.

Số thế hệ	Số ong cái thí nghiệm	Tỷ lệ ong cái đẻ trứng (%)	Số lượng trứng ký sinh/1 cái	Tỷ lệ trứng nở (%)	Số ong đời con/1 cái	Tỷ lệ ong cái (%)	Tuổi thọ ong cái (ngày)
F ₇	23	73.90	5.6				1 – 3 (x=2)
F ₂₀	17	88.23	6.4	68.75	4.4	43.93	7 – 14 (x=9.5)

2.3. Hiệu quả của ong mắt đỏ khống chế số lượng sâu tơ

Ong mắt đỏ *Trichogramma sp.* được nhân nuôi trong phòng thí nghiệm sau đó đem thả ra ruộng bằng ổ túi xi măng. Đã tiến hành cho ong mắt đỏ ký sinh trên trứng sâu tơ từ 1- 2 thế hệ. Tỷ lệ ký sinh đạt 100%. Tiến hành nhân quần thể ong mắt đỏ ký sinh trên trứng sâu tơ trong phòng thí nghiệm để thả ra đồng.

Cứ 7 ngày chúng tôi thả 1 lần với số lượng ổ và số cá thể tăng dần theo tuổi của rau (bảng6). Tổng số ong thả, cho đến ngày 17/12/1998 là 114.600 cá thể, qui ra là 740.000 cá thể/ha cây trồng. Đó là số lượng ong thả cao gấp đôi so với tài liệu nước ngoài.

Bảng 6. Số lượng ong mắt đỏ thả trên ruộng rau và tỷ lệ trứng sâu tơ bị ký sinh ở Chương Dương

Ngày thả	Số ổ thả OMD	Số cá thể OMD	Khả năng ký sinh	
			Số trứng sâu tơ*	Tỷ lệ ký sinh (%)
5/11/1998	50	8.000		
12/11/1998	50	9.000		
19/11/1998	80	17.600		
27/11/1998	120	19.000	43	81,39
3/12/1998	120	24.000	28	73,43
10/12/1998	110	24.000	36	83,33
17/12/1998	70	13.000		
Tổng số ong mắt đỏ	600	114.600 ^b		

Ghi chú:

a. Sâu tơ đẻ lên cây rau ở trong phòng, sau đó cấy lại trên ruộng thả OMD

b. Qui ra ha là 764.000 cá thể/ ha

Tỷ lệ trứng sâu tơ bị OMĐ ký sinh cao, từ 73- 83% (bảng 6). Mật độ sâu tơ rất thấp, từ 2- 6 con/cây ở ruộng bắp cải và từ 0,5- 0,6 con/cây ở ruộng cải xanh. Tỷ lệ cây bị sâu từ 40- 68% ở ruộng bắp cải và ở ruộng cải xanh 10- 20% (bảng 7). Hiệu quả lớn nhất là chưa phun lần thuốc hoá học nào để trừ sâu tơ trên ruộng thí nghiệm khi bắp cải đã 45 ngày tuổi và bắt đầu cuốn. Rõ ràng việc sử dụng biện pháp không độc, như OMĐ, đã hạn chế rất nhiều việc phun thuốc hoá học trừ sâu và giữ rau có mật độ sâu tơ thấp chấp nhận được. Ở ruộng không thả OMĐ (năm ven đê) mật độ sâu tơ cao hơn và vì vậy nông dân buộc phải dùng thuốc hoá học với 5 lần phun cho bắp cải 40 ngày tuổi.

Bảng 7. Sự phát triển của sâu tơ *Plutella xylostella* L. trên bắp cải thí nghiệm ở Chương Dương

Ngày điều tra	Thời gian sau khi trồng (ngày)	Tỷ lệ cây có sâu tơ (%)	Mật độ sâu tơ (con/ cây)			
			Sâu tơ t _{1,2}	Sâu tơ t _{3,4}	Tổng số sâu	Nhộng
5/11/1998	4	0	0	0	0	0
12/11/1998	10	20.00	0.50	0	0,50	0
19/11/1998	18	40.00	1.60 (0.80)	0.50 (1,67)	2.10 (5,25)	0.20 (1.00)
10/12/1998	38	68.70	4.24 (6,17)	1.72 (2,50)	5.97 (8,68)	0.92 (1,33)
17/12/1998	45	60.00	1.20 (2,00)	0.80 (1,33)	2.00 3,33	1.40 (2,50)

$$\text{Mật độ sâu đẻ trong ngoặc đơn} = \frac{\text{Tổng số sâu điều tra}}{\text{Tổng số cây có sâu}}$$

$$\text{Mật độ sâu không có ngoặc đơn} = \frac{\text{Tổng số sâu điều tra}}{\text{Tổng số cây điều tra (có sâu + không có sâu)}}$$

Kết quả điều tra ruộng bắp cải 40- 45 ngày tuổi của nông dân cách 1 tuần không phun thuốc có mật độ nhộng sâu tơ 1,6 con/ cây và mật độ sâu tơ 9,8 con/ cây. Điều tra trên bắp cải bắt đầu thu hoạch, sau nhiều lần phun thuốc, như sau: Mật độ nhộng sâu tơ: 5,8 con/ cây và mật độ sâu tơ 12,4 con/ cây.

Sâu tơ phát triển sớm cùng với lứa bắp cải đầu tiên ở Chương Dương. Điều tra ngày 22/10/1998 trên bắp cải 40 ngày tuổi (bắt đầu cuốn) có mật độ nhộng sâu tơ 1,43 con/ cây và mật độ sâu tơ 8,7 con/ cây.

Đã tiến hành thả hỗn hợp 2 loài ong mắt đỏ *Trichogramma chilonis* và *Trichogramma sp.* phòng trừ sâu tơ hại bắp cải ở Phương Liên. Đã thả ong 5 lần vào các ngày điều tra sâu với số lượng như sau 24/11: 1150, 08/12: 1450, 16/12: 2600, 30/12: 1900 và 05/01/2000: 3150 cá thể ong. Tổng số ong đã thả: 10.250 cá thể ở khu ruộng thí nghiệm (tương đương 854.000 cá thể ong /ha). Mật độ sâu tơ rất thấp chưa tới 3 con/1 cây (bảng 8). Với mật độ sâu tơ như vậy không phải phun thuốc hoá học. Rõ ràng ong mắt đỏ đã góp phần tích cực tiêu diệt trứng sâu tơ. Trong khi đó ruộng bắp cải của dân có thời gian sinh trưởng như bắp cải ở khu thí nghiệm thả ong đã được phun thuốc 5 lần để trừ sâu tơ như gia đình ông Nguyễn Đăng Ty. Thêm vào nữa, bắt đầu từ sau ngày 16/12/99 có đợt rét dài, nhiệt độ dưới 15°C, sâu tơ phát triển chậm và sinh sản kém. Đây là

nguyên nhân thứ 2 dẫn đến mật độ sâu tơ thấp. Kết quả thí nghiệm thả ong mắt đỏ trừ sâu tơ ở Chương Dương và Liên Phương đã xác định tính hiệu quả cao và tính ưu việt về an toàn rau của biện pháp này.

Bảng 8. Mật độ sâu tơ trên bắp cải thí nghiệm ở Liên Phương

Ngày điều tra	Thời gian sau trồng (ngày)	Đặc điểm sinh trưởng	Số lượng cây điều tra	Mật độ sâu tơ (con/ cây)			
				Sâu tơ t ₁ 2	Sâu tơ t _{3,4}	Tổng số sâu	Nhộng
24/11/1999	13	Cây non	20	0,25	0,10	0,35	0,05
08/12/1999	27	Trái lá bành	15	1,13	1,80	2,93	0,07
16/12/1999	35		10	0,80	0,50	1,30	0,10
30/12/1999	50	Bắt đầu cuốn	20	1,00	0,85	1,85	0,20
05/01/2000	56	Hoa bắp cải có đường kính 3-5 cm	10	0,50	1,70	2,20	0,30

III. KẾT LUẬN

1. Chương Dương là vùng chuyên canh rau - quả vụ đông, sau vụ lúa mùa. Phương Liên lại là vùng chuyên canh rau quanh năm. Tuy vậy, sự phát triển của sâu bệnh và sử dụng thuốc hoá học trừ sâu bệnh hại rau cũng không khác so với vùng chuyên canh rau quanh năm ở Mai Dịch, Hà Nội.

2. Tỷ lệ trứng sâu tơ bị ong mắt đỏ *Trichogramma* sp. ký sinh tăng dần từ đầu tháng 5 đến cuối tháng 8, cao nhất đạt 20,31% ở cánh đồng rau Mai Dịch, Hà Nội. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, tỷ lệ ong cái ký sinh trên trứng sâu tơ đạt tới 73,9 đến 88,2%. Tuy nhiên, khả năng ký sinh trứng sâu tơ của 1 ong cái của loài *Trichogramma* sp. còn thấp.

3. Ong mắt đỏ đã khống chế số lượng sâu tơ thể hiện trên 3 hiệu quả:

- Giữ được rau 40- 45 ngày tuổi không phải phun thuốc hoá học trừ sâu tơ, giảm số lần phun từ 5- 6 lần so với ruộng nông dân.

- Khống chế số lượng sâu tơ ở mật độ chấp nhận được.

- Do không phun thuốc trừ sâu nên rau bắp cải ở ruộng thí nghiệm bảo đảm tiêu chuẩn an toàn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Huo, Shaotang, 1988. A survey of the egg parasite *Trichogramma evanescens* of the *Pieris rapae* (L.) in Shaanxi. Shaanxi journal of Agricultural sciences. N^o3. P. 20.

2. Mochira O, Kikuchi A, 1991. Attempts to control the Diamondback moth in Japan by *Trichogramma*. Abstract of XIX Inter. Ento. Congress in Beijing, China. P. 309.

3. *Trichogramma* news, 1990. N^o5.

SUMMARY

**SOME PRELIMINARY RESULTS OF APPLY *TRICHOGRAMMA* SPP. (HYM.,
TRICHOGRAMMATIDAE) TO CONTROL OF THE DIAMONDBACK MOTH
PLUTELLA XYLOSTELLA L. (LEP., YPONOMEUTIDAE) IN THE WINTER
VEGETABLES IN 1998 AT CHUONG DUONG AND IN 1999 AT LIEN PHUONG
THUONG TIN, HA TAY PROVINCE**

MAI PHU QUY

Institute of Ecology and Biological Resources, (N.C.S.T.)

Chuong Duong is an area of specialized cultivating winter vegetables after harvesting 10th month rice. Though, the increasing insect pests and applying insecticides wasn't different in comparison with the all year round vegetable specialized cultivating area at Mai Dich - Ha Noi.

Trichogramma sp., *T. evanescens* were collecting from eggs of the diamondback moths in the cabbage field at Mai Dich.

The result of inundative release of 114,600 adults of *Trichogramma sp.* in 1080 m² of the treated area brought from 73,43% to 83,33% of parasitism of diamondback moth eggs.

PHÒNG TRỪ SÂU XANH HẠI BÔNG BẰNG CÁC CHẾ PHẨM SINH HỌC

PHẠM BÌNH QUYÊN, NGUYỄN MINH TUYÊN

Đại học Quốc gia Hà Nội, Viện Nghiên cứu Bông Nha Hồ

Việc sử dụng chế phẩm sinh học Bt là một nội dung quan trọng trong hệ thống IPM trên bông. Theo các tác giả như Salama, Foda, Sharaby (1983) và Agzamova (1988) đã cho rằng Bt (cả 2 chủng *Kurstaki* và *Aizawai*) có hiệu lực cao đối với sâu xanh (*Heliothis armigera*) và *Spodoptera* sp. ở Israel, người ta đã sử dụng Bt để phòng trừ sâu xanh giai đoạn đầu vụ nhằm bảo vệ nguồn thiên địch sẵn có trên đồng (Broza, 1986). Tuy nhiên đã có nhiều báo cáo về tính kháng của sâu xanh đối với Bt (Grould và cộng sự, 1992, Forrester và cộng sự, 1994). Vì vậy, để hạn chế việc hình thành tính kháng đối với Bt thì không nên sử dụng đơn độc Bt mà cần có sự kết hợp với các biện pháp khác hoặc hỗn hợp với các biện pháp khác hoặc hỗn hợp với các thuốc khác. Hơn nữa việc phối hợp với các biện pháp khác hoặc hỗn hợp với các thuốc khác. Hơn nữa việc phối hợp đôi khi còn làm tăng thêm hiệu lực diệt sâu. Khi đánh giá về sự phối hợp, Vironin và Boyarskii (1983) đã rút ra rằng nếu kết hợp sử dụng Bt với OMĐ thì hiệu lực diệt sâu sẽ cao và thiệt hại sẽ giảm từ 1/3 đến 1/2 so với sử dụng riêng rẽ từng biện pháp. Còn khi nghiên cứu về hiệu lực của hỗn hợp Bt với NPV thì Bell và Romine (1985) đã cho rằng hiệu lực của hỗn hợp là tương đương với thuốc hoá học. Vì vậy để làm giảm sức ép chọn lọc đối với sâu xanh nhằm hạn chế sự tạo tính kháng với Bt, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu các chế phẩm Bt và hỗn hợp của Bt với NPV (chế phẩm Divicin - H) để phòng trừ sâu xanh hại bông.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Chế phẩm Bt mang tên Xentari (*Bacillus thuringiensis* Aizwai) chứa 35 BIU/kg chế phẩm (hay 35×10^9 IU/kg)
- Chế phẩm Bt mang tên Delfin (*Bacillus thuringiensis* *Kurstaki*) chứa 32 BIU/kg chế phẩm (hay 32×10^9 IU/kg).
- Chế phẩm Divicin-H gồm hỗn hợp 50% Xentari + 50% NPV.
- Chế phẩm NPV chứa 6×10^{12} PIB/lít chế phẩm.

2. Phương pháp: Thí nghiệm gồm 6 công thức

- Trong phòng: Dùng lá bông rửa sạch, hong khô và tiến hành phun thuốc thí nghiệm lên lá (phun theo nồng độ tương tự như phun ngoài đồng), sau đó hong khô trong phòng và cho vào hộp petri cùng với sâu xanh tuổi 3. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Theo dõi tỷ lệ sâu chết và vệ sinh nộ nuôi hàng ngày. Tính hiệu lực theo công thức Abbott.

- Ngoài đồng: Thí nghiệm được bố trí theo khối đầy đủ ngẫu nhiên với 3 nhắc lại. Khi mật độ sâu >30 con/100 cây bông thì tiến hành phun thuốc thí nghiệm. Lượng nước phun 400 lít/ha. Tiến hành điều tra mật độ sâu trước và sau phun trên 10 cây cố định của từng ô thí nghiệm. Tính hiệu lực theo công thức Henderson Tilton.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thí nghiệm trong phòng

Kết quả bảng 1 cho thấy hiệu lực diệt sâu xanh của chế phẩm Divicin - H nồng độ 0,1% cao hơn của chế phẩm Xentari với cùng nồng độ (0,1%) và tương đương với hiệu lực của Xentari 0,2%, Delfin 0,2% và Karate 2.5EC 0,25%. Rõ ràng ta đã giảm liều lượng Bt xuống một nửa, đây là việc làm rất có ý nghĩa trong việc giảm sức ép chọn lọc đối với sâu xanh. Hơn nữa Divicin - H có tác dụng diệt sâu tốt hơn dùng Bt đơn độc với cùng liều lượng.

Hiệu lực diệt sâu xanh của các loại thuốc sinh học trong phòng đều cao và kéo dài.

Bảng 1. Hiệu lực trừ sâu xanh của các chế phẩm sinh học (Nha Hố 1999)

Các công thức	Hiệu lực (%)	
	Sau 4 ngày	Sau 7 ngày
1. Đối chứng (phun nước lã)	-	-
2. Karate 2.5 EC 0,25%	89,02	92,06
3. Xentari 0,1%	31,16	47,22
4. Xentari 0,2%	38,70	80,36
5. Delfin 0,2%	77,65	87,50
6. Divicin - H 0,1%	62,68	84,29
		LSD _{0,05} = 28,52

2. Thí nghiệm ngoài đồng

Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện mật độ trứng và sâu xanh trên đồng quá cao. Vì vậy qua theo dõi chúng tôi thấy sau 4 ngày mật độ sâu xanh trên đồng tiếp tục cao (do trứng tiếp tục nở), các loại thuốc không còn khả năng khống chế được sâu.

Với số liệu bảng 2 chúng ta thấy hiệu lực trên đồng của Divicin - H 0,4 kg/ha cũng cao tương đương với hiệu lực của Xentari, Delfin liều lượng 0,8 kg/ha và của Karate 25g a.i./ha. Nhìn chung hiệu lực của các loại thuốc ở ngoài đồng thấp hơn trong phòng.

Bảng 2. Hiệu lực trừ sâu xanh sau phun từ 2-4 ngày (Nha Hố 1999)

Các công thức	Hiệu lực (%)	
	Sau 4 ngày	Sau 7 ngày
1. Đối chứng (phun nước lã)	-	-
2. Karate 2.5 EC 25g a.i./ha	40,09	38,08
3. Xentari 0,4 kg/ha	19,86	27,25
4. Xentari 08 kg/ha	19,51	38,06
5. Delfin 08 kg/ha	22,62	38,29
6. Divicin - H 04 kg/ha	28,58	44,47
		LSD _{0,05} = 22,05

3. Chi phí phun thuốc

Phân tích số liệu bảng 3 ta thấy công thức dùng Divicin - H có chi phí thấp hơn các công thức khác. Như vậy nếu xét về hiệu quả kinh tế thì sử dụng Divicin - H vừa làm tăng hiệu quả diệt sâu vừa làm giảm chi phí phun thuốc BVTV hơn là sử dụng Bt đơn độc hay sử dụng thuốc hoá học.

Bảng 3. Chi phí cho một lần phun trên 1 ha (Nha Hố 1999)

Các công thức	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền (đ)
1. Đối chứng	-		
2. Karate 2.5 EC	1,0 lít	200.000 (đ/lít)	200.000,0
3. Xentari	0,4 kg	500.000 (đ/lít)	200.000,0
4. Xentari	0,8 kg	500.000 (đ/lít)	400.000,0
5. Delfin	0,8 kg	500.000 (đ/lít)	400.000,0
6. Divicin - H	0,4 kg		190.000,0
- Xentari	0,2 kg	500.000 (đ/lít)	100.000,0
- NPV	0,2 kg	450.000 (đ/lít)	90.000,0

III. KẾT LUẬN

- Hiệu lực diệt sâu xanh của chế phẩm Divicin - H là cao hơn chế phẩm Bt (Xentari) dùng đơn độc với cùng liều lượng.

- Divicin - H liều lượng 0,4kg/ha, Xentari 0,8kg/ha và Delfin 0,8kg/ha có hiệu lực diệt sâu xanh tương đương với thuốc hoá học Karate ở liều lượng 25g a.i./ha.

- Chi phí phun thuốc sẽ giảm khi sử dụng chế phẩm Divicin để phòng trừ sâu xanh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ag zamova, Kh.K; Bababekov, K; Inogamov, R.U; Sharafutdinov, Sh.A. 1988. Microbiological pest control. Zashchita Rastenii. N_o5, 16-17.

2. Bell, M.R; Romine, C.L 1985. Microbial control of *Heliothis* spp, in cotton. Journal of Entomological Science, 20:2, 146-151.

3. Broza, M.1986. Seasonal changes in population of *H. armigera* in cotton field in Israel and its control with *Bcillus thuringiensis* preparation. Journal of applied entomology, 102:4, 363-370.

4. Forrester, N.W <Editors> Hokksnen, H.M.T; Deaco, J.resistance management options for conventional *B. thuringiensis* and transgenic plants in Australian summer field crops. Biocontrol Science and Technology, 1994, 4;4; p549-553.

5. Gould, F; Martines Ramirez, A Anderson, A.et al. Broad spectrum resistance to Bt toxin in *Heliothis* spp. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America (USA), Sep 1992, V 89 (17) p 7986-7990.

6. Voronin, K.E Boyarskii, A.I Biological protection of potatoes against the cotton moth (*H. armigera*). Zashchita Rastenii, 1983, N_o7, 15.

SUMMARY

THE USE OF MICROBIAL AGENT FOR CONTROLLING HELITHIS ARMIGERA ON COTTON

The effect of the mixture of Bt (*Bacillus thuringiensis* Aizawai) and NPV (Nuclear polyhedrosis virus) on *Heliothis armigera* was studied in the laboratory and cotton field in 1998. The efficiency of this mixture at rate of 0.2 kg Xentari product and 0.2 litre of NPV per ha (7×10^9 IU *Bacillus thuringiensis* and 1.2×10^{12} Polyedral inclusion body/ha) is quite high. It is as effective as Karate 2.5 EC at rate of 25g a.i./ha. Application of this mixture increased the efficiency significantly in comparison with Bt alone at the rate of 0,4 kg Xentari/ha (14×10^9 IU/ha). The costs of Divicin - H was lowest when compared with owhther products, which were treated in the trial.

DEVELOPING CAPACITY IN APPLIED BIOLOGY: THE ROLE AND APPLICATION OF MODERN INFORMATION, COMMUNICATION AND EDUCATIONAL TECHNOLOGIES¹

ROBERT T. RAAB, W. WYN ELLIS

BUENAFE R. ABDON,

Asia Pacific Regional Technology Centre,

Introduction

"Our health, our sustenance and our environment are all based on biological processes. We can improve each of these by wisely applying biological knowledge. Human economic activities that involve biological processes are very economically important - agriculture, medicine, the food industry, the fermented drinks industry, the hot drinks industry, the tobacco industry, the recreational drugs industry (illegal but still a global industry), the natural fabric industry, etc. All of these economic activities have gained from the purposeful application of scientific knowledge. Likewise there are many other non manufacturing industries that involve biology and where biological knowledge can be usefully exploited - waste processing (sewage works, landfills, etc.) and tourism immediately come to mind" (Firn, undated).

This statement aptly illustrates the role, importance and wide influence of applied biology. Applied biology can take credit for innovations leading to improvements in the quality of life as well as the economic benefits they generate. As Longo, et. al. (1997) note, "*Since the nineteenth century, science is no longer just a cultural asset but became increasingly important basis for economic progress due to successful systematic and large scale appropriation of scientific knowledge for technology development.*"

It is this potential of applied biology to result in both social and economic improvements that make it so appealing to both the public and private sectors. Corporations, developed and developing countries all realize that strengthening capacity in applied biology can return substantial dividends. But they are also realizing that achieving this capacity is not an easy task. It requires significant investments in infrastructure and, most importantly, an educational system that develops human resources with the necessary knowledge and skills.

Education and training are therefore primary considerations for any country or corporation wanting to develop and maintain capacity in this competitive and lucrative area. This includes formal education to provide foundation skills and continuing education to help graduates avoid professional obsolescence. But the fast growth in knowledge in all areas of applied biology presents a challenge for educational efforts. There are not enough educators with the skills and knowledge to prepare the new generation of applied biologists under the old bricks and mortar model of higher education. And graduates in many fields of applied biology find it difficult to keep up with new advances in their chosen fields and easily lose their competitiveness.

Fortunately, advances in information, communication and educational technologies offer opportunities and tools to address this situation, and their application is showing progress in meeting the educational needs of current and future R&D personnel. Internet-based information, communication and educational technologies are being widely employed in the developed nations and are beginning to make a difference in the research and educational systems of developing countries. And the educational environment itself is changing. More and more, the private sector is assuming a greater role in the education of critically needed professionals.

Below we will discuss in more detail the rapidly evolving field of applied biology and the issues which characterise this field, the potential costs and benefits of developing capacity in applied biology, the role and limitations of traditional educational models, and new tools and alliances that can help to overcome these limitations. We conclude with a description of emerging intermediary educational

¹ Paper prepared for "International Workshop On Biology", Hanoi, Vietnam, 2-5 July 2001. Conference jointly organized by Vietnam Union of Science and Technology Associations, Vietnam Union of Biology Associations and Center for Information and Technology Transfer in Biology

institutions and highlight one of these active in the Asia Pacific region - the Asia Pacific Regional Technology Centre (APRTC).

APPLIED BIOLOGY

"Applied opticians and physicists are developing bioimaging technologies and exploiting the use of lasers in medical technologies. Chemical engineers are producing and purifying bioactive compounds using fermentation and bioseparation processes. Other bioactive and biodegradable compounds are being produced synthetically by chemists. Civil engineers are restoring and managing ecosystems. Computer engineers and computer scientists are key players in the burgeoning area of bioinformatics. Economists manage the multi-billion dollar finances associated with the biotechnology and health related industries. Electrical engineers are designing implantable devices for artificial neural and muscular stimulation. Mathematicians are addressing problems in biocomplexity, and structural and computational biology. And mechanical engineers are designing prosthetics and surgical devices. These represent only a few of the numerous opportunities that exist at the interface between biological sciences and engineering, mathematics and physical sciences. (Anthony, 2000)

No one can argue about the importance of applied biology - "the application of biological knowledge to help solve a problem" (Anthony, 2000). As the above quote illustrates, applied biologists are involved in some of the most exciting areas of science. Applied biology has made tremendous contributions to human society and has generated significant wealth for nations and private companies. Applied biology has given us 'wonder drugs' that have greatly eased human health problems and extended human life spans throughout the world. It has produced high yielding livestock, crops and cropping systems that have allowed us to avert wide spread starvation in at-risk regions. Applied biological technologies have contributed greatly to preserving our environment through such technologies as modern water purification and waste management systems.

Applied biology, in contrast to 'pure' science, is characterized by its emphasis on exploiting the known rather than probing the unknown and in solving problems. It generally results in 'products' that may be either tangible (drugs, chemicals, seeds) or intangible (knowledge, processes, management approaches) and which generally have commercial value. Applied biologists do science to solve problems and in response to needs. Outputs generally have implications for human lives and for the financial situation of whoever has supported the work.

But, many areas of modern applied biology, while promising great wonders, also offer the prospective of peril and appreciating this is important in understanding the field. This is perhaps most evident in what is now happening in agriculture. Particularly with advances in biologists' understanding and application of molecular biology and genetics, many of the products and processes that applied biologists are now working to develop are poorly understood and thus often viewed with suspicion and even fear. Biotechnology, which is often defined as simply 'applied biology' is particularly controversial and provides a rich example of the promise and perils of modern applied biology. The debate over the safety, benefits and risks of biotechnology is complex and extensive. While it is beyond the scope of this paper to deal with this topic in more detail, interested readers may want to read the following series of position papers to better understand the complex issues and diversity of viewpoints.

Ten reasons why biotechnology will not ensure food security, protect the environment and reduce poverty in the developing world. Altieri, M.A. and Rosset, P. (1999). *AgBioForum*, 2(3&4), 155-162. <http://www.agbioforum.org/vol2no34/altieri.htm>

Ten reasons why biotechnology will be important to the developing world. McGloughlin, M (1999). *AgBioForum*, 2(3&4), 163-174. <http://www.agbioforum.org/vol2no34/mcgloughlin.htm>

Strengthening the case for why biotechnology will not help the developing world: a response to McGloughlin. Altieri, M.A. and Rosset, P. (1999). *AgBioForum*, 2(3&4), 226-236. <http://www.agbioforum.org/vol2no34/altierireply.htm>

Costs and Benefits of Applied Biology

"The generation of scientific-based technologies requires intense and continuous capital investments on R&D for production of high quality goods and services, as well as to engage the most talented brains and managerial capacity to deal with a large spectrum of knowledge" (Longo, et. al., 1997).

Developing countries, whose economies are generally dominated by agriculture, can realize substantial economic and social returns to investments in applied biology, particularly in its application to agriculture. No country can ignore the potential of a strong applied biology R&D sector to contribute to national social and economic health and to enable it to take advantage of products borrowed or imported from outside. No corporation involved in the development of such products can overlook the potential for profits. "The capacity to transform inventions produced by themselves or by others into innovations in rather short periods of time can explain the economic success of enterprises and countries like Japan" (Longo. et.al, 1997).

But there is definitely a substantial financial cost over and above the potential environmental and social costs at the heart of the debate about many of the products associated with applied biology. Developing, and equally important, maintaining national capacity in applied biology is expensive. Countries and companies wanting to achieve this must be prepared to make, and continue to make, significant investments in facilities, infrastructure, communication and perhaps most importantly – education and human capital development.

Role of Education

"The readiness by which the nations through their universities and enterprises will be able to produce innovation from appropriation of scientific knowledge will be an essential factor to cope with the established competition" (Longo, et. al., 1997).

Underlying much of what has been discussed above is the critical importance of trained human resources in the development, application, commercialisation and dissemination of applied biology outputs. For developing countries, this most often means human resources in agriculture. Agricultural education is, therefore, of the utmost importance – both formal education to prepare individuals for a career in applied biology, and continuing education to keep working applied biologists up-to-date with scientific and technological advances.

But numerous studies indicate that agricultural education, particularly in developing countries, is beset by problems (Rogers, 1996; Rodríguez, 1999; Pretty, 1995). Lindley (1998) in a report synthesizing the results of a series of FAO organized regional round tables, expert consultations, and staff analyses describes the situation clearly,

"Poor quality training of agricultural professionals, technicians and producers has been identified as part of the global food security problem. Unfortunately, the training of human resources (the development of human capital) in agriculture is often not a high priority in the overall development plans of countries. As a result, curricula and teaching programmes are not necessarily relevant to the production needs and employment demands of the agricultural sector."

This same synthesis report identified a number of issues that are a concern as we move into the next century and advanced 3 major recommendations. These were that agricultural colleges and universities adopt:

a broad-based approach to "agricultural education".

innovative leadership including a greater involvement of the private sector and institutional partnerships, and

new educational strategies such as a greater application of distance learning and community development initiatives,

A discussion of these recommendations including some of the suggested actions contained in the original report is presented below.

Broad-based approach

Most of the report's suggestions were pertinent to the teaching of applied biology. It suggested that universities do more to produce 'problem solvers' able to diagnose the social and agricultural problems of the communities they serve and come up with solutions. Teaching needs to improve and must reflect "*a better understanding and incorporation of the underlying psychological processes that influence learning, with special attention to experiential learning and participatory learning strategies that focus on inductive reasoning skills*" (Lindsley).

It was further suggested that much more recognition be given to the increasing importance of

commercialisation and globalisation. Job opportunities in the public sector are increasingly scarce and graduates must be given the skills needed to meet the expectations of employers in the private sector.

The need for educational institutions and faculty to keep pace with rapid scientific progress and technical change was also highlighted. Professors can no longer recycle antiquated knowledge acquired during their formal studies. They must continue to learn and keep current with advances in their fields and incorporate this information in their teaching. Related to this is the need to equip students with the skills and attitudes needed to become lifelong learners. Graduates who expect to spend their careers relying only on what they have learned through formal education are guaranteed to find themselves obsolete a few short years after graduation.

"The illiterate of the future are not those that cannot read or write...they are those that cannot learn, unlearn and relearn" (Alvin Toffler)

Private sector and institutional partnerships

Several factors are driving the need for closer partnerships with other educational institutions as well as with the private sector. The rapid pace of knowledge generation and the short shelf life of this knowledge make it imperative that educators share new information with colleagues in other institutions as well as to expand the pool of teachers from which students can choose. This is a particular concern for applied biology students – particularly those with interests that lie on the frontiers of such fields a molecular biology and biotechnology. *"Inter-university and inter-departmental alliances offer a means to capitalize on individual university strengths and to reduce costs reflected in the duplication of efforts. Regional collaborative strategies should be explored as a means to keep pace with accelerated scientific advancement"* (Lindley). Even universities in the West are hard pressed to maintain the critical mass of expertise on their faculties and the number of educational consortia and other alliances is growing rapidly.

Over and above the fact that the majority of university graduates will find employment in private corporations and a good knowledge of the needs and operations of this sector is important, partnerships with the private sector also offer additional advantages. *"Universities may gain access to technology necessary for further advances in fundamental understanding, while industry may be able to improve a technology in preparation for eventual sale of products. This type of symbiotic relationship is at the heart of successful partnerships, and partnerships such as these hold great promise both in disseminating the results of basic research efficiently and in stimulating research that spans the widening gap between federally-funded basic research and industry-funded applied research and development"* (U.S. House of Representatives, 1999).

It is also interesting to note that it is becoming increasingly common for private corporations to establish educational institutions of their own. In the United States, for example, *"There is a huge boom in corporate universities. In the last thirteen years, the number of companies that have opened corporate universities grew from 400 to 1,800. Today 40% of Fortune 500 companies have established corporate universities and, if growth continues at the current rate, the number of corporate universities will exceed the number of traditional universities by the year 2010"* (Fulton, 2001). These initiatives generally welcome the inputs of formal academics and partnerships can pay good dividends to academic departments and the educational organization.

Interestingly, the approach most often taken by these initiatives involves the application of information and communication technologies. *"Industry [in the U.S.] has shifted to web-based training for workers. Traditional classroom-based training in corporate training is expected to continue to drop, representing only 64% of all corporate training in 2001"* (Fulton, 2001). The formal educational sector has been advised to follow this lead.

New Education Strategies

"Advances in communications have transformed society before: movable type, photography and telegraphy, the telephone, television, and the fax machine have all pushed outward the limits of our ability to store and transmit knowledge. Now the convergence of computing and telecommunications appears ready to shatter those limits, making it possible to send vast amounts of information anywhere in the world in seconds - at an ever-decreasing cost. This new technology greatly facilitates the acquisition and absorption of knowledge, offering developing countries unprecedented opportunities to enhance educational systems, improve policy formation and execution, and widen the range of opportunities for business and the poor" (World Bank, 1999).

Perhaps more than any other factor, the rapid advances in information and communication technologies offer educational organizations the tools needed to respond to today's realities and challenges. They can play a huge role in the preparation and continuing education of applied biologists and other graduates. They are ideally suited to the rapid dissemination of knowledge from anyplace in the world to almost anyplace else and allow collaboration and discussion over vast spatial and temporal distances.

Skills in exploiting these technologies, the formation of strategic partnerships, and the application of distance learning approaches have the potential to allow educational institutions to offer quality educational programs in rapidly changing areas. They offer a mechanism to allow faculty to keep their knowledge and skills current and offer students a wider choice of expertise from which to choose. Successful educational institutions will realize these advantages and commit themselves to developing communication infrastructure and computer-based communication and education technologies. They must also recognize the importance and potential of learning models that use these technologies to develop human capital. Beyond the basic infrastructure, it is also extremely important that educational staff and students develop strengths in 2 fundamental areas - digital literacy and e-learning.

DIGITAL LITERACY

Digital literacy is "*The ability to access and take advantage of networked computer resources and to use and understand information as presented by computers*" (Raab, 1999). The specific skills associated with digital literacy include the capacity to take advantage of such varied Internet communication resources as email, listservs, and online conferences. It includes being able to use a range of online search strategies and tools to locate and access important information. It involves using these tools to collaborate with others and also includes the skills required to learn online and take advantage of Internet-based learning opportunities. Acquisition of such skills is vital in today's world where the Internet is transforming business and education. As Fontaine (2001) states,

"The worst case scenario is that the digital divide will grow, economic inequality will increase both within and between countries, entrepreneurs not plugged into the global network will be unable to reach markets, and nations not online will fail to attract international investment, leaving regions with large populations facing an economic crisis of unparalleled proportions."

e-learning

e-learning is the most recent evolution of distance learning - a learning situation where instructors and learners are separated by distance, time or both. e-Learning is - Internet-enabled learning -, or - The use of network technologies to create, foster, deliver, and facilitate learning, anytime and anywhere.

e-courses vary tremendously in their structure. Some are little more than pages of plain text. Others use audio or even video lectures. Most are asynchronous, meaning that students can access materials and submit assignments at any time. Some are synchronous and require that students all log on at the same time to hear lectures or participate in discussions. The most basic (and least effective) only require the student to interact with the material. Good instructional design allows substantial interaction with others including the instructor and other students (Raab, 2000).

Capper (2001) lists the benefits to learning online that are unique to the medium:

Any time. A participant can access the learning program at any time that is convenient –not just during the specific 1-3-hour period that is set for a conventional course. The episodes can be quick snatches at odd times or long late-night sessions. Cross-time-zone communication, difficult to arrange in real time, is as easy as talking to someone across town when using the Internet.

Any place. The participants do not have to meet. That means they can be anywhere. International sharing is feasible. Individuals can log on at work, home, the library, in a community learning center or from their hotel when travelling.

Asynchronous interaction. Unlike face-to-face or telephone conversations, electronic mail does not require participants to respond immediately. As a result, interactions can be more succinct and to-the-point, discussion can stay more on-track, and people can get a chance to craft their responses. This can lead to more thoughtful and creative conversations.

Group collaboration. Electronic messaging creates new opportunities for groups to work together,

creating shared electronic conversations that can be thoughtful and more permanent than voice conversations. Sometimes aided by on-line moderators, these net seminars can be powerful for learning and problem-solving.

New educational approaches. Many new options and learning strategies become economically feasible through online courses. For instance, the technology makes it feasible to utilize faculty anywhere in the world, and to put together faculty teams that include master teachers, researchers, scientists, and experienced professional developers. Online courses also can provide unique opportunities for teachers to share innovations in their own work with the immediate support of electronic groups and expert faculty.

A major result of all the forces discussed above – rapid technological changes in biology, communication, education, - is that higher education is becoming increasingly disaggregated (Fulton, 2001). The formal academic sector is finding it difficult to cope. Even with the availability of new tools, the job of educating and keeping agricultural professionals current is too big for the academic sector alone. In response, a number of intermediary organizations, with both a stake in seeing this effort succeed and a role to play in achieving it, have emerged and are offering a valuable service to hard-pressed educational institutions. Their role is to “*help both students and providers create order out of potential educational chaos*” (Twigg, 1996).

ROLE AND BENEFITS OF INTERMEDIARIES

Education is becoming increasingly disaggregated, “New players are entering the educational arena, expanding the system in ways that will bring about vastly enhanced or entirely new educational services. We foresee a highly differentiated educational system that will address the needs of all types of learners in all types of environments” (Fulton, 2001).

This is good news for educational organizations. While, in the early days of e-learning, academic and industry pioneers were of necessity forced to build all the components themselves, today we see a tremendous growth in collaborative efforts between academic institutions and for-profit educational intermediaries (Baer, 1999).

In the most common model of such collaboration each partner provides specific services, “the academic partner develops the content, conducts the course (including course-related contacts with students), evaluates student performance, and awards appropriate degree credit or certification. The for-profit partner typically provides the hardware and software platforms for course development, maintains the Website on which instructional materials reside, and performs various record-keeping and other administrative functions. Some firms also provide technical support for courseware development and marketing” (Baer, 1999).

THE ASIA PACIFIC REGIONAL TECHNOLOGY CENTRE (APRTC)

The APRTC is an example of an intermediary educational institution dealing with applied biology in relation to sustainable agriculture and focused on the needs and realities of the Asia-Pacific region <http://www.aprtc.org>. Its goal is to contribute to the welfare of Asia’s farmers and the protection of the agricultural resource base upon which they depend. It does this through the promotion of sustainable agricultural practices and modern agricultural technologies, both of which are key products of applied biology. It provides opportunities for agricultural professionals to enhance and continuously update their knowledge and skills and increases access to knowledge resources, particularly those available through the Internet. It targets working agricultural professionals employed in multiple sectors: private, public, non-governmental, academic and development. Interactive e-learning is central to the vision of the APRTC. Interactivity is a key component and APRTC courses allow interaction with the content, between learners and between facilitators and learners. Courses are designed to ensure that even those with limited access to the World Wide Web can benefit. It brings together the expertise of a wide range of professionals in agriculture, development, academia, information technology and education.

Several practical, skills-based e-learning courses focused on extending knowledge about sustainable agriculture and good agricultural practice are either already available online or soon to be published. Courses currently completed or under construction include:

- Digital Literacy for Agricultural Professionals
- English for Agriculture
- Safe and Effective Use of Agrochemicals
- Introduction to Integrated Pest Management (IPM)
- IPM for Cotton

IPM for Irrigated Rice

IPM for Vegetables

APRTC contributes to the development of capacity in applied biology in several ways:

Provision of online training courses designed to develop digital literacy among applied biologists and other agricultural professionals.

Delivery of online courses focused on enhancing technical skills of current and future professionals working in the development of applied biology or promoting the adoption (dissemination) of resulting products.

Promoting interaction and communication between agricultural sectors involved in applied biology.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Capacity in applied biology is an extremely critical concern for both countries and private corporations. It has made, and continues to make, significant positive contributions to society and the revenue generated through the sale and licensing of its products has enriched those who invested in their development. Developing countries must not be left out of realizing the benefits of applied biology, either through developing indigenous products or taking advantage of discoveries made elsewhere, and must take the steps necessary to strengthen their capabilities in this critical area. This will require priority setting and investments in infrastructure, facilities, communication and, most important, education of the human capital upon which applied biology depends.

Most developing countries and their private companies are largely dependent on agriculture as the basis of their economies and profits. It follows then that the agricultural sector is where capacity building investments should be targeted and strengthening agricultural education is a priority. New information, communication and educational technologies can contribute much to this effort although much needs to be done to take advantage of the benefits they promise. Key factors include greater digital literacy and the ability to take advantage of e-learning opportunities. Also, given the general lack of financial resources, multisectoral and other innovative educational partnerships must be entered into. There now exist independent intermediary organizations that work to broker such partnerships and provide the expertise needed to survive and thrive in the new digital world. Developing countries can gain much from taking advantage of what they offer.

REFERENCES

Altieri, M.A. and Rosset, P. (1999) Ten reasons why biotechnology will not ensure food security, protect the environment and reduce poverty in the developing world. *AgBioForum*, 2(3&4), 155-162. Available [Online]: <http://www.agbioforum.org/vol2no34/altieri.htm>

Altieri, M.A. and Rosset, P. (1999) Strengthening the case for why biotechnology will not help the developing world: a response to McGloughlin. *AgBioForum*, 2(3&4), 226-236. Available [Online]: <http://www.agbioforum.org/vol2no34/altierireply.htm>

Anthony, Richard A. (2000). Applied Biology at Rose-Hulman – Why an area minor? Rose-Hulman Institute of Technology, 5500 Wabash Avenue, Terre Haute, IN 47803. Available [Online]: <http://www.rose-hulman.edu/class/AppBio/ABwhy.htm>

Baer, Walter S. (1999) E-Learning: A Catalyst for Competition in Higher Education. *iMP Magazine*, June. Available [Online]: http://www.cisp.org/imp/june_99/06_99baer.htm

Capper, Joanne (2001) E-Learning Growth and Promise For the Developing World. *TechKnowLogia*, May/June. Available [Online]: <http://www.techknowlogia.org>

Firn, R. D. (undated) Special Topics in Applied Biology - Module 866, Personally Owned User Web Areas, The University of York, Heslington, York, YO10 5DD, Great Britain. Available [Online]: http://www-users.york.ac.uk/~drf1/866_1.htm

Fontaine, Mary (2001) How Information Technology Can Help Development: Opportunities and Obstacles *TechKnowLogia*, May/June. Available [Online]: <http://www.techknowlogia.org>

Fulton, Kathleen (2001) The Power of the Internet for Learning: Moving from Promise to Practice. Highlights from the Report of the Web-based Education Commission. *TechKnowLogia*, May/June. Available [Online]: <http://www.techknowlogia.org>

Lindley, W. I. (1998) The Relevance of Higher Education in Agriculture and Rural Development. Speech delivered at World Conference on Higher Education; Higher Education in the Twenty-first Century; Vision and Action. UNESCO, Paris, 5 – 9 October. [Online] Available: <http://unesdoc.unesco.org/images/0011/001170/117075e.pdf>

McGloughlin, M (1999) Ten reasons why biotechnology will be important to the developing world. *AgBioForum*, 2(3&4), 163-174. Available [Online]: <http://www.agbioforum.org/vol2no34/mcgloughlin.htm>

Pirró e Longo, Waldimir, Luiz Valcov Loureiro, Luiz Carlos Scavarda do Carmo (1997) REENGE, The Brazilian Engineering Education Reform Program. In proceedings of the International Conference on Engineering Education -Progress Through Partnerships. August 13-15. Available [Online]: <http://www.siu.edu/~coalctr/paper133.htm>

Pretty, J.N. (1995). *Regenerating Agriculture: Policies and Practice for Sustainability and Self-Reliance*, London, England: Earthscan Publications, 320.

Raab, R. T. and B. R. Abdon (1999) *Digital Literacy for Rice Scientists*. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila, Philippines. Available [Online]: <http://tcsr1.irri.cgiar.org/digitallit/default.htm>

Raab, R. T. (2000) *e-learning for crop professionals*. Agrolinks, December. The Asia-Pacific Crop Protection Association. Bangkok 10900, Thailand. Available [Online]: <http://www.ictedu.org/e-learn.htm>

Rodríguez, Lylian and John Kornerup Bang (1999) *Capacity Building for Sustainable Rural Development: Education, a Priority*. Proceedings of a Workshop March 22-26, 1999 Tune Landboskole Denmark. Organizer: The Danish Agricultural and Rural Development Advisers' Forum. [Online] Available: <http://www.husdyr.kvl.dk/htm/php/tune99/27-Rodriguez.htm>

Rogers, A. (1996). *Participatory Training: Using Critical Reflection On Experience in Agricultural Extension Training*. FAO Training for Agriculture and Rural Development, Economic and Social Development Series, No. 54.

Twigg, Carol A. and Diana G. Oblinger (1996) *The Virtual University. A Report from a Joint Educom/IBM Roundtable*, Washington, D.C. November 5-6. Available [Online] <http://www.educause.edu/nlii/VU.html>

U.S. House of Representatives (1999) *The Private Sector's Role in the Scientific Enterprise*. Washington D.C. 20515. Available [Online]: <http://www.access.gpo.gov/congress/house/science/cp105-b/prsecrol.html>

The World Bank (1999) *World Development Report 1998/99: Knowledge for Development – Summary*. The International Bank for Reconstruction and Development. 1818 H Street, N.W. Washington, D.C. 20433. U.S.A. Available [Online]: <http://www.worldbank.org/wdr/wdr98/contents.htm>

ABSTRACT

Applied biology has resulted in tremendous social, environmental and economic benefits in a wide range of areas – medicine, food processing, fibre production, waste management and agriculture. It focuses on problem solving and results in useful products that may be either tangible (i.e. drugs, chemicals, seeds) or intangible (i.e. processes, management approaches). Countries and corporations alike are well aware of the social and economic returns associated with success in applied biology and are keen to develop capacity. Building, and equally important, maintaining capacity is a difficult and expensive proposition. It requires substantial investments in facilities, infrastructure, communication, and perhaps most important, education. There is an ongoing revolution in how biology is investigated, how knowledge is shared, how we teach it and how we learn it. To meet the requirements for capacity building in applied biology there is a pressing need for educational reform in 3 key areas; improved curricula and teaching methods, stronger institutional and private sector partnerships, and adoption of new educational strategies including Internet-based educational technologies. Digital literacy and e-learning are the keys to success in education and capacity building efforts and ultimately for capacity in applied biology. Intermediaries can help bridge institutional gaps and provide invaluable assistance in using the new tools and in the continuing education of applied biologists. The Asia Pacific Regional Technology Center, an intermediary educational organization using modern education and communication technologies to foster the development of professional skills of applied biologists in agriculture, is an example of one such organization focused on and active in the Asia Pacific region.

NGHIÊN CỨU XỬ LÝ NƯỚC THẢI NHÀ MÁY THUỘC DA BẰNG THÁP LỌC SINH HỌC

NGUYỄN THỊ XUÂN SÂM, TÔ KIM ANH, ĐẶNG THỊ THU

Viện Công nghệ sinh học-Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà nội

I. MỞ ĐẦU

Công nghiệp thuộc da là một trong những ngành công nghiệp có mặt rất sớm ở Việt nam. Do đặc điểm tự phát và không được quy hoạch, các cơ sở thuộc da, kể cả các cơ sở quốc doanh, thường nằm lẫn trong các khu dân cư. Nước thải của các cơ sở này chứa nhiều chất ô nhiễm ở nồng độ cao. Hiện các cơ sở thuộc da hoặc không được trang bị hoặc đã được trang bị một hệ thống xử lý nước thải nhưng ở trong tình trạng không hoạt động vì nhiều lý do khác nhau. Do vậy, nước thải của các đơn vị này đều được xả trực tiếp ra các sông, hồ xung quanh cơ sở sản xuất, gây ô nhiễm trầm trọng. Để đảm bảo chất lượng nguồn nước và sức khỏe cộng đồng, các dòng thải này buộc phải được xử lý trước khi xả ra các nguồn tiếp nhận.

Trong số các giải pháp có thể áp dụng để xử lý nước thải của nhà máy thuộc da, phương pháp sinh học là một biện pháp khả thi do tính tiện ích, kinh tế và an toàn sinh thái. Báo cáo này sẽ trình bày một số kết quả thăm dò kỹ thuật lọc sinh học để xử lý nước thải loại này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu:

-Môi trường cho kiểm tra coliform: Môi trường lactosebroth, môi trường xanh brilliant (High Media, ấn độ)

-Chất mang thử nghiệm: sỏi (2-3 cm) , than củi (2-3 cm);

2.2 Phương pháp lấy mẫu

Trong điều kiện thực tế, chúng tôi lấy nước thải tại một cơ sở thuộc da sản xuất gián đoạn với quy trình sản xuất gián đoạn. Vì thế dòng thải không ổn định về lưu lượng và nồng độ các chất ô nhiễm, nhất là tại các thời điểm xả của từng công đoạn. Để có mẫu trung bình cho dòng thải thuộc da, chúng tôi tiến hành lấy mẫu tại đầu ra của nước thải tại các công đoạn đặc thù của quy trình sản xuất và chia mẫu trung bình.

2.3 Phương pháp phân tích:

Các thông số lý học: Các thông số như DO, pH, nhiệt độ được xác định ngay tại địa điểm lấy mẫu bằng máy đo cầm tay. OD được đo trên thiết bị Jenway 6300.

Các chỉ tiêu hoá học: BOD₅ được xác định theo phương pháp pha loãng (TCVN-4566-88); COD xác định theo phương pháp KMnO₄ (TCVN-4565-88); SS được xác định theo phương pháp trọng lượng không đổi (TCVN-4560-88); NH₄, H₂S và Cl⁻ được xác định bằng kit chuẩn (Kyoritsu, Chemical chek Lab., Corp.)

Xác định coliform: coliform được xác định theo kỹ thuật MPN

2.3 Mô hình và điều kiện vận hành tháp lọc

Tháp lọc được làm bằng ống PVC, đường kính 20 cm, chiều dày lớp vật liệu mang 40 cm. Tháp được thông khí tự nhiên nhờ sự chênh lệch nhiệt độ trong và ngoài tháp khi tháp vận hành, thông qua các cửa thông khí khoan trên thành tháp ngay dưới lớp đệm. Nước thải được đưa vào tháp qua hệ thống phân phối dạng ống quay phía trên đỉnh tháp.

NT sau khi ra khỏi tháp được hồi lưu nhờ một bơm nhu động . Toàn bộ hệ thống làm việc gián đoạn theo từng mẻ NT (xem mô hình 1).

Nước thải sau khi được lọc sơ bộ để loại bỏ những cặn bẩn và tạp chất, được đưa lên thùng cao vị và được phân phối đều lên trên bề mặt chất mang với tốc độ 12 lit/giờ. Nhiệt độ phòng trung bình trong thời gian thí nghiệm là 29-30°C. Hàm lượng trung bình BOD₅ và COD của nước thải trước xử lý tương ứng là 600 - 650 mg/l và 1100 mg/l. Tháp lọc được tiến hành cố định vi sinh vật trong những ngày đầu (thời gian cố định phụ thuộc vào vật liệu mang thử nghiệm). Sau khi đã tạo lớp màng vi sinh vật trên bề mặt chất mang, tiến hành xử lý và khảo sát động thái xử lý NT trên tháp. Mẫu cho phân tích các thông số pH, OD, COD của nước thải và hiệu quả xử lý NT được lấy cách nhau 8 giờ, trừ ban đêm. Hiệu quả xử lý được đánh giá dựa trên mức giảm nồng độ COD của NT sau xử lý so với NT trước khi xử lý. Tốc độ xử lý được thể hiện qua số mg COD giảm / giờ.m³ đệm.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

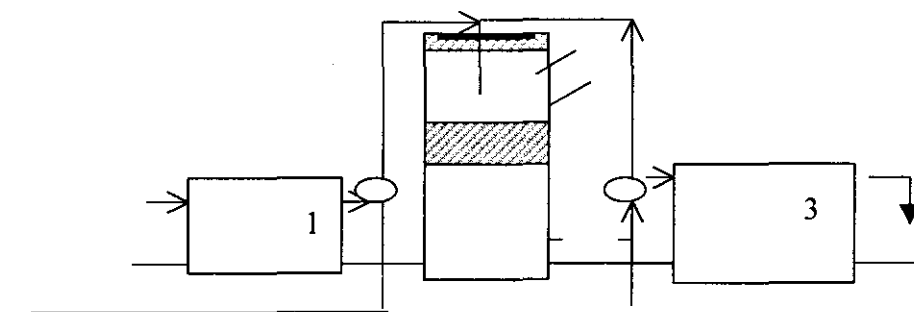
3.1 Thành phần nước thải nhà máy thuộc da

Thành phần của NT thuộc da tại cơ sở chọn để xử lý được trình bày trong bảng 1.

So sánh nồng độ các chất ô nhiễm trên với tiêu chuẩn nước thải được phép đổ vào nguồn tiếp nhận theo TCVN- 5945, 1995 thấy rằng nước thải sản xuất của nhà máy thuộc da có hàm lượng cao hơn mức cho phép nhiều lần. Đây sẽ là nguồn gây ô nhiễm nặng nếu không được xử lý ngay tại nguồn.

Bảng 1: Thành phần nước thải trước khi xử lý

STT	Thông số	Đơn vị	Giá trị
1	Nhiệt độ	°C	27-30
2	pH		5-11
3	Chất rắn lơ lửng (SS)	mg/l	1300
4	Nhu cầu oxy sinh học (BOD ₅)	mg O ₂ /l	620
5	Nhu cầu oxy hoá học(COD)	mg/l	1100
6	Độ đục (OD)		1,4
7	NH ₄	mg/l	750
8	Cl	mg/l	10
9	H ₂ S	mg/l	2
10	Coliform	tb/ml	2,5.10 ⁵



Hình 1 : Sơ đồ thử nghiệm hệ thống xử lý nước thải thuộc da bằng phương pháp tháp lọc.

1 . Các mẫu NT được lấy trong thời gian từ tháng 7/2000 đến tháng 10/2000. Giá trị trình bày trong bảng 1 là giá trị trung bình của 7 đợt lấy mẫu.

xử lý sơ bộ
tháp lọc
bể lọc thứ cấp
bơm NT

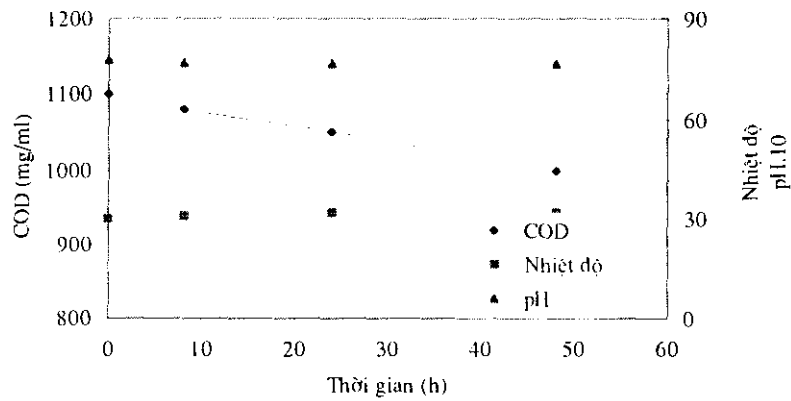
bộ phận phân phối NT
đệm
bơm hồi lưu NT
NT sau xử lý.

3.2 Thử nghiệm chất mang sỏi

Sỏi được rửa sạch và tráng lại bằng nước cất. Lựa chọn sỏi có kích thước đồng đều và xếp vào tháp. Tháp lọc thử nghiệm sỏi làm chất mang có các thông số đầu như sau: Chiều cao lớp chất mang 40 cm, đường kính tháp 20 cm, tốc độ phân phối nước 12 l/h, đường kính sỏi 2- 3 cm, bề mặt riêng của đệm: 56-69 m²/m³, trọng lượng riêng của đệm: 1441 kg/m³.

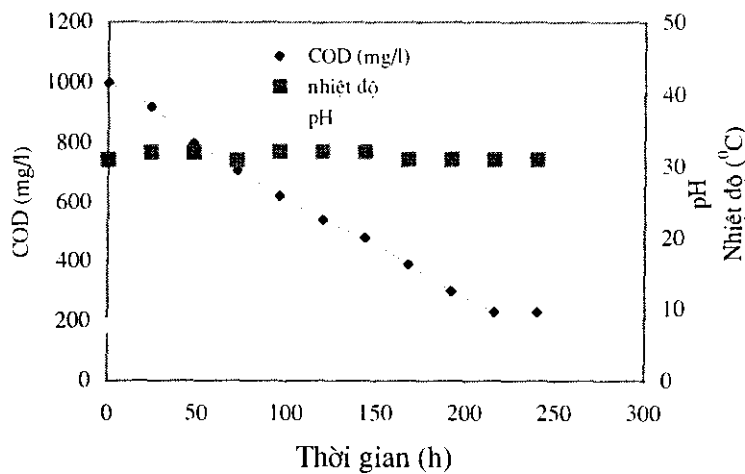
3.2.1 Cố định vi sinh vật trên vật liệu mang

Quá trình tạo màng vi sinh vật được bắt đầu khi tưới NT liên tục trên bề mặt chất mang với tốc độ 12l/h và kết thúc sau 48 giờ (hình 2).



Hình 2. Quá trình cố định vi sinh vật lên chất mang sỏi

3.2.2 Khảo sát quá trình xử lý NT trên tháp lọc với chất mang sỏi



Hình 3. Quá trình xử lý NT trên tháp lọc với vật liệu mang là sỏi

Mẫu NT sau khi lấy được để lắng sơ bộ, lọc bỏ tạp chất và được trung hoà tới pH 7-8. Tiến hành xử lý NT trên tháp lọc đã cố định vi sinh vật với tốc độ phân phối NT 12l/h. Mẫu được lấy sau mỗi khoảng thời gian 8 giờ, tiến hành xác định nhiệt độ, pH, COD. Kết quả phân tích được đưa ra trong hình 3.

Tốc độ xử lý NT trung bình đạt $283,8 \pm 52,9$ mg COD/giờ.m³ đệm. Hiệu quả xử lý COD đạt 82,3%. Trong giai đoạn này, do nhiệt độ môi trường cao, chênh lệch nhiệt độ trong và ngoài tháp chỉ đạt 1-1,5^oC, làm hạn chế khả năng thông khí.

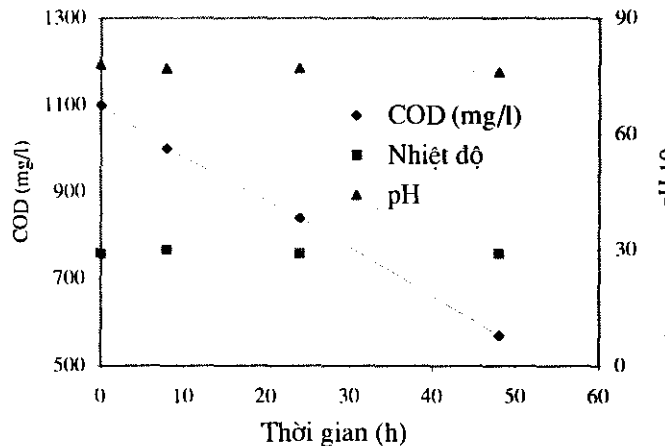
Do trong thực tế nghiên cứu, chúng tôi không lấy được NT một cách liên tục vì phụ thuộc vào kế hoạch sản xuất của nhà máy nên tháp được vận hành gián đoạn chỉ với NT hồi lưu. Do vậy, sau 168h xử lý, có thể quan sát thấy màng vi sinh vật bong ra làm tăng COD của NT ở đầu ra. Nếu tháp được vận hành liên tục với NT mới bổ sung (đủ chất dinh dưỡng cho VSV), màng vi sinh vật sẽ được tái tạo lại, và thời gian hoạt động thực tế của tháp sẽ được kéo dài hơn nhiều so với thí nghiệm này. Màng vi sinh vật bong khỏi lớp vật liệu mang dễ dàng lắng lại trong thùng lắng thứ cấp, không ảnh hưởng tới chất lượng NT sau xử lý.

3.3.Thử nghiệm chất mang than củi

Tháp với vật liệu mang là than củi được thử nghiệm với các thông số như sau: chiều cao lớp đệm 40 cm, đường kính cột 20 cm, tốc độ NT 12l/giờ, kích thước vật liệu mang 2-3 cm.

3.3.1 Cố định vi sinh vật trên than củi

Quá trình cố định vi sinh vật trên than củi được mô tả trên hình 4.



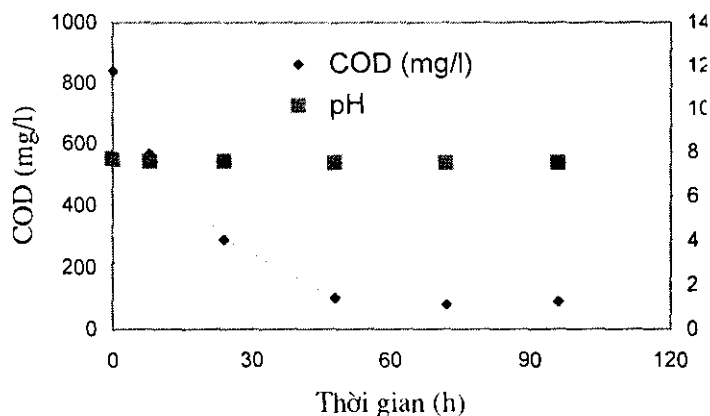
Hình 4. Quá trình tạo màng trên than củi

Nhiệt độ khối đệm bắt đầu tăng lên sau 8 giờ tưới NT chứng tỏ sự phát triển và cố định của vi sinh vật trên than củi. Trên bề mặt đệm đã bắt đầu quan sát thấy lớp màng vi sinh vật. Sau 24 giờ tưới NT, nhiệt độ khối đệm ổn định và cao hơn nhiệt độ môi trường 2^oC (nhiệt độ môi trường 29^oC). Như vậy, quá trình cố định vi sinh vật trên than củi chấm dứt sau 24 giờ, nhanh hơn so với khi sử dụng đệm là sỏi. Kết quả này có thể do bề mặt riêng của than củi cao hơn so với sỏi và nhiệt độ môi trường trong giai đoạn thí nghiệm này không quá cao và thích hợp hơn cho vi sinh vật so với thí nghiệm với sỏi.

3.3.2 Quá trình xử lý NT trên thắp than củi

Động thái xử lý NT trên thắp than củi được trình bày trong hình 5.

Quá trình xử lý đạt tốc độ cao nhất trong 8 giờ đầu khi hàm lượng COD trong nước thải hồi lưu còn cao, đạt tới 2687,1 mg COD/giờ.m³ đệm, tốc độ trung bình trong 48 giờ xử lý đầu tiên đạt 1570,2 ± 1039,7 mg COD/giờ.m³ đệm, cao hơn so với trường hợp dùng sỏi là 5.5 lần. Hiệu quả xử lý COD đạt 88,5% sau 48 giờ xử lý và 90,5% sau 72 giờ xử lý. Trong giai đoạn này, việc thông khí cho thắp cũng không được cải thiện do chênh lệch nhiệt độ trong và ngoài thắp chỉ là 2°C.



3.4. Đề xuất mô hình xử lý

Từ những kết quả thu được chúng tôi đề xuất mô hình xử lý nước thải nhà máy thuộc da như sau: Nước thải được xử lý sơ bộ trước khi cho qua thắp lọc (lọc và điều chỉnh pH); sử dụng than củi làm vật liệu đệm; thắp lọc thông khí tự nhiên; tải lượng thắp lọc (mô hình xử lý PTN): 955.4 kg COD/giờ.m³ đệm; hiệu quả xử lý đạt 90% sau 72 giờ.

Thành phần NT sau khi xử lý theo mô hình đề xuất có thành phần như sau:

Bảng 2. Thành phần nước thải sau khi xử lý theo mô hình đề xuất

Thông số	Đơn vị	Giá trị
Nhiệt độ	°C	29
pH		7,5
Chất rắn lơ lửng (SS)	mg/l	50
Nhu cầu oxy sinh học (BOD ₅)	mg O ₂ /l	35
Nhu cầu oxy hoá học(COD)	mg/l	80
Độ đục (OD)		0,08
NH ₄	mg/l	100
Cl	mg/l	1
H ₂ S	mg/l	1
Coliform	tb/ml	4,5.10 ²

Nước thải thuộc da sau khi xử lý đạt tiêu chuẩn nước thải loại B, riêng hàm lượng coliform còn cao. Đây là thành phần NT sau khi qua tháp lọc, tại đầu ra của bể lắng thứ cấp.

IV. KẾT LUẬN

Sử dụng tháp lọc với than củi làm vật liệu đệm là phương pháp khả thi để xử lý NT nhà máy thuộc da, tiết kiệm diện tích và năng lượng cho xử lý. Hiệu quả xử lý đạt 90% sau 72h thử nghiệm. Nước thải sau xử lý có thể được sử dụng cho các mục đích nuôi trồng thủy sản và nông nghiệp khác.

Tuy nhiên, đây mới chỉ là nghiên cứu thử nghiệm trong PTN trong một thời gian ngắn, trong điều kiện chưa đầy đủ. Vì thế, để có thể áp dụng kết quả của đề tài, cần phải thiết kế và thử nghiệm tháp lọc ở quy mô pilot. Hơn thế nữa, đề tài chưa nghiên cứu được giải pháp đối với bùn của các công đoạn lắng sơ cấp và thứ cấp và thời gian sử dụng của tháp đệm. Do đặc trưng của nước thải nhà máy thuộc da theo công nghệ thuộc crom, nên trong đệm và bùn của hệ thống xử lý sẽ có một hàm lượng crom nhất định. Vấn đề này cần được tiếp tục nghiên cứu trong các giai đoạn nghiên cứu tiếp sau.

SUMMARY

A biofiltration system for treatment of wastewater from tannery was investigated. Rock and charcoal were used as supporters in order to built up high immobilisation capacity of micro-organisms in the system. The system was continuously operated with a flow rate of 12liter/h at various HRT. Average organic matter removal rate and COD removal efficiency achieved the values of $283,8 \pm 52,9$ mg COD/h.m³ and 82,3%, respectively, in the case of rock use while they were of 1570,2 mg COD/h.m³ and 88,5% in the case of charcoal carrier after 48 hours of treatment. The COD removal efficiency was attained up to 90,5% after 72 hours of treatment in the last case. The obtained result suggested charcoal could be a more suitable carrier for the biofiltration system for the study wastewater purification. Based on the study result, a proposal system for tannery wastewater treatment was worked out in order to meet the standard B for the wastewater after treatment.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. American public heath Association,1986. Standard Methods for water and wastewater analysis.
2. Bộ KH-CN và Môi trường1995. Tiêu chuẩn Môi trường Việt nam.
3. Metcalf and Eddy, 1993. Waste Water Engineering- Treatment, Disposal and reuse. Mac.Hill, Newyork.
4. Trung tâm KH-CN Môi trường, trường Đại học Bách khoa Hà nội, 1995. Báo cáo đánh giá tác động môi trường. Dự án đầu tư chiều sâu, di chuyển và mở rộng nhà máy thuộc da của Công ty Da giày Hà nội, Hà nội, tháng 11-1995.
5. Tiêu chuẩn Việt nam, 1988. Nước thải, phương pháp phân tích Lý-Hoá học, TCVN-4556-88 – 4583-88.

OBTENTION ET CARACTÉRISATION DE MUTANTS SPONTANÉS H⁺-ATPASE-DÉFICIENTS ISOLÉS CHEZ *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* ET *LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES* SUBSP. *MESAENTEROIDES*

CHU KỶ SƠN ^{a, b}, RAPHAËLLE TOURDOT-MARÉCHAL ^b

^a institut de biotechnologie et de technologie alimentaire, institut polytechnique de hanoi,

^b laboratoire de microbiologie, ensbana, 1 esplanade erasme, campus universitaire

RDsumĐ

Le fonctionnement de l'H⁺-ATPase membranaire et le métabolisme des acides organiques sont deux des principaux systèmes permettant la régulation du pH intracellulaire chez les bactéries lactiques. Dans ce travail, des mutants ATPase-déficients ont été obtenus chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et chez *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* grâce à leur résistance à la néomycine. Ces mutants présentent une activité ATPasique réduite de 43 à 76 % par rapport à l'activité des souches sauvages. Leurs croissances sont significativement affectées en conditions optimales de croissance à pH 6,5. Les biomasses finales représentent 35 à 77 % des biomasses obtenues chez les souches sauvages. De plus, les faibles croissances observées à pH 4,5 ou pH 5,0 démontrent l'acido-sensibilité des mutants. Les premières caractérisations physiologiques de ces mutants suggèrent qu'il n'y a pas chez ces 2 bactéries lactiques, contrairement à *Oenococcus oeni* [16], d'inhibition du métabolisme des acides organiques. En revanche, une activation significative du métabolisme des acides citrique et malique est observée chez l'ensemble des mutants obtenus.

I. INTRODUCTION

Les bactéries lactiques, bactéries à Gram positif, sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires. Elles sont représentées par un ensemble d'espèces bactériennes hétérogène tant sur le plan morphologique qu' physiologique. Un des axes de recherches développé au Laboratoire de Microbiologie est l'étude des mécanismes physiologiques impliqués dans l'acido-tolérance des bactéries lactiques. Le modèle d'étude choisi est la bactérie acidophile *Oenococcus oeni* (*O. oeni*), agent de la fermentation malolactique (FML) des vins.

Au niveau physiologique, il a été démontré que le métabolisme de l'acide malique joue un rôle crucial dans l'acido-tolérance d'*O. oeni*. Le bénéfice physiologique de la FML, particulièrement en conditions acides, s'explique par la génération d'énergie métabolique. Cette dernière est basée sur l'entrée électrogénique du L-malate, sa décarboxylation intracellulaire par l'enzyme malolactique (EML) et la diffusion du produit final, l'acide lactique, en symport avec un proton [15]. Cette voie métabolique entraîne la génération d'une force proton motrice suffisante pour la synthèse d'ATP via l'ATPase F₀-F₁ [3]. Récemment, les gènes impliqués dans la FML chez *O. oeni* ont été identifiés et étudiés. Il s'agit d'un locus regroupant les gènes de l'EML (*mleA*) et de la perméase du L-malate (*mleP*) [10]. Le gène *mleR* codant pour une protéine régulatrice a été mis en évidence. Ce gène se situe en amont de l'opéron *mle* et est transcrit dans le sens inverse. Le rôle de la protéine régulatrice MleR-like doit être déterminé car aucune régulation de l'EML par le L-malate n'a été observée [11].

Un deuxième mécanisme impliqué dans l'acido-tolérance des bactéries lactiques est l'hydrolyse de l'ATP couplée à l'expulsion des protons intracellulaires par les H⁺-ATPases membranaires. Ces enzymes jouent un rôle très important dans le maintien de la force proton motrice et dans la régulation du pH intracellulaire (pH_{in}). Chez *Enterococcus hirae*, Kobayashi *et al.* [8] ont suggéré que le pH_{in} est principalement régulé par l'H⁺-ATPase. A partir de cette souche, un mutant qui ne pouvait pas maintenir un pH_{in} neutre en conditions acides a été obtenu. Ce mutant possède environ un dixième d'activité ATPasique par rapport à la souche sauvage [9]. Des mutants ATPase-déficients de *Lactococcus lactis* [18] et de *Lactobacillus helveticus* [17] ont été obtenus. Ils se caractérisent par une croissance plus lente par rapport à la souche sauvage en conditions acides. Ce résultat confirme l'importance des H⁺-ATPases chez les bactéries lactiques pour leur survie à pH acide. Récemment, des mutants ATPase-déficients d'*O. oeni* ont été isolés par la résistance à la néomycine [16]. Ces mutants présentent une activité ATPasique diminuée de 50% par rapport à l'activité de la souche sauvage. Il n'y a pas de croissance des mutants à pH inférieur à 3,5. De plus, une forte mortalité des mutants ATPase-déficients est induite par

un choc acide. Ces résultats confortent l'importance de l' H^+ -ATPase dans la régulation du pH_{in} chez cette bactérie. Cependant, les mutants d'*O. oeni* se caractérisent par une absence totale d'activité malolactique. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'un couplage entre deux mécanismes impliqués dans l'acidophilie chez *O. oeni*: l' H^+ -ATPase et l'activité malolactique.

Suite au travail de Tourdot-Maréchal *et al.* [16], nous voulions vérifier s'il existe un couplage activité H^+ -ATPase / activité malolactique chez d'autres bactéries lactiques possédant une enzyme malolactique fonctionnelle. L'objectif de ce travail était d'étudier principalement la conséquence d'une déficience en activité ATPasique sur le métabolisme de l'acide malique chez deux bactéries lactiques : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Pour cela, nous avons isolé et débuté la caractérisation physiologique des souches mutantes spontanées ATPase-déficientes obtenues chez ces deux souches.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Souches bactériennes et conditions de croissance

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CNRZ 126 (*L. lactis*), provient de la collection des souches du Laboratoire de Microbiologie, ENSBANA et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 19D (*Ln. mesenteroides*) provient de la collection de l'Institut National de la Recherche Agronomique (Jouy en Josas, France).

Les deux souches mères et les mutants obtenus sont cultivés dans du milieu MRS à pH 6,5 [4] additionné d'acide D/L-malique à 10 g.l^{-1} . Pour sélectionner les mutants ATPase-déficients, $300 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de sulfate de néomycine sont ajoutés dans le milieu MRS gélosé. L'incubation dans tous les cas se déroule à 30°C .

2.3. Isolement des mutants résistants à la néomycine

L'isolement des mutants spontanés résistants à la néomycine de *L. lactis* et *Ln. mesenteroides* est réalisé conformément à [16] avec quelques modifications: le milieu utilisé est le MRS et l'incubation dure 48h.

2.4. Suivi de la croissance

La croissance bactérienne est suivie par mesures de densité optique (DO) à 600 nm.

La vitesse spécifique de croissance μ_{max} (h^{-1}) est déterminée conformément à [16]

2.5. Préparation des membranes et dosage de l'activité ATPasique

Les protocoles de préparation des membranes d'*O. oeni* et de détermination de l'activité ATPasique membranaire ont été au préalable mis au point [16]. Ils ont été adaptés aux bactéries étudiées par les modifications suivantes : le tampon utilisé pour la casse des cellules est le tampon TRIS-HCl : TRIS 50 mM, MgSO_4 10 mM, pH 7,0 ajusté avec HCl concentré [1]. Les concentrations protéiques sont déterminées selon la méthode de Bradford [2].

2.6. Etude du métabolisme glucidique et du métabolisme des acides organiques

L'utilisation éventuelle du citrate, du malate, du glucose ainsi que de l'acide lactique (L et D) au cours de la croissance a été également déterminée par dosage enzymatique (kits enzymatiques Boehringer Mannheim)

III. RÉSULTATS

3.1. Isolement des mutants résistants à la néomycine

De nombreux travaux réalisés chez les bactéries à Gram négatif [7], comme chez les bactéries à Gram positif [6,18] démontrent une corrélation entre la résistance d'une bactérie à la néomycine et la déficience de l'activité H^+ -ATPasique membranaire. Dans un premier temps, afin d'isoler des mutants spontanés résistants à la néomycine chez *L. lactis* et chez *Ln. mesenteroides*, deux lots pour chaque souche sont traités.

Tableau 1. Résultats de mutation spontanée obtenus chez 2 bactéries étudiées

Souches	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
UFC /lot	2,2.10 ¹⁰	1,2.10 ¹⁰
Nombre de mutants	1682	345
Fréquence de mutation	1,9.10 ⁻⁷	4,5.10 ⁻⁶

Nous avons repiqué aléatoirement 52 colonies chez *L. lactis* et 30 colonies chez *Ln. mesenteroides* pour tester leurs profils de croissance en conditions optimales (milieu MRS, pH initial 6,5).

3.2. Suivi de croissance des mutants résistants à la néomycine et dosage de l'activité ATPasique

Les calculs des vitesses spécifiques de croissance μ_{\max} (h⁻¹) et des biomasses finales (mg du poids sec.ml⁻¹) ont permis d'écartier des mutants isolés chez *L. lactis* et chez *Ln. mesenteroides* qui présentaient des profils de croissance comparables aux profils obtenus chez les souches sauvages. Chez *L. lactis*, il reste 16 souches se caractérisent par une vitesse spécifique de croissance plus faible, représentant de 35 à 83 % de la valeur de μ_{\max} obtenue chez la souche sauvage (0,46 h⁻¹). Les biomasses finales sont également diminuées, puisqu'elles représentent 35 à 82 % de la valeur de 1,04 mg.ml⁻¹ obtenue chez la souche sauvage au bout de 24 h de croissance. Ces 16 souches ont été retenues pour la mesure d'activité ATPasique et 6 de ces mutants possèdent une activité ATPasique diminuée, représentant 37 à 57 % de l'activité de la souches sauvage (1,27 $\mu\text{mol Pi.min}^{-1}.\text{mg protéines}^{-1}$) (Tableau 2).

Chez *Ln. mesenteroides*, n'ont été retenues que 8 souches se caractérisant par une biomasse finale représentant 44 à 75 % de la biomasse finale (1,26 mg.ml⁻¹) obtenue chez la souche sauvage. Les vitesses spécifiques de croissance ne semblent pas significativement diminuées puisqu'elles présentent pour les 8 souches retenues 62 à 78 % de la valeur témoin (0,45 h⁻¹). Après le dosage de l'activité ATPasique, il a été constaté qu'une diminution très marquée d'activité (de l'ordre de 75 %) est observée pour les souches notées 5.15, 14.15, 15.15 et 21.15 (Tableau 2).

Tableau 2. Paramètres de croissance (μ_{\max} et biomasse finale) et dosages de l'activité ATPasique des souches résistantes à la néomycine de *L. lactis* et *Ln. mesenteroi*

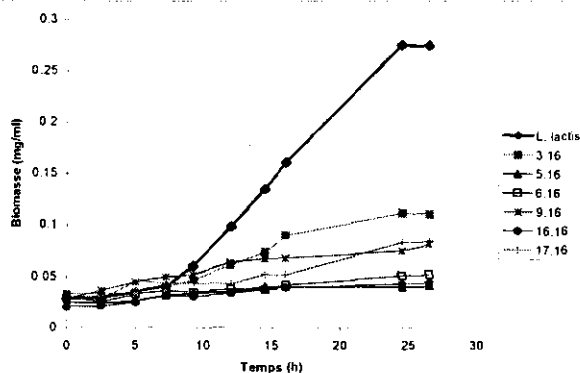
des-culture sur MRS, pH 6,5. Souches	Vitesse de croissance spécifique μ_{\max}^a (h ⁻¹)	Concentration de biomasse finale ^b (mg du poids sec.ml ⁻¹)	Activité ATPasique membranaire ($\mu\text{mol Pi.min}^{-1}.\text{mg protéines}^{-1}$)
<i>Lactococcus lactis</i>			
Sauvage	0,46	1,04	1,27
3.16	0,29	0,53	0,63
5.16	0,16	0,36	0,59
6.16	0,18	0,37	0,73
9.16	0,29	0,80	0,70
16.16	0,28	0,37	0,53
17.16	0,27	0,47	0,47
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			
Sauvage	0,45	1,26	0,33
5.15	0,35	0,56	0,10
14.15	0,34	0,87	0,10
15.15	0,28	0,73	0,10
21.15	0,35	0,88	0,08

^a Valeurs μ_{\max} sont la moyenne de 2 cultures indépendantes.

^b Calculée après 24 h de croissance pour une DO_{600nm} initiale = 0,06. La biomasse cellulaire a été déduite d'un étalonnage préliminaire : une unité DO_{600nm} = 0,4 mg du poids sec.

3.4. Croissance en conditions acides des mutants ATPase-déficients

Les 10 mutants les plus touchés au niveau de l'activité H⁺-ATPasique (6 mutants chez *L. lactis* et 4 mutants chez *Ln. mesenteroides*) ont été inoculés sur milieu MRS dont les valeurs de pH initial ont été fixées à 5,0 pour *L. lactis* et à 4,5 pour *Ln. mesenteroides*. Pour *L. lactis* (figure 1), la vitesse spécifique de croissance de la souche sauvage est de 0,16 h⁻¹ au lieu de 0,46 h⁻¹ à pH 6,5. Deux mutants (5.16, 16.16) ne se développent pas. Les vitesses spécifiques de croissance des 4 autres mutants (3.16, 6.16,



9.16 et 17.16) varient de 0,04 à 0,09 h⁻¹, avec des biomasses finales représentant 20 à 40 % de la biomasse finale obtenue chez la souche témoin (0,27 mg.ml⁻¹).

Figure 1. Croissance des mutants ATPase-déficents de *L. lactis* en conditions acides (pH 5,0).

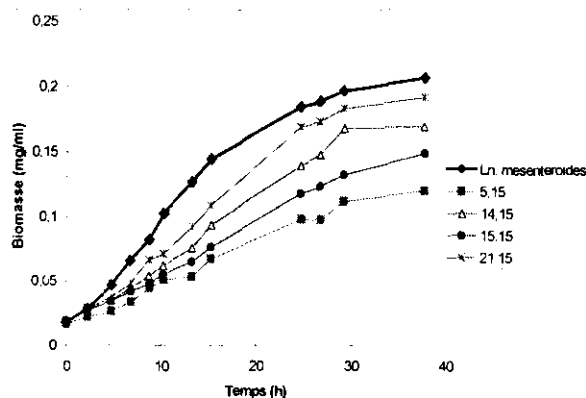


Figure 2. Croissance des mutants ATPase-déficents de *Ln. mesenteroides* en conditions acides (pH 4,5).

Pour *Ln. mesenteroides* (figure 2), la vitesse spécifique de croissance de la souche sauvage est de 0,12 h⁻¹ au lieu de 0,45 h⁻¹ en conditions optimales. Contrairement aux mutants de *L. lactis*, tous les mutants préalablement sélectionnés se développent en milieu acide. Les valeurs de μ_{max} sont comprises entre 0,06 et 0,08 h⁻¹, avec des biomasses finales comprises entre 0,12 et 0,19 mg.ml⁻¹, contre 0,21 mg.ml⁻¹ pour la souche sauvage.

Nous avons choisi 2 mutants ATPase-déficents représentatifs pour la caractérisation physiologique: le mutant 5.16 issu de *L. lactis* et le mutant 5.15 issu de *Ln. mesenteroides*.

3.4. Consommation du glucose et des acides organiques chez les mutants ATPase-déficents

3.4.1. Métabolisme des acides malique et citrique

Des dosages enzymatiques du malate et du citrate résiduels ont été réalisés sur 2 mutants choisis (prélèvement après 24 h de croissance sur milieu MRS pH initial 6,5). Les résultats obtenus (Tableau 3) montrent que les mutants ATPase-déficents de *L. lactis* et de *Ln. mesenteroides*, consomment la quasi-totalité de l'acide L-malique (37 mM) et de l'acide citrique (7,8 mM) initialement présents dans le milieu.

En outre, le calcul de la consommation des acides organiques (mmoles d'acide consommées par mg de biomasse finale) démontre une consommation significativement plus élevée des acides malique et citrique chez les mutants ATPase-déficents. On peut noter pour le mutant 5.16 une consommation d'acides malique et citrique multipliée par 3. Chez le mutant 5.15 de *Ln. mesenteroides*, la consommation d'acides malique et citrique est doublée (Tableau 3). Les mêmes dosages ont été réalisés après 24 h de culture en conditions acides (Tableau 3). On constate chez le mutant 5.16 de *L. lactis* une faible consommation (de l'ordre de 50 %) des acides L-malique et citrique. Le mutant 5.15 de *Ln.*

mesenteroides ne consomme qu'un tiers de l'acide L-malique initial. Par contre, l'acide citrique est totalement métabolisé. Le calcul des consommations d'acides organiques après culture en conditions acides démontrent d'une part une plus forte consommation des acides malique et citrique chez les deux souches sauvages. En effet, la consommation du L-malate est multipliée par 4 chez *L. lactis* et par 5 chez *Ln. mesenteroides*. Celle du citrate est multipliée par 4 chez *L. lactis* et par 7 chez *Ln. mesenteroides*. D'autre part, on constate, chez les mutants ATPase-déficients, une augmentation de la consommation des acides organiques significativement supérieure à celle calculée sur les souches sauvages. Le phénomène est particulièrement marqué chez le mutant de *L. lactis*. Seul le mutant 5.15 de *Ln. mesenteroides* montre une consommation significativement accrue des acides malique et citrique (45 et 62 % respectivement), par rapport à la souche sauvage.

Tableau 3. Métabolisme des acides organiques des mutants ATPase-déficients en conditions de croissance optimales et acides.

en conditions optimales (MRS pH 6,5)				
Souches	Concentration résiduelle du L-malate ^a (mM)	Concentration résiduelle du citrate ^a (mM)	Consommation du L-malate (mmol.mg ⁻¹)	Consommation du citrate (mmol.mg ⁻¹)
<i>L. lactis</i>	2,9	0	33	7
5.16	3,4	0	95	19
<i>Ln. mesenteroides</i>	3,2	0,28	27	5
5.15	3,7	0	60	12
en conditions acides (MRS pH 5,0 pour <i>L. lactis</i> et MRS pH 4,5 pour <i>Ln. mesenteroides</i>)				
<i>L. lactis</i>	2,6	0,28	126	25
5.16	19,2	4,85	451	57
<i>Ln. mesenteroides</i>	5,6	0,17	153	37
5.15	10,7	0,59	221	60

^a Valeurs moyennes de 2 répétitions

3.4.2. Métabolisme glucidique

La consommation de glucose ainsi que la production d'acide lactique ont été mesurées après culture sur milieu MRS en conditions optimales (pH 6,5) et en conditions acides (pH 4,5 ou pH 5,0).

Tableau 4. Production d'acide lactique à partir du métabolisme glucidique chez les mutants ATPase-déficients de *L. lactis* et de *Ln. mesenteroides*

Souches	mmol. L-lactate formé mmol. glucose + L-malate consommés	
	Culture sur MRS pH 6,5	Culture sur MRS pH 5,0
<i>L. lactis</i> (témoin)	2,0	1,4
5.16	1,7	0,7
Souches	mmol. D-lactate formé mmol. D-glucose consommé	
	Culture sur MRS pH 6,5	Culture sur MRS pH 4,5
<i>Ln. mesenteroides</i> (témoin)	1,3	1,7
5.15	1,9	1,8

Les bactéries lactiques du genre *Lactococcus* se caractérisent par leur métabolisme homofermentaire et la production exclusive d'acide L-lactique [5]. Le L-lactate formé provient également du L-malate ajouté dans le milieu de culture (rendement de conversion: 1 mole de L-malate = 1 mole de L-lactate). La valeur de ratio (L-lactate formé / glucose + malate métabolisés) calculée pour la souche sauvage *L. lactis* cultivée à pH 6,5 (Tableau 4) est de 2. Cette valeur est vraisemblablement surestimée. Pour la souche 5.16 cultivée à pH 6,5, la valeur de ratio est proche de la valeur théorique de 1,5. Le ratio calculé après croissance à pH acide est de 1,4 chez la souche sauvage. Pour le mutant 5.16, la valeur de ratio est approximativement divisée par 2 en condition acide.

IV. DISCUSSION

La néomycine est un antibiotique qui s'accumule dans la cellule bactérienne par un processus énergie-dépendant [6]. La résistance à la néomycine représente, par conséquent, un outil largement utilisé chez de nombreuses bactéries pour la sélection spécifique de mutants affectés dans le fonctionnement des H⁺-ATPases membranaires [7,16,17,18]. En effet, ces enzymes sont directement impliquées dans la génération de la force proton motrice membranaire.

Nous avons obtenu chez *L. lactis* et chez *Ln. mesenteroides* des mutants spontanément résistants à la néomycine. La fréquence de la mutation calculée chez la souche témoin *L. lactis* ($1,9 \cdot 10^{-7}$) est comparable à la fréquence obtenue dans [18] sur la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. Chez *Ln. mesenteroides*, la fréquence de mutation est 20 fois plus élevée ($4,5 \cdot 10^{-6}$).

La première sélection des mutants ATPase-déficients s'est faite en fonction des caractéristiques de croissance des souches en conditions optimales de croissance, culture sur milieu MRS pH 6,5. En effet, en conditions de culture à pH non régulé, la production d'acide lactique au cours de la croissance entraîne une acidification qui doit fortement inhiber le développement des souches les plus affectées au niveau de l'activité ATPasique. Environ 30 % des souches isolées chez *L. lactis* et chez *Ln. mesenteroides* présentent effectivement une croissance plus faible que la souche sauvage en conditions optimales de croissance. Les dosages d'activité ATPasique membranaire ont permis de confirmer la déficience en ATPase de la majorité des mutants sélectionnés. Les mutants les plus affectés chez *L. lactis* (3.16, 5.16, 6.16, 16.16 et 17.16) ont une activité ATPasique membranaire représentant 37 à 57 % de l'activité de la souche sauvage. Ces valeurs restent cependant élevées, comparées aux résultats de Yokota *et al.* [18] où un mutant isolé chez *L. lactis* possède une activité ATPasique ne représentant que 25 % de l'activité de la souche sauvage. Par contre, quatre mutants isolés chez *Ln. mesenteroides* (5.15, 14.15, 15.15 et 21.15) présentent de faibles activités ATPasiques représentant moins de 30 % de l'activité témoin.

Le suivi de croissance en conditions acides des mutants préalablement sélectionnés démontrent l'acido-sensibilité des mutants ATPase-déficients. L'acido-sensibilité est fortement marquée pour les mutants de *L. lactis* où deux souches (5.16 et 16.16) particulièrement affectés au niveau de l'activité ATPasique ne se développent pas à pH 5,0. Pour les 4 autres mutants, les vitesses spécifiques de croissance chutent fortement puisqu'elles représentent environ 50 % de la valeur observée chez la souche sauvage. Le comportement en conditions acides (pH 4,5) des mutants de *Ln. mesenteroides* est différent. En effet, tous les mutants se développent. De plus, il n'y a pas de corrélation entre le niveau d'activité ATPasique mesurée chez les mutants et leurs valeurs de μ_{\max} en conditions acides de croissance. Seule la souche 5.15 présente une valeur de μ_{\max} faible, représentant 50 % de la valeur calculée chez la souche sauvage. Il est possible que la valeur de pH initialement fixée pour la croissance en conditions acides des mutants de *Ln. mesenteroides* ne soit pas assez discriminante. Ceci pourrait expliquer la faible acido-sensibilité observée dans cette étude chez les mutants ATPase-déficients issus de *Ln. mesenteroides*.

L'étude du métabolisme des mutants ATPase-déficients s'est portée dans un premier temps sur le métabolisme des acides organiques : acide L-malique et acide citrique. L'ensemble des mutants sélectionnés consomment l'acide L-malique. Il n'existe donc pas chez *L. lactis*, comme chez *Ln. mesenteroides*, une relation entre la déficience en activité ATPasique membranaire et l'activité malolactique des bactéries. On peut conclure que le couplage entre les deux activités enzymatiques observé dans les travaux de Tourdot-Maréchal *et al.* [16] est particulier à la bactérie lactique *O. oeni*. En outre, notre étude met en évidence une augmentation significative de la consommation en L-malate chez les mutants ATPase-déficients en conditions optimales de croissance et en conditions acides. Le métabolisme de L-malate est capable de générer une force protomotrice membranaire. De plus, il participe, par la consommation d'un proton extracellulaire à la régulation du pH intracellulaire [13,15]. L'activation du métabolisme du L-malate pourrait, par effet compensatoire, être une conséquence de la déficience en ATPase des mutants. Une activation du métabolisme de l'acide citrique est également observée chez l'ensemble des mutants ATPase-déficients cultivés en conditions optimales et en conditions acides. Le métabolisme de l'acide citrique participe également à l'énergétique cellulaire des bactéries lactiques. L'entrée du citrate chez *Ln. mesenteroides* est catalysée par un transporteur secondaire (CitP) qui est induit par la présence du citrate dans le milieu [12]. La génération d'énergie métabolique est la conséquence directe du transport du citrate sous forme anionique créant un potentiel membranaire. De plus, le métabolisme intracellulaire du citrate entraîne une consommation de protons, participant à la génération d'un gradient de pH membranaire [14]. Des expériences de croissances des

souches mutantes en absence ou en présence d'acides malique et citrique, corrélées à la mesure de pH intracellulaire doivent être réalisées afin de confirmer nos hypothèses.

L'étude du métabolisme glucidique basée sur le dosage des isomères de l'acide lactique produit est complexe du fait de la présence dans le milieu de croissance d'acides organiques pouvant produire également du lactate. Chez *Lactococcus lactis*, seul du L-lactate est produit à partir de l'homofémentation du glucose. Le métabolisme du L-malate conduit également à la formation de L-lactate. Les bilans mmoles L-lactate formées / mmoles (glucose + L-malate) consommées calculés après croissance à pH 6,5 semblent démontrer que la déficience en ATPase n'affecte pas significativement le métabolisme glucidique. Des résultats similaires ont été obtenus chez un mutant ATPase-déficient de *Lactococcus lactis* cultivé en conditions optimales de croissance [18]. La diminution de la valeur ratio observée après croissance à pH acide semble indiquer un passage à un métabolisme hétérofermentaire. La diminution la plus marquée est obtenue pour le mutant 5.16 où le ratio est 3 fois plus faible à pH 5,0, comparé à la valeur calculée à pH 6,5. Pour ce mutant, seulement 7 % de glucose initialement présent dans milieu est consommé, alors que 29 % de glucose sont consommés chez la souche sauvage en conditions acides. Cette faible consommation de glucose pourrait expliquer les résultats obtenus. En effet, chez *Lactococcus lactis*, le passage de l'homofémentation à l'hétérofermentation est modulée par l'activité de la L-lactate déshydrogénase (LDH) [5]. En conditions de limitation de glucose, une faible concentration intracellulaire en fructose 1-6 diphosphate entraîne une diminution de l'activité LDH. Le pyruvate est, dans ce cas, dégradé pour former principalement de l'éthanol, de l'acide acétique et de l'acide formique. La réorientation des flux de carbone à partir du glucose observée chez la souche mutante peut laisser envisager une application industrielle de cette souche, notamment dans la production des produits de l'hétérofermentation. Une analyse complète des produits de la fermentation glucidique nous permettra de confirmer cette réorientation.

Chez *Ln. mesenteroides*, les bilans mmoles de D-lactate formées / mmoles de glucose consommées sont calculés après croissance à pH 6,5 sont comparables chez la souche sauvage et chez le mutant ATPase-déficient. Les valeurs supérieures à 1 indiquent un co-métabolisme glucose / citrate qui modifie le bilan hétérofermentaire du sucre. Les valeurs de ratios calculées après croissance à pH acide ne sont pas significativement affectées chez l'ensemble des souches testées.

L'activation du catabolisme des acides organiques observée chez les mutants ATPase-déficients issus de deux bactéries étudiées démontrent la biodiversité des mécanismes de régulation métabolique chez ce groupe de bactéries.

En conclusion, il faut souligner que ce travail est un complément indispensable pour la mise au point de souches « food-grade » adaptées à une utilisation industrielle optimisée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] AMACHI, S., K. ISHIKAWA, S. TOYODA, Y. KAGAWA, A. YOKOTA, and F. TOMITA. 1998. Characterization of a mutant of *Lactococcus lactis* with reduced membrane-bound ATPase activity under acidic conditions. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 62 : 1574-1580.
- [2] BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- [3] COX, D.J., T. HENICK-KLING. 1989. Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J. Bacteriol.* 171 : 5750-5752.
- [4] DE MAN, J.C., M. ROGOSA, and M.E. SHARPE. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- [5] THOMPSON, J., C.R. GENTRY-WEEKS. 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *Dans : Bactéries lactiques* (DE ROISSART, H., F.M. LUQUET et coordinateurs). Tome 1, pp 239-290. Loriga. Lavoisier. Paris.
- [6] FUTAI, M., and H. KANAZAWA. 1983. Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphate (F_0F_1) : biochemical and molecular biological approaches. *Microbiol. Rev.* 47 : 285-312.
- [7] KANNER, B.I., and D.L. GUTNICK. 1972. Use of neomycin in the isolation of mutants blocked in energy conservation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 111 : 287-289.
- [8] KOBAYASHI, H., and T. UNEMOTO. 1980. *Streptococcus faecalis* mutants defective in regulation of cytoplasmic pH. *J. Bacteriol.* 143 : 1187-1193.

- [9] KOBAYASHI, H., T. SUZUKI, N. KINOSHITA, and T. UNEMOTO. 1984. Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH. *J. Bacteriol.* 158 : 1157-1160.
- [10] LABARRE, C., J. GUZZO, J.F. CAVIN, and C. DIVIES. 1996a. Cloning and characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and malate permease of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 1274-1282.
- [11] LABARRE, C., C. DIVIES, and J. GUZZO. 1996b. Genetic organization of the *mle* locus and identification of the *MleR-like* gene from *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 4493-4498.
- [12] MARTY-TEYSSET, C., C. POSTHUMA, J.S. LOKEMA, P. SCHMITT, C. DIVIES, and W.N. KONINGS. 1996. Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 178 : 2178-2185.
- [13] POOLMAN, B., D. MOLENAAR, E.J. SMID, T. UBBINK, T. ABEE, T. RENAULT, and W.N. KONINGS. 1991. Malolactic fermentation : electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* 173 : 6030-6037.
- [14] RAMOS, A., B. POOLMAN, H. SANTOS, J.S. LOKEMA, and W.N. KONINGS. 1994. Uniport of anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generate a proton motive force in *Leuconostoc oenos*. *J. Bacteriol.* 176 : 4899-4905.
- [15] SALEMA, M., L. CAPUCHO, B. POOLMAN, M.V. SAN ROMAO, and M.C. LOUREIRO DIAS. 1996. In vitro reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). *J. Bacteriol.* 178 : 5537-5539.
- [16] TOURDOT-MARECHAL, R., L.C. FORTIER, J. GUZZO, B. LEE, and C. DIVIES. 1999. Acid sensitivity of neomycin resistant mutants of *Oenococcus oeni* : a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 178 : 319-326.
- [17] YAMAMOTO, N., Y. MASUJIMA, and T. TAKANO. 1996. Reduction of membrane-bound ATPase activity in a *Lactobacillus helveticus* strain with slower growth at low pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 138 : 179-184.
- [18] YOKOTA, A., S. AMACHI, S. ISHII, and F. TOMITA. 1995. Acid sensitivity of a mutant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 with reduced membrane-bound ATPase activity. *Biosc. Biotech. Biochem.* 59 : 2004-2007.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF SPONTANEOUS MUTANT STRAINS WITH REDUCED MEMBRANE-BOUND ATPASE ACTIVITY IN LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS AND LEUCONOSTOC MESENEROIDES SUBSP. MESENEROIDES

In lactic acid bacteria, membrane-bound ATPase and organic acid metabolisms play an important role in regulating cytoplasmic pH. In this study, mutants of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* were isolated as spontaneous neomycin-resistant mutants. Ten of these mutants harbored a significantly reduced ATPase activity that represented 24-57 % of that of wild-type strains. Their growth profiles were significantly affected in optimum conditions, pH 6.5 (35-77 % of wild-type strain growth levels). These mutants were found to be acid-sensitive in acidic conditions (pH 4.5 or pH 5.0). The physiological characterisations showed no inhibition of acid organic metabolism in these two lactic acid bacteria. In *Oenococcus oeni*, a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity was previously shown [16]. In contrast, a significant activation in malic and citric acid metabolism was observed in obtained mutants.

OCCURRENCE OF TRITERPENOID STRUCTURES IN A VIETNAMESE SPECIES OF *WOLFIPORIA COCOS*

STEPHAN HEINZE, ALBERT HARTL AND UDO GRAFE HANS-KNOLL

Institute for Natural Products Research Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena, Germany

TRINH TAM KIET

The Centre for Mycological Research of National Hanoi University

Key words: *Wolfiporia cocos*, 3-hydroxy-lanosta-7,9(11)-trien-21-oic acid (1), poricoic acid (2), 3-O-acetyl-tumulolic acid (3).

Wolfiporia cocos (formerly *Poria cocos*) is an East-Asian-North-American edible mushroom which is widely used in the Asian folk medicine as a drug¹. Especially the sclerotia of this fungus have been considered for the treatment of various diseases¹. Several species of *Poria* have been reported in the literature, but only two are belonging to the subgroup of *Wolfiporia*.

Metabolite production by *Poria cocos* (*Wolfiporia cocos*) has been described in detail by Tang et al. referring to Taiwanese sources of this mushroom^{2,3,4}. *Wolfiporia cocos* is also a widely distributed basidiomycete of Vietnam but up to date there were no reports describing metabolite formation by the Vietnamese species. Taking into account the practical importance of *W. cocos* in Vietnam it appeared as necessary to investigate the content of triterpene structures in this mushroom. Here we report the investigation of the extract of this fungus by HPLC-coupled mass spectrometry, the isolation and structure determination of three triterpenoid metabolites as the main steroid constituents of the sclerotium of *Wolfiporia cocos* MRC. *W. cocos* MRC is a typical Vietnamese variant of this species which is even cultivated for human usage.

I. EXPERIMENTAL PROCEDURES

A sclerotium of *Wolfiporia cocos* MRC Hanoi (150 g) was obtained from the fungal breeding station near Dalath (Vietnam)⁴.

Spectra were recorded on the following instruments: IR on a Shimadzu-FT-IR spectrometer in KBr, mass spectra (EI, ESI-MS) on AMD 402 sector-field, Quattro and Finnigan LCQ instruments (AMD Intectra, Bremen, Germany; VG Biotech Altrincham, England; Finnigan, Bremen, Germany). NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 500 NMR instrument.

HPLC was carried out on a Jasco isocratic HPLC (GROM-Sil RP₁₈ 3 µm; acetonitrile/H₂O 83:17, v/v) coupled to the ion-trap analyzer mass spectrometer LCQ (Finnigan, Bremen, Germany) equipped with electrospray ion source.

II. RESULTS AND DISCUSSION

150 g of a sclerotium sample of *Wolfiporia cocos* were extracted twice by 1 L ethyl acetate (each time for 24 hrs). The combined extracts were evaporated to dryness, and the residue (1.2 g) was subjected to TLC, HPLC, HPLC-MS and preparative column chromatography on silica gel 60.

TLC (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v, staining by 1 % vanillin in conc. H₂SO₄) displayed one blueish major spot with R_f 0.82 (1), and two with the same staining but lower intensity with R_f 0.75 (3) and 0.52 (2). In addition, a series of weakly staining and non-stainable minor components was visible.

Isocratic HPLC coupled to a benchtop mass spectrometer suggested the presence of six or more main components according to the UV absorbances (Fig. 1). However, the total ion current of most of the UV active peaks was comparably low (Fig. 1a). From the UV-active peaks the positive and the negative

ion mass spectra were recorded. As shown in Fig. 2 for compound 2 appearing at 2.36 min the $[2M+H]^+$, $[3M+H]^+$ and even $[4M+H]^+$ pseudomolecular ions were visible sometimes with a higher intensity as the $[M+H]^+$ ions. Thus for reliable disclosure of the molecular weights of components and subsequent database recherches for recurrent compounds the negative ion mass spectra supplied supporting evidence.

Depicted in Fig. 1b by arrows are the positions in the chromatogram which were characterized by MS. The pertinent molecular weights and the known products of *Poria sp.* possessing the same molecular weight are summarized in Table 1. Some of the known terpenoids of other *Poria* strains were recognizable in the Vietnamese species, too. However, the relative peak intensities during UV detection at 210 nm did not correspond to the real amounts of the components. Thus the TLC ($CHCl_3/MeOH$; 9:1; staining by 1% vanillin in conc. H_2SO_4) displayed only three major spots (see above). In order to determine their chemical nature in detail we isolated the components 1, 2 and 3 by the following chromatographic procedures:

500 mg of the residue of the ethyl acetate extract of *W. cocos* MNU was chromatographed on a silica gel column (5 x 100 cm. gradient elution by $CHCl_3$ (three column volumes), $CHCl_3/MeOH$ (9:1, four column volumes), $CHCl_3/MeOH$ (8:2, five column volumes). The eluted fractions were spotted on a silica gel sheet and stained by 1 % vanillin in conc. H_2SO_4 . Another sample was evaporated and subjected to electrospray mass spectrometry for the determination of the molecular weight. Fractions staining blueish were collected and rechromatographed on silica gel sheets (Merck, $CHCl_3/MeOH$, 9:1, v/v). Three pure compounds were thus isolated in amounts of 45 mg (2, R_f 0.82), 15 mg (3, R_f 0.75) and 12 mg (1, R_f 0.52), respectively, as waxy mass.

The structures of 1, 2 and 3 as shown in Fig. 3 were readily identified by high-resolution mass spectrometry and 2D NMR spectroscopy. Thus, HREI-MS furnished the M^+ ions of 1, 2 and 3 and the chemical formulas due to m/z 454.6935 ($C_{30}H_{46}O_3$; calc. .6915 (1)), m/z 498.3352 ($C_{31}H_{46}O_5$; calcd. .337 (2)), and m/z 528.3766 ($C_{33}H_{52}O_5$; calcd. .3715 (3)).

1D and 2D 1H and ^{13}C NMR spectra (COSY, DEPT, NOESY, HSQC, HMBC) furnished conclusive evidence for the structures of 1, 2 and 3 as shown in Figure 3 and their identity with the structures of other species of *Poria cocos*^{2,3)}.

Thus, the lanostane skeleton in 1 (3-hydroxy lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid) was proved by the presence of three olefinic methine groups (115.57, 120.40, 123.80 ppm), three quarternary olefinic carbons (127.71, 129.67, 133.34 ppm), one carboxyl (176.91 ppm) and one CH-O signal (76.73 ppm). In the ^{13}C NMR and DEPT spectra of 2 (poricoic acid A) two sp^2 hybridized CH_2 group (114.3 ppm), two olefinic methine and four olefinic quarternary carbons were readily observable as well as two carboxyl groups (174.1 and 178 ppm), four singlet and two doublet methyl groups and one CH-O carbon (77.56 ppm). Compound 3 (3-O-acetyl tumulosic acid, pachymic acid) was readily identified by the appearance of two carbonyls (170.6 and 155.14 ppm), five singlet and two doublet methyl groups, two CH-O signals (79.9 and 75.03 ppm), one olefinic methylene group (112.5 ppm) and two quarternary olefinic carbons. In addition, a singlet methyl group (33.12 ppm) was attributable to the 3-O-acetyl substituent. C,H long-range correlations on the HMBC spectra and $^1H,^1H$ correlations in the COSY spectra furnished conclusive evidence for the structures 1, 2 and 3 of Vietnamese *Wolfiporia cocos* products as shown in Fig. 3.

Biological activities of 1, 2 and 3: 1, 2 and 3 displayed weak antimicrobial effects against a spectrum of Gram-positive bacteria in concentration above 1 mg/ml.

The cytotoxicity of 1, 2 and 3 against cultivated L929 mouse fibroblast and HeLa cell lines was rather low with determined $LC_{50} \gg 50 \mu g/ml$. Moreover, moderate inhibition of steroid-3-dehydrogenase was measured with $IC_{50} > 30 \mu M$.

The investigations on a Vietnamese species of *Wolfiporia cocos* suggest that sclerotia of this mushroom from a rich source of mainly three terpenoid compounds (3-hydroxy lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid (1), poricoic acid A (2), 3-O-acetyl tumulosic acid (3)) which appear as rather harmless for human health due to their low cytotoxicity. The inhibition of steroid 3-dehydrogenase (as an enzyme of the inflammation cascade) shows that higher concentrations of 1, 2 and 3 could exert advantageous pharmacological effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge measurement of cytotoxicity by Dr. H. Dahse (HKI Jena, Germany) and support of this work by BMBF/DLR (project VIE-008/97).

REFERENCES

- 1) Kiet, T.T., *Scient. Journal VNU* **1999**
- 2) Tai, T. et al., *Phytochemistry* **1995**, *40*, 225
- 3) Tai, T. et al., *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2548
- 4) *Database on Natural Products*. Chapman & Hall Publishers, London, 1997

TÓM TẮT

Hạch nấm của nấm phục linh Việt Nam *Wolfiporia cocos* đã được khảo sát các cấu trúc triterpenoid bởi kỹ thuật HPLC kết hợp với MS. Ba hợp chất chính (3-hydroxy-lanosta-7,9(11)-trien-21-oic acid (1), poricoic acid (2), 3-O-acetyl-tumulosic acid (3) đã được sàng lọc và xác định cấu trúc phối hợp bởi những phương pháp MS và NMR.

SUMMARY

Skerotia of a Vietnamese species of *Wolfiporia cocos* were investigated for the occurrence of triterpenoid structures by HPLC-coupled mass spectrometry. Three main components (3-hydroxy-lanosta-7,9(11)-trien-21-oic acid (1), poricoic acid A (2); 3-O-acetyl-tumulosic acid (3)) were isolated and identified unambiguously by MS and NMR methods.

TABLE 1. Molecular masses of sample peaks A-K as determined by HPLC-coupled mass spectrometry (see Fig. 1b)

Sample peak	Time (min)	Molecular weight	<i>Poria</i> metabolites ⁴⁾
A	1.45-1.75	496. 514	poricoic acid D
B	1.99-2.12	484	poricoic acid B
C	2.36-2.52	498	poricoic acid A (2)
D	2.76-3.07	482	poricoic acid C
E	4.15-4.53	524, 526	unknown
F	4.80-5.01	528	3-O-acetyltumu-losic acid (3)
G	8.05 -8.9	454	3-Hydroxy-lanosta-7,9(11)-trien-21-oic acid (1)
H	9.36-9.61	456	3-hydroxy-lanosta-dienoic acid
I	11.22-11.97	-	-
J	13.16-13.74	768	unknown
K	18.24-18.95	768	unknown

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: Isocratic HPLC of a *Wolfiporia cocos* extract (GROM-Sil RP₁₈, 3 µm, 1 ml/min, 210 nm, acetonitrile/H₂O 83:17, 0,1 % trifluoroacetic acid). The molar masses of the individual peaks A-K were determined by HPLC-coupled electrospray MS (see Tab. 1). a) total ion current (ion chromatogram); b) UV absorbance (210 nm)

Fig. 2: Positive ion mass spectrum of HPLC peak with R_f = 2.36 min

Fig. 3: Structures of triterpene metabolites of a Vietnamese species of *Wolfiporia cocos*

- 1: 3-hydroxy-lanosta-7,9(11)-trien-21-oic acid^{1,2)}
- 2: poricoic acid A^{1,2)}
- 3: 3-O-acetyltumulosic acid^{1,2)}

Fig. 4: ¹³C NMR spectrum of poricoic acid (2) (in MeOH).

Fig. 1

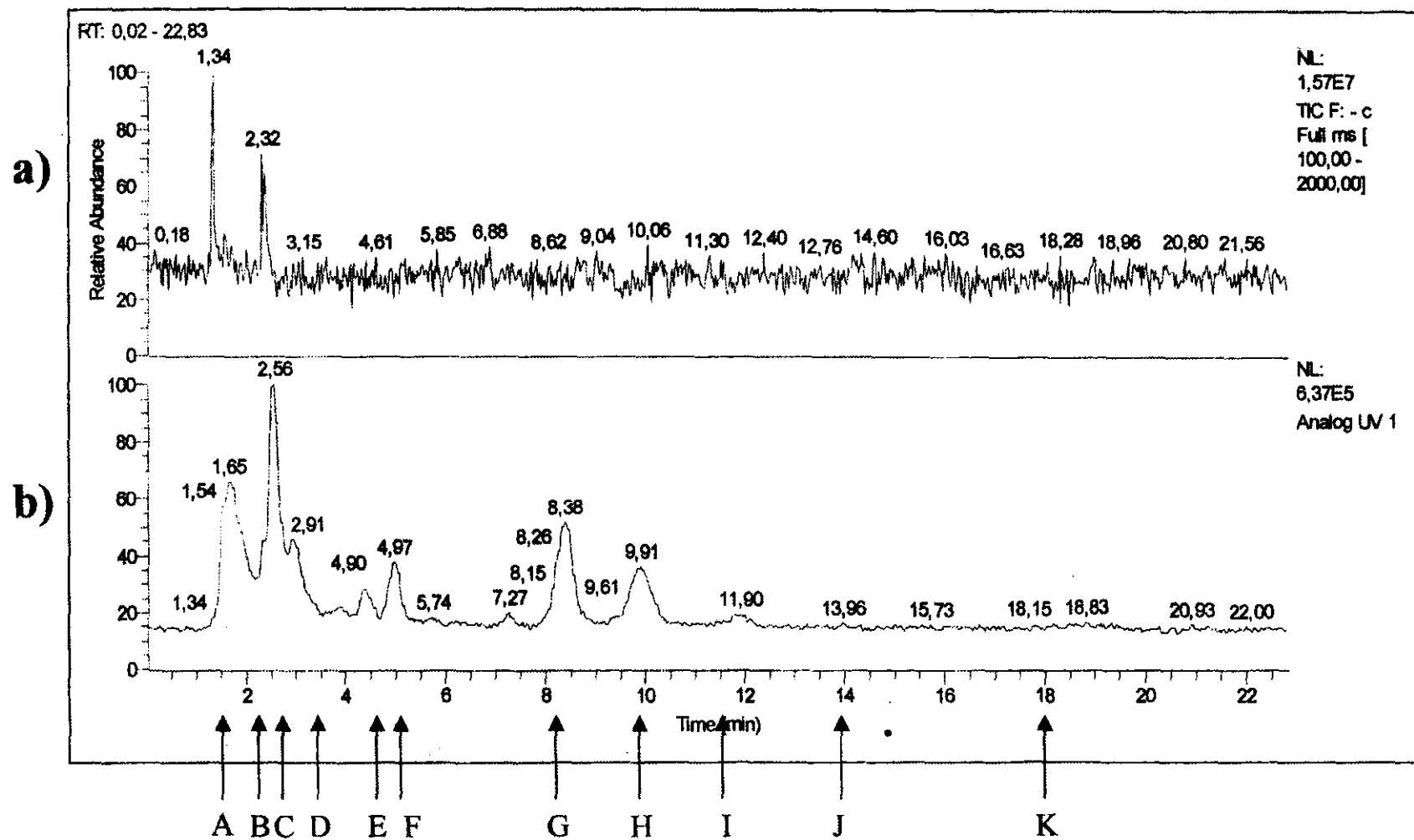
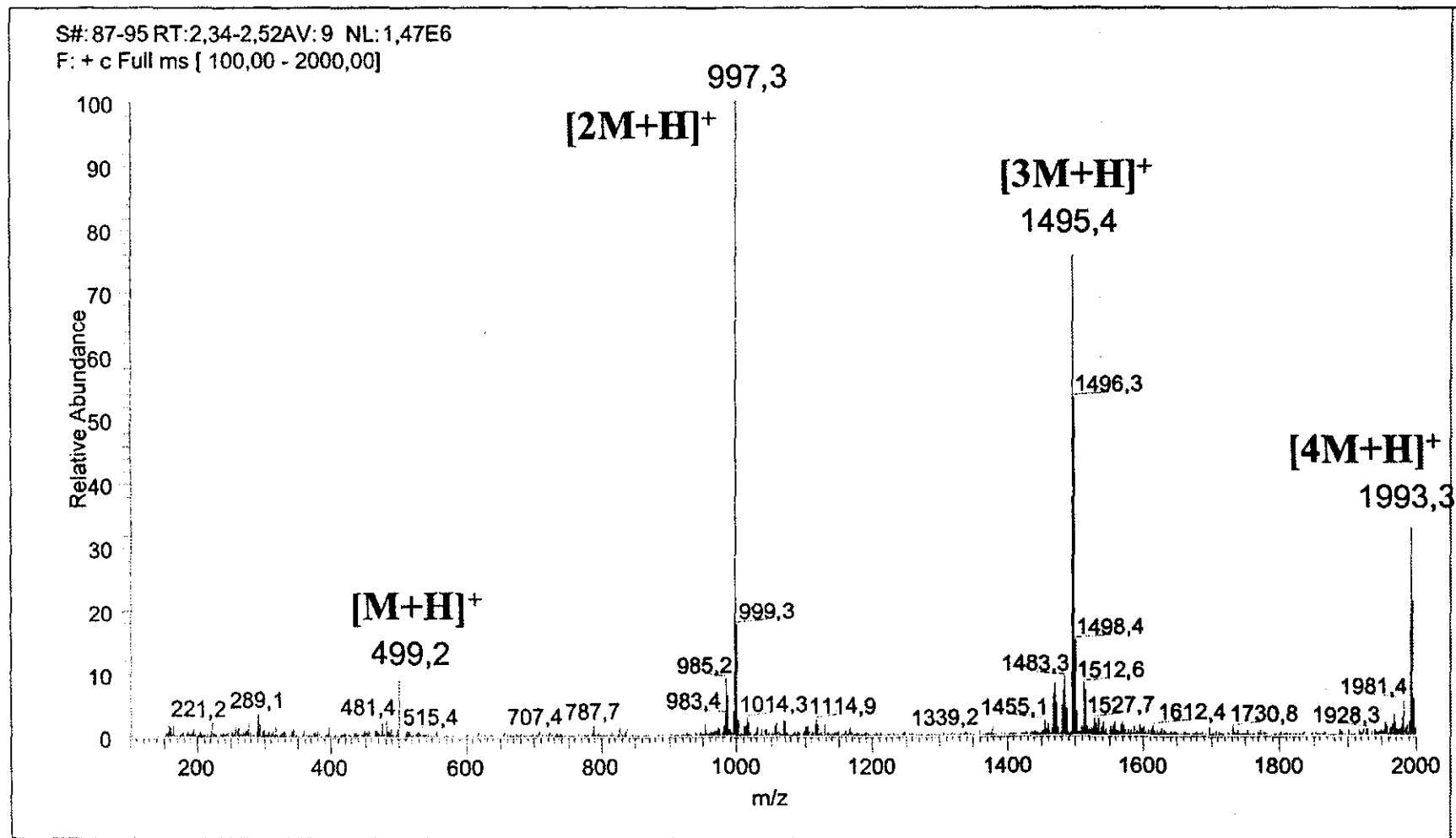


Fig. 2



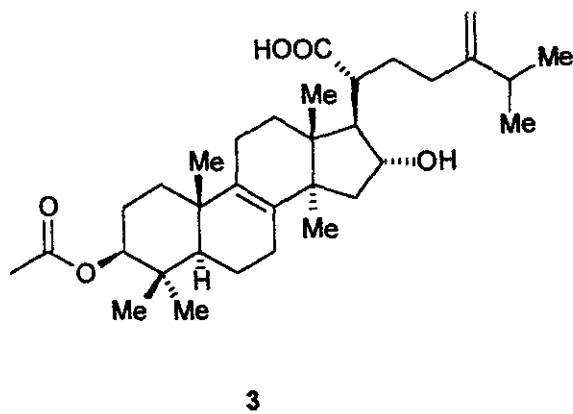
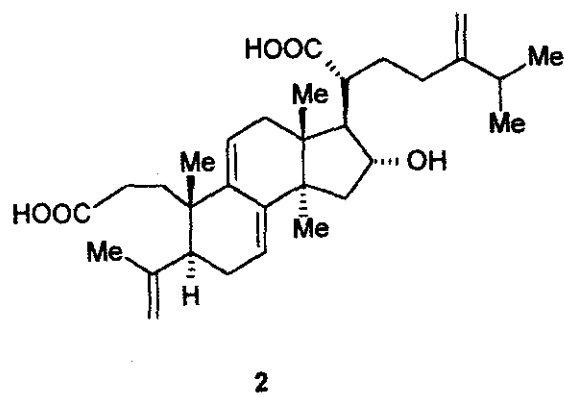
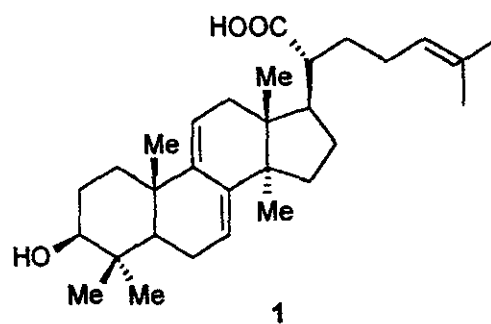


Fig. 3

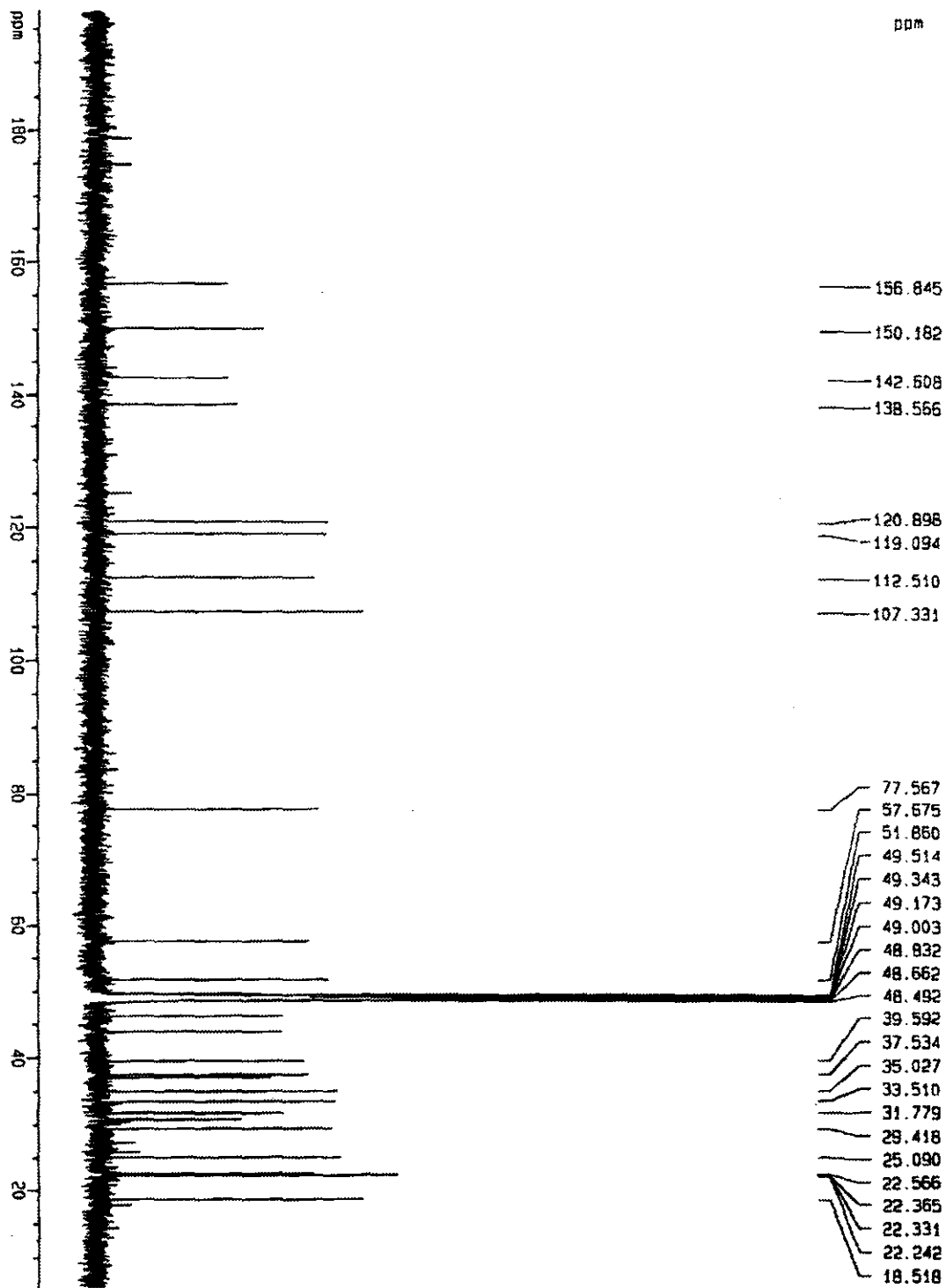


Fig. 4

STRENGTHENING OF THE SERICULTURE DEVELOPMENT IN TRADITIONAL REGIONS.

(SERICULTURE FOR RURAL DEVELOPMENT
PROGRAM, PROJECT BY CITB AND VITRANET)

NGUYEN BA SUU
*Center for Information and technology
Transfer in Biology (CITB)*

I. OBJECT:

The traditional regions all have specific characteristics, those are a dense population, condition in conformity to mulberry planting and silkworm rearing. Their sound foundation will be mobilized by the Project, with foresee tendencies to carry out baseline surveys on sericulture plantations; to acquire and introduce actual experiences related to mulberry farming and silk production; to provide technical/managing training on mulberry farming, silk production and marketing; to organize programs of technology/input supply required for mulberry farming and silk production.

1.1. To take a statistical table of Mulberry area in 8-17 provinces of North Vietnam.

1.2. To review typical sericulture units of the traditional regions.

1.3. Training new technology of the links with mulberry planting, silkworms rearing, mounting and cocoon harvesting and cocoon reeling.

1.4. To organize system of the seri-farming services for Rural, with Mulberry Plantation: 650 hectares, 1000 silkworm rearing households; production of silk: 130 trainees.

2. JUSTIFICATION:

Vietnam has sericulture source from "Mulberry Tribe" even in ancient time (Thuan Thanh Bac Ninh at present). Mulberry Tree (*Morus alba L.*) is especially suitable with planting on the Alluvial land and early populazing overall valley of large River as Red River, Chersh River, Peaceful River.... The Silkworm rearing was favourably developed and it was played an important role in Agriculture and Rural. The Silkworm rearing households were unwinding and weaving silk by themselves. There are many famous silk stuffs with it was born the name of the location as: Silk Nam Dinh, Floss Bac Ninh, Gauze Silk Ha Dong, Tusore Son Tay. The Silk Fabric was early sent to Europe over by the "Silk Road"^{*1}, from traditional regions, with amounted per year in the 16th century.

2.1. In the first years of the XX century, world mulberry silk Economy lost its first rank by the competition of Artificial silk, but in Vietnam, silkworm industry was impacted no-considerably silk yield amounted still about 150 tons per year and mulberry area was about 11,500 ha only in North Vietnam (in 1931).

Period of prosperity of the co-operatives, according to policy of Minister for Agriculture and the Vietnam Woman's Federation (1982) considerably achievements were recorded in sericulture, specially Vu Thu (Thai Binh province) reached yield 100 tons cocoons with mulberry Plantation in 115 ha, raising average yield is 0.9 ton/hectare and productivity value is 2 times more than rice planting on the same area. (in 1983).

2.2. Present condition of Vietnam Sericulture, entering economic management renovation in Agriculture (in 1988). Sericulture production was attached special importance to export raw silk. The recovery and development program were placed on the Union of Vietnam Sericulture Enterprises (VISERI), with the objectives rapidly opening the mulberry area, the major concentration is provinces of Western Highland. The new mulberry planting area was 12.000 ha. It was only in individual Lam Dong (in 1993), but after that, it was not held fast. At this time, all brands of sericulture in Vietnam have got 11.600 hectares of mulberry, about 2.300 silkworm rearing households, estimate as possible 5.800 tons of cocoons, it could be 640 tons of raw silk per year. There are 25 factories of unwinding silk from cocoon, with its full capacity are 1842 tons of silk per year (in 1998). In fact, the total of cocoon supplied by seri-farming is not quantity enough to reeling, with 30 percent of the machines.

^{*1} the "Silk Road" was a road for friendship and cultural exchanges between China and Central Asian Countries

2.3. Today, mulberry silk yet is supervote in quality to any other textile fibres. Silk "the Queen of fibres" is admired by consumers all over the world, but silk and silk products are always in great demand. The world average silk consumption rate per caput was only about 12 grams (in 1977). Endowed with favorable condition for mulberry and silkworm rearing, Vietnam has great potential for sericulture.

Vietnam is among types of stress on export, with more than half the total output for export. Meanwhile, European countries only process for reselling, imported raw silk is partly for home use and partly for export after processing. The countries, with advanced factories, always have demand for imported raw silk from agriculture countries. In Vietnam traditional regions, seri-farmers have experiences, but their element of Economy is as for poor, silkworm rearing still follow in Traditional Methods, yellow cocoon rate of the total cocoon yield is considerably (about 70 percent, in 1998).

High technologies are required. The aim in the development of the silkworm industry should be to obtain maximum quality and quantity of cocoon and raw silk in the most economical manner. Therefore, for mulberry planting, good quality and large quantities are both needed. The strengthening of sericulture recovery and development in the traditional region is needed. Concurrently, it is required from farmer real life at present. If the project will be approval, it would be to set up works and would have increase incomes in Agriculture and Rural.

The links in sericulture those that concern and affect one another, therefore, the target groups and their activities have differences for proposed methodology and participants, who as representative body of sericulture business including the seri-farmers, processors, reelers, traders etc. of traditional regions..

Summary:

There are many links in sericulture, with agriculture, industry, commerce and trade. As to agriculture, the mulberry must be well planed, the silkworm well reared a bred in order to propagate good varieties. Anything lost or gained in each link affects the success and economic benefit. What is needed in Vietnam to develop sericulture and sericulture industry is an integrated approach, much like the one put forward by sericulture for Rural Development Program. According at the heart of which is training of technical personnel concerned. It will be carried out by the project "Strengthening of the Sericulture Development in Traditional Regions", including training new technology related to mulberry farming and silk production, acquiring actual experience to sericulture recovery and Development.

ANNEX :

The Sericulture data of Vietnam in 4 period of XX century

The Sericulture data(Source of other supply*)	1930 (1*)	1983(2*)	1993(3*)	2000(4*)
Planed area of mulberry(Thours.ha)	19200	9860	26700	12975
Gross output of Presh cocoons(Tonnes)	3.400	3500	7440	10500
Gross output of Raw silk(tonnes)	230	290	700	1235

REFERENCES

- 1*, Economic agriculture in Indochina -1932, Yves Harry, France
- 2 *, Report of the Sericulture Department in 1984, Vietnam
- 3*, Report of the Union of Vietnam Sericulture Enterprises(VISERI)
- 4*, Report of the Vietnam Sericulture Corporation(VISECO)
- 5, Influence of temperature and humidity on reliability of silkworm cocoons-Nguyen Ba Suu. Hanoi Agriculture University, Published No: X-1981
- 6, Survey sericulture development in Pleiku province 1978-Nguyen Ba Suu., Hanoi Agriculture University, Published No: X.1981
- 7, FAO Agricultural services bulletin 73/1,73/2,73/3- Food and Agr. org. of the United Nations

VIRUS ARN MẠCH KÉP TRONG NẤM MEN SINH KHÁNG SINH *TORULASPORA DELBRUECKII*

VŨ NGUYỄN THÀNH¹, NGUYỄN HƯƠNG GIANG¹, ĐINH MỸ HÀNG¹,
HEINRICH LÜNSDORF², PETER GOLYSHIN²

1 - Viện Công nghiệp Thực phẩm, Hà nội, Việt nam

2 - Trung tâm nghiên cứu Công nghệ sinh học quốc gia, Braunschweig, LB Đức

I. MỞ ĐẦU

Killer toxin, hay còn gọi là zymocin là loại kháng sinh được một số chủng nấm men và vi nấm tiết ra nhằm chống lại sự cạnh tranh các chủng cùng loài, hoặc chủng thuộc họ hàng gần. Hiện tượng này lần đầu tiên được Bevan và Macower phát hiện năm 1963 trên nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Cho tới nay, khả năng sinh zymocin đã được tìm thấy ở nhiều chủng thuộc các họ khác nhau như: *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Sporidiobolus*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* (Schmitt & Neuhausen, 1994; Magliani et al., 1997; Vondrejs & Palkova, 1997). Tất cả các zymocin được biết đến đều là những polypeptide, hoặc glycoprotein. Đặc tính sinh zymocin có thể được mã hoá trên ARN mạch kép, ADN plasmid mạch thẳng, hoặc trên chromosome. Mọi quan tâm tới zymocin ngoài ý nghĩa để tìm hiểu thế giới tự nhiên đa dạng còn mang nhiều giá trị thực tiễn. Do tính chọn lọc rất cao, zymocin có tiềm năng như những chất kháng sinh hữu hiệu chống lại một số bệnh nan y gây ra bởi nấm và nấm men. Zymocin còn hứa hẹn nhiều triển vọng là những kháng sinh an toàn trong việc bảo quản thực phẩm chống sự phá huỷ của nấm men. Các plasmid, virus liên quan có thể và đã được ứng dụng làm các vector trong công nghệ gen.

Trong quá trình phân lập và tuyển chọn các chủng nấm men sinh kháng sinh, chủng G361.7 được nhóm nghiên cứu tại viện CNTP phát hiện. Chủng này đã được định tên dựa trên một số đặc điểm sinh lý và hình thái là *T. delbrueckii*. Yếu tố di truyền quyết định khả năng sinh kháng sinh của loài trên cho tới nay chưa được biết đến. Do vậy, đề tài nghiên cứu này sẽ đề cập đến vấn đề nói trên.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Chủng giống

Nấm men G361.7 được phân lập từ ruột loài quần chấu *Pachiyulus flavipes*, và là một trong số vi sinh vật cộng sinh quan trọng của động vật này (Byzov et al., 1993). Các chủng *Saccharomyces cerevisiae* SBY-2576 (chủng mẫn cảm) và K7 (sinh killer nhóm K1) từ Suu tập Giống Vi sinh vật CHLB Nga do TS W. Golubev hảo tâm cung cấp được sử dụng làm đối chứng. Nấm men được bảo quản tại Viện Công nghiệp Thực phẩm ở điều kiện -20°C trong môi trường chứa 10% DMSO, trên ống thạch nghiêng (nước malt 2Bx, agar 2%)

2. Hoạt tính sinh kháng sinh

Để kiểm tra hoạt tính sinh kháng sinh (killer), môi trường YMA-NaCl (glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, NaCl 3%, agarose 1%) chứa đệm citrate-phosphate 50 mM, pH 4.5 được làm nguội tới 45°C và rót vào đĩa Petri đã cấy sẵn 1ml dịch huyền phù chứa khoảng 10⁶ tế bào chủng mẫn cảm. Các giếng có đường kính 5 mm được khoan vào mặt thạch. Chủng sinh kháng sinh được nuôi cấy 1 ngày trên môi trường YM, sau đó được ly tâm để loại bỏ tế bào. Canh trường được nhỏ vào các giếng (30µl/giếng). Các đĩa Petri được lưu giữ ở nhiệt độ 25°C. Khả năng sinh kháng sinh được đánh giá sau 1-2 ngày thông qua sự có mặt của các vòng vô khuẩn quanh giếng.

3. Phân loại nấm men

Việc phân loại nấm men được kiểm chứng bằng cách đọc trình tự của vùng D1/D2 trong gen 26S rRNA. Các môi cũng như điều kiện PCR được thực hiện dựa theo công bố của Kurtzman và Robnett (1998). PCR được thực hiện trên máy Landgraf Thermocycler (Đức). Trình tự ADN được đọc bằng phương pháp “dideoxy chain termination” với việc sử dụng kit Ampli Taq (Amersham) theo hướng dẫn của hãng. Máy đọc trình tự, model 373 của hãng Applied Biosystem được sử dụng. Đầu tiên các chuỗi ADN được so sánh với GeneBank thông qua giao diện tìm kiếm Blast. Các chuỗi liên quan được chuyển tải về, sau đó so sánh bằng các phần mềm ClustalW, BioEdit.

4. Phân lập và tinh sạch hạt virus

Hạt virus từ *T. delbrueckii*, chủng G361.7 và *S. cerevisiae*, chủng K7 được phân tách trong gradien của CsCl. Một lít dịch huyền phù sau khi nuôi cấy một ngày trong môi trường YM được thu nhận. Tế bào được rửa 2 lần bằng ly tâm và sau đó được trộn đều trong 30 ml môi trường đệm A (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol). Tiếp theo, tế bào được phá vỡ bằng máy nén French sau 2 chu kỳ. Vỡ tế bào được loại bỏ nhờ ly tâm ở gia tốc quay 9600×g trong 30 phút. Phần dịch phía trên được ly tâm tiếp ở điều kiện 100.000×g trong 40 phút. Phần lắng được hoà vào đệm A, làm trong bằng ly tâm ở 5000×g trong 30 phút. Tỷ trọng dung dịch được chỉnh tới 1.35 g/ml bằng CsCl trong tổng thể tích 30 ml. Dung dịch được tiếp tục ly tâm ở 150.000×g trong 20 giờ và các phần nhỏ dung tích 1 ml được thu nhận. Từ mỗi phần, 40 μ l được lấy ra, tách chiết bằng 40 μ l phenol-chloroform và thẩm tách trong nước sử dụng màng nitrocellulose (loại 0.025 μ m, Millipore). Sản phẩm được thử để tìm sự có mặt của ARN mạch kép (dsRNA) thông qua điện di. Các phần có chứa dsRNA được dồn lại (khoảng 2-3 ml) và hoà thêm đệm A để đạt 15 ml. Dịch này tiếp tục được ly tâm ở 150.000×g trong 2 giờ. Phần dịch được loại bỏ, phần kết lắng được rửa qua bằng một lượng nhỏ của đệm A, sau đó hoà trộn vào đệm A có chứa 20% glycerol. Các hạt virus có thể bảo quản như vậy ở -20°C.

5. MALDI và TEM

Protein vỏ được tinh sạch sử dụng SDS-PAGE chứa 8% poly-acrylamide. Để chuẩn bị mẫu, 25-100 μ l tiêu bản hạt virus sạch được kết tủa bằng 3 thể tích ethanol, ly tâm ở 14,000 v/phút trong 10 phút. Phần kết tủa được làm khô, sau đó hoà tan qua đệm trong 20 μ l đệm tải nạp. Trước khi nạp, mẫu được biến tính ở 99°C trong 10 phút. Sau khi điện di, gel được nhuộm bằng Coomassie. Các vạch được cắt rời và phân tích bằng MALDI. Tiêu bản hạt virus ban đầu được nhuộm âm bản (negative staining), sau đó được quan sát bằng TEM.

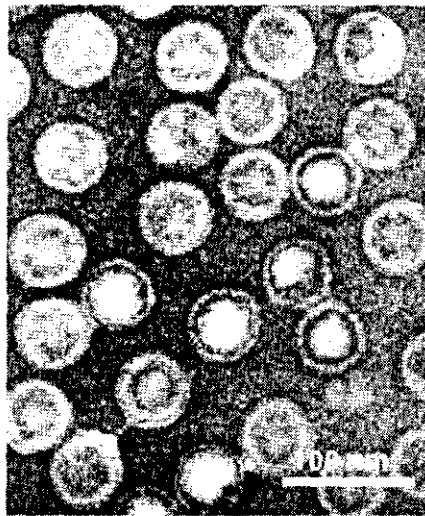
6. Chứng minh bản chất virus là ARN mạch kép

Để chứng minh bản chất ARN mạch kép của thông tin di truyền trong virus, tiêu bản virus thô được cắt bằng các enzym sau: DNAase I (1 μ g/ml), RNAase (1 μ g/ml), Nuclease S1 (400 U/ml) (Boehringer Mannheim GmbH) trong môi trường đệm thích ứng (Sambrook et al., 1989). Lambda ADN (Biolabs, New England) được bổ xung ở nồng độ 5 μ g/ml và sử dụng như ADN chuẩn. Phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút.

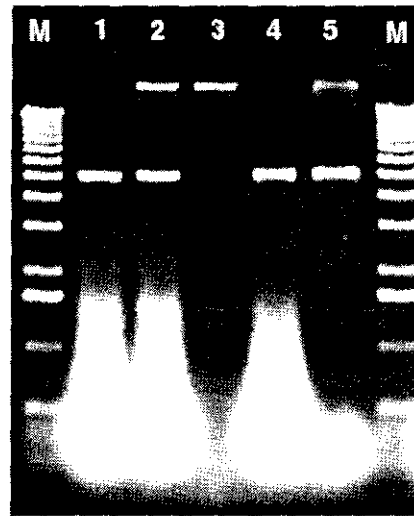
III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Trình tự ADN của phân đoạn D1/D2 trong gen 26S rRNA khẳng định chủng G361.7 thuộc loài *T. delbrueckii*, đúng như khi phân loại chỉ sử dụng các đặc điểm sinh lý, hình thái. Trong cả chuỗi được đọc trình tự (540 bp), chủng này không có nucleotide nào khác so với chủng *T. delbrueckii* NRRL-Y866 đã công bố. Tương tự như vậy, chủng K7 cũng được khẳng định là *S. cerevisiae*. Điều này cũng phần nào tái khẳng định độ tin cậy của các phương pháp phân loại cổ điển đối với nấm men Ascomycetes.

Chủng G361.7 sinh kháng sinh (zymocin) chống chủng mẫn cảm *S. cerevisiae* SBY-2576. Kích thước của zymocin của chủng G361.7 nhỏ hơn 100KDa nhưng lớn hơn 30KDa. Điều này được khẳng định vì zymocin trên có khả năng lọt qua màng lọc 100KDa MWCO, nhưng bị giữ lại ở màng 30KDa MWCO. Zymocin này có thể dễ dàng bị ức chế bởi tác động nhiệt và thể hiện hoạt tính mạnh nhất chống *S. cerevisiae* ở pH 4.5. G361.7 có chứa virus RNA mạch kép (dsRNA) với kích thước khoảng 5Kbp. Bản chất trên (dsRNA) được thể hiện qua sự mẫn cảm với RNAase, nhưng bên dưới tác động của DNAase I và Nuclease S1 (Hình 1B). Tiêu bản dsRNA của *S. cerevisiae* đối chứng cũng thể hiện đặc tính tương tự. DsRNA của chủng *T. delbrueckii* G361.7 có kích thước gần với LA dsRNA ở *S. cerevisiae*. Hạt virus tinh sạch từ nấm men *T. delbrueckii* G361.7 có kích thước đều đặn với đường kính xấp xỉ 40 nm. Hạt này thể hiện những đặc điểm của hình khối đều 20 mặt (icosahedron) (Hình 1A). Một bức tranh tương tự cũng được thấy đối với tiêu bản của chủng đối chứng *S. cerevisiae* K7. Có lẽ cũng đáng nhắc lại, đặc tính sinh zymocin ở *S. cerevisiae* được đảm bảo bởi sự có mặt đồng thời của hai loại dsRNA, đó là LA (4.6 Kbp) và M (1.9 Kbp). M dsRNA mã hoá zymocin, còn LA dsRNA mã hoá capsid protein cũng như ARN-phụ thuộc-ARN polymerase đảm bảo cho sự duy trì của cả LA và M.



(A)



(B)

Hình 1. Virus ARN mạch kép từ nấm men sinh kháng sinh *T. delbrueckii*, chủng G361.7

A - ảnh chụp qua kính hiển vi điện tử (TEM) thể hạt virus tinh sạch từ G361.7

B - thí nghiệm chứng minh G.361 chứa dsRNA; M - thang 1Kb;

1- Tiêu bản gốc chứa dsRNA; 2- Tiêu bản gốc bổ xung lamda ADN; 3- Hỗn hợp trên (2) sau khi xử lý bằng RNAase; 4 - Sau khi xử lý bằng DNAase I; 5 - sau khi xử lý bằng Nuclease S1.

Nhằm mục đích kiểm tra liệu thể hạt virus trong G361.7 và LA trong *S. cerevisiae* có là một hay không, capsid protein của cả hai được tinh sạch và khảo sát. Trong khi phổ MALDI của capsid protein từ *S. cerevisiae* K7 ngay lập tức được nhận biết thì phổ MALDI của *T. delbrueckii* G361.7 không thể xếp vào phổ của những virus đã được biết. Như vậy, thể hạt virus từ *T. delbrueckii*, chủng G361.7 là khác so với LA trong *S. cerevisiae* và có lẽ nằm trong số những virus chưa được nghiên cứu. Mối liên kết giữa sự tồn tại của thể hạt virus dsRNA trong *T. delbrueckii* G361.7 và khả năng sinh zymocin tuy vậy vẫn chưa được làm sáng tỏ. Những cố gắng của chúng tôi trong thời gian tới sẽ tập trung vào mối liên hệ trên.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện, nhờ sự động viên giúp đỡ của ông Ngô Tiến Hiến và các đồng nghiệp tại bộ môn Vi sinh, VCNTP. Một phần kinh phí được hỗ trợ bởi Carl Duisberg Gesellschaft e.V.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Byzov, B.A., Thanh V.N., & Babjeva, I.P.: Interrelationships between yeasts and soil diplopods. *Soil Biology and Biochemistry*. 25, 1119-1126 (1993).
2. Kurtzman C.P. & C.J. Robnett. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73, pp. 331-371 (1998).
3. Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., & Polonelli L. Yeast killer system. *Clinical Microbiology Review*. 10. p. 369-400 (1997).
4. Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
5. Schmitt M.J. & Neuhansen F. Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeast *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of Virology*. 68, p. 1765-1772 (1994).
6. Vondrejs V. & Palkova Z. Chapter 9. Chemical warfare among the yeasts: the “killer” phenomenon, genetics and application. In: J.F.T. Spencer & D.M. Spencer (eds) *Yeast in natural and artificial habitats*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1997).

SUMMARY

DOUBLE STRANDED RNA VIRUS ASSOCIATED WITH KILLER YEAST *TORULASPORA DELBRUECKII*

VU NGUYEN THÀNH, NGUYEN HUONG GIANG, ĐINH MI HANG,
HEINRICH LÜNSDORF, PETER GOLYSHIN

Killer toxins are secreted by certain yeast strains to kill the competitive. The toxins have been mapped on dsRNA, linear dsDNA, and chromosome. Association of dsRNA virus with killer phenomenon in *T. delbrueckii* has not been reported.

Killer yeast *T. delbrueckii* strain G361.7 was isolated from the gut of *Pachyiulus flavipes* and identified based on morphology, physiological properties, and by partial sequencing 26S rDNA. Virus-like particles (VLPs) were isolated in CsCl gradient. VLPs were negative-stained and visualized by TEM. Capsid protein was isolated using SDS-PAGE and analyzed by MALDI.

Partial sequence of 26S rDNA confirmed that G361.7 belonged to *T. delbrueckii* as suggested by physiological and morphological properties. It showed no difference in the sequenced 540bp from the reported for *T. delbrueckii*. The yeast secreted killer toxin of the size less than 100KDa but greater than 30KDa as indicated by ultrafiltration. The toxin was heat sensitive and had highest activity at pH 4.5. VLP from G361.7 showed a clear ethidium bromide stained band about the same size with LA in *S. cerevisiae*. It was sensitive to treatment with RNAase but remained intact after DNAase or nuclease S1 digestion. This confirmed the dsRNA nature of the associated VLPs. The VLPs had regular shape with pattern of icosahedron particles ca. 40nm in diameter. In order to verify whether or not the VLP in G361.7 is identical to LA in *S. cerevisiae* the capsid proteins from both were purified and analyzed. While MALDI spectrum of capsid protein in *S. cerevisiae* was positively identified, the spectrum of G361.7 could not be referred to any known virus protein. The connection between the presence of dsRNA VLPs and killer phenotype in *T. delbrueckii* remains unclear and will be subject of further investigation.

**IMPROVING MICROPROPAGATION TECHNOLOGY ON PINEAPPLE (CAYENNE)
BY USING THIN CELL LAYERS, APICAL DOMINANCE BREAKING AND
HYDROPONIC METHOD**

NGUYEN QUANG THACH, NGUYEN THI NHAN
NGUYEN KHAC THAI SON, DINH TRUONG SON
Hanoi Agriculture University No.1

I. INTRODUCTION

Vietnam is located between latitudes 8°10' and 23°24' North. It is very suitable to grow pineapple in Vietnam. However, production area and the average yield of pineapple has decreased continuously recently.

**Table 1-
Production area and average yield of pineapple**

Growth rate	1989	1990	1991	1992	1993	Growth rate (%) 1989-1993
Production area (ha)	44625	44003	38107	34690	36690	- 17.7
Gross output (tons)	458497	467851	420215	264216	260509	- 43.1

Ministry of Agricultural and Rural development runs a project in order to have 20,000 ha pineapple production area and the average yield is reached 40 tons/ha to supply pineapple fruit for processing and exporting in 2010. If each ha need 50,000 plants to grow, therefore 20,000 ha requires one billion material plants.

Conventional multiplication method can not supply enough such a large number of plants in very short time. Micropropagation has many uses in agricultural yield. In that by means of this technique, a large number of plants can produced which are difficult to reach by conventional method. This situation showed that, micropropagation is the most efficient method to reach the goal. The process of pineapple micropropagation has been invented and developed by some organization such as Institute of biotechnology. Institute of vegetable and fruit... However there are many problem that needs improving.

Shortening of the shoot regeneration duration.

Increasing of multiplication rate

Reducing of regulator consumption in order to prevent soma variability

Increasing of growth rate to shorten growing time in nursery duration.

Reduction production cost of planting materials.

II. MATERIAL AND METHODS.

2.1. Material

Cayenne pineapple variety

2.2. Methods

Plants were collected by Phuho fruit research center. They were disinfected with 0,1 % HgCl₂ solution for 5 min and rinsed five times with sterile distilled water. Aseptically explant allowed to grow on the Murashige and Skoog (1962) basal medium (MS).

Thin cell layers

Thin cell layers (TCLs) composed of a few layers of cell is excised transversely at a thickness of 0.5 mm from the stem of plant. Five TCLs are excised from a stem of single shoot.

The media were solidified with agar-agar and adjusted to pH 5.5 before autoclaving.

Ten TCLs were inoculated into each vase

Single shoot, clump of shoots, Apical dominance breaking single shoot culture

International Workshop on Biology. Hanoi – Vietnam 2-5 July 2001

Single shoot, clump of shoots, apical dominance breaking single shoot were inoculated onto a MS medium which were combined with either α NAA (0; 0.05; 0.1 ppm) or IBA (0; 0.05 ppm) or BA (0; 0.5; 1 ppm). The media were solidified with agar-agar and adjusted to pH 5.5 before autoclaving. Four single shoot, four clump of shoots, four apical dominance breaking single shoot TCLs were inoculated into each vase.

The experiments were replicated 3 times. Observations were made at every five days. Explants were incubated at 26°C under artificial light is provided by cool-white fluorescent tubes of 40W. The light intensity ranges of 2000 lux. The light duration is 16 hours per day.

At nursery stage: Experiment arrangement following completely randomized design (CRD). Trials put in two roofs house, the under roof covered by plastic, the upper roof for shading. The experiments were replicated 3 times. Observations were made at every two weeks.

III. RESULT

Table 2
Comparison of shoot regeneration ability from TCLs and single shoot

Method	Appearance of shoot (day)	Number of shoots per explant	Total number of shoot
TCLs	10	2	10 *
Single shoot	30	1	1

*Five TCLs are excised from a stem of single shoot

The result in the table 1 showed that, after only 10 days of culture, shoot were observed on the surface of TCLs meanwhile the requirement time to regeneration a shoot through single shoot culture is 30 days. TCLs method not only bring about highly regenerated ability but also bring about more shoot (10 shoots compared to 1). This is great precious characteristic that the process of initial material creating will be shortened through this method.

To find out the optimum medium in enhancing regenerated ability, TCLs were inoculated onto a MS medium containing 0.6 ppm 2,4 D which were combined with either Kinetin (0; 0.05; 0.1 ppm) or BA (0; 0.05; 0.1 ppm).

Table 3
Comparison of shoot regeneration ability on MS medium containing 2,4-D (0.6ppm) which were combined with either Kinetin or BA

Medium	Concentration of 2,4-D, K, BA			Number of shoots per TCLs	Total number of shoot (after 30 days)
	2,4-D	K	BA		
Control	0	0	0	2	10.0
1	0.6	0	0	0.4	2.0
2	0.6	0.05	0	3.78	18.9
3	0.6	0.1	0	3.38	16.9
4	0.6	0	0.05	2.18	10.9
5	0.6	0	0.1	2.4	12.0

The result in the table 2 showed that, 2,4-D inhibited shoot regeneration (0.4 shoots per TCLs on the medium containing 0.6 ppm 2,4-D compared to 2 shoots on the basal MS medium). Shoot

International Workshop on Biology. Hanoi – Vietnam 2-5 July 2001

regeneration is better when supply BA or kinetin in addition to 2,4-D. However, as the concentration of BA increased, the percentage of shoot regeneration decreased (3.38 shoots per TCLs on the medium containing 0.6 ppm 2,4-D and 0.1 ppm BA compared to 3.78 shoots on the medium containing 0.6 ppm 2,4-D and 0.05 ppm BA) meanwhile the concentration of kinetin increased, the percentage of shoot regeneration also increased (2.18 shoots per TCLs on the medium containing 0.6 ppm 2,4-D and 0.05 ppm kinetin compared to 2.4 shoots on the medium containing 0.6 ppm 2,4-D and 0.1 ppm kinetin). The regeneration achieved the highest rate on MS medium containing 0.06ppm 2,4-D and 0.05 ppm kinetin.

Table 4
Influence of multiplication method on the shoot regeneration ability

Method	Multiplication rate	Shoot weight (gr.)	Shoot height (cm.)
Single shoot	4	0.4	3.1
Clump of shoot	10.2	0.25	2.2
Apical dominance breaking single shoot	20.5	0.28	2.3

The result showed that shoot multiplication ability was 2.55 times higher when they were cultured in clump, multiplication rate is 10.2 on clump of shoot culture method compared to 4 on single shoot culture. However, gained shoots had lower weight and height when they were cultured in clump. Apical dominance breaking single shoot not only promoted the shoot regeneration process but also stimulated a further development in weight and height of the shoots. Shoot multiplication ability through apical dominance breaking single shoot was 5.12 times higher than single shoot and 2 times higher than slump of shoot culture and gained shoots had higher weight and height compared to single shoot culture. In order to stimulate multiplication rate and reduce regulator consumption in multiplication duration and prevent soma variability, apical dominance breaking single shoot is recommended

Table 5
Influence of multiplication method on the shoot regeneration ability

Norm Planting methods	Plant height (cm.)	Plant weight (gr.)	Total leaves (leaf)	N ^o of life leaves (leaf)	Leaf diameter (cm.)	N ^o of main roots (root)	Average root length (cm.)
	Soil culture (control)	15.4	18.12	12.16	14.33	20.79	12.21
Hydroponics	14.86	18.67	13.00	18.63	23.99	12.50	12

Height of plant is considered main criteria for transplanting to the field of crops at nursery stage. Table 4 showed that: pineapple tend to grow better at hydroponics culture than soil culture

Table 6
Economy efficiency of planting method at nursery stage of pineapple

Norm Planting methods	Seedling	Materials and labour	Total costs	Production costs	Duration
	VND/plant	VND/plant	VND/plant	VND/plant	Month
Soil culture (control)	300	162	462	630	8.0
Hydroponics	300	310	610	784	6.0
Modified hydroponics	300	163	463	597	6.0

Result on the table 4 showed that: hydroponics culture reduced duration at nursery stage for 2.0 months (8.0 months at soil culture compared to 6.0 months at hydroponics). Modified hydroponics culture had reduced production cost and remained equally on production cost compared to soil culture

method. But the advantage of modified hydroponics culture is that it reduced nursery duration and production cost.

IV. CONCLUSIONS

Thin cell layer culturing method promoted shoot regeneration abilities.

Optimum medium for culturing thin cell layer: MS medium containing 0.06ppm 2.4-D and 0.05 ppm kinetin.

Process of initial material creating will be shortened through Thin cell layer method.

Apical dominance breaking single shoot is the most effective method in multiplication duration.

Hydroponics culture increased plant growth, quality and reduced nursery duration stage.

Modified hydroponics culture method achieved the same result as hydroponics culture while production costs have only been equal to producing seedling by soil culture method at nursery stage.

References:

1. Nguyễn Khắc Thái Sơn, Nguyễn Quang Thạch. ứng dụng kỹ thuật thủy canh vào giai đoạn vườn ươm của chuỗi nuôi cấy mô, tạp chí khoa học công nghệ và quản lý kinh tế số 8/2000
2. Alain cousson and Kiem Tran Thanh Van, 1983. Light and sugar mediated control of direct de novo flower differentiation from tobacco thin cell layer. *Plant physiol* 72, 33-36
3. Bui Van Le, Do My Nghien Thao, C. Gendy, J. Vidal and Tran Thanh Van, 1997. Somatic embryogenesis on thin cell layer of C4 species, *Digitaria sanguinalis* (L) scop. *Plant cell, tissue and organ culture* 49, 201 - 208

THIẾT LẬP HỆ THỐNG LÊN MEN LIÊN TỤC AXIT LACTIC SỬ DỤNG TẾ BÀO TUẦN HOÀN CÓ KIỂM SOÁT MẬT ĐỘ TẾ BÀO

VŨ HỒNG THẮNG^{1,2}, CIRILO NOLASCO-HIPOLITO², AYA AKI ISHIZAKI²

Bộ môn CN Sinh học thực phẩm, Viện CN Sinh học- CN thực phẩm, trường đại học bách khoa hà nội

Phòng thí nghiệm CN vi sinh vật, bộ môn khoa học Công nghệ thực phẩm, khoa nông nghiệp, đại học tổng hợp kyushu, nhật bản

Quá trình lên men liên tục axit sử dụng *Lactococcus lactis* IO-1 tại tốc độ pha loãng và nồng độ tế bào cao đã được nghiên cứu. Một hệ thống lên men hiệu quả đã được thiết lập bao gồm hệ thống cung cấp cơ chất phụ thuộc pH kết hợp với hệ thống lọc dòng ngang và kiểm soát mật độ tế bào bằng đục kế. Kết quả cho thấy năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị thể tích và năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị sinh khối tế bào phụ thuộc nhiều vào nồng độ tế bào và tốc độ pha loãng. ở nồng độ tế bào 4; 6 và 15 $g.l^{-1}$ và tốc độ pha loãng tương ứng 0.20, 0.50 and 1.15 h^{-1} năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị thể tích tương ứng là 8.2, 19.3, and 34.6 $g.l^{-1}.h^{-1}$. Nồng độ glucoza còn sót lại trong dịch lên men là 1.90, 0.24 and 3.80 $g.l^{-1}$. Khi tăng nồng độ tế bào thì năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị thể tích được nâng lên tương ứng. Khi hoạt động ở nồng độ tế bào cao, tốc độ pha loãng lớn có tác dụng loại bỏ ảnh hưởng ức chế của axit lactic đối với sự hoạt động của tế bào vi khuẩn nên đã tạo ra năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị thể tích cao. Năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị sinh khối tế bào đạt được cao hơn nhiều kết quả nghiên cứu về quá trình lên men liên tục axit lactic sử dụng kỹ thuật tuần hoàn tế bào. Tuy nhiên khi tăng nồng độ tế bào quá nhiều sẽ làm giảm năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị sinh khối tế bào.

1. MỞ ĐẦU

Trong vòng hơn 10 năm trở lại đây, công nghệ sản xuất axit lactic ngày càng thu hút được sự quan tâm đặc biệt. Nhu cầu về axit lactic ngày càng tăng do gần đây nó được sử dụng để sản xuất polyaxit lactic, một loại vật liệu có thể phân hủy được bằng con đường vi sinh vật [2]. Hiện nay, axit lactic được sản xuất bằng hai phương pháp chính là phương pháp tổng hợp hóa học và phương pháp lên men, trong đó phương pháp lên men sản xuất ra khoảng 90% sản lượng [3].

Cho đến nay, phương pháp lên men gián đoạn vẫn được sử dụng chủ yếu để sản xuất axit lactic, nói riêng cũng như các sản phẩm lên men khác, nói chung. Một điểm quan trọng trong lên men lactic là có sự ức chế quá trình lên men bởi chính axit lactic. Điều này làm giảm hiệu suất lên men. Để hạn chế ảnh hưởng này đồng thời nâng cao hiệu suất lên men, người ta đang cố gắng nghiên cứu sử dụng quá trình lên men liên tục. Sự cải thiện hiệu quả của quá trình lên men có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp lên men mới như sử dụng kỹ thuật cố định tế bào [8, 10], tuần hoàn tế bào [1, 6, 9]; sử dụng nguồn nguyên liệu khác nhau hoặc các chủng giống mới. Tuy nhiên một quá trình lên men liên tục có hiệu quả như ở quá trình lên men sản xuất axit glutamic vẫn chưa đạt được. Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu về quá trình lên men liên tục axit lactic sử dụng tế bào tuần hoàn có kiểm soát mật độ tế bào.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chủng giống vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy

Vi sinh vật: Chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* IO-1 (do phòng Công nghệ vi sinh vật, khoa Nông nghiệp, Đại học Kyushu, Nhật bản cung cấp) được sử dụng để lên men axit lactic. Đây là chủng lên men L-(+)- axit lactic đồng hình với hiệu suất chuyển hoá glucoza thành axit rất cao.

Môi trường giữ giống: môi trường TGC, thioglycolate (Difco Laboratories, Detroit, MI) được sử dụng để giữ chủng. Môi trường hoạt hóa chủng có chứa ($g.l^{-1}$): glucoza, 10 g; polypepton, 5 g; cao nấm men, 5 g; NaCl, 5 g. Môi trường nhân giống có chứa ($g.l^{-1}$): polypepton, 10 g; cao nấm men, 10 g; glucoza, 30g.

Nuôi cấy: Một giọt môi trường giữ giống được nhỏ vào 10 ml môi trường hoạt hóa. Môi

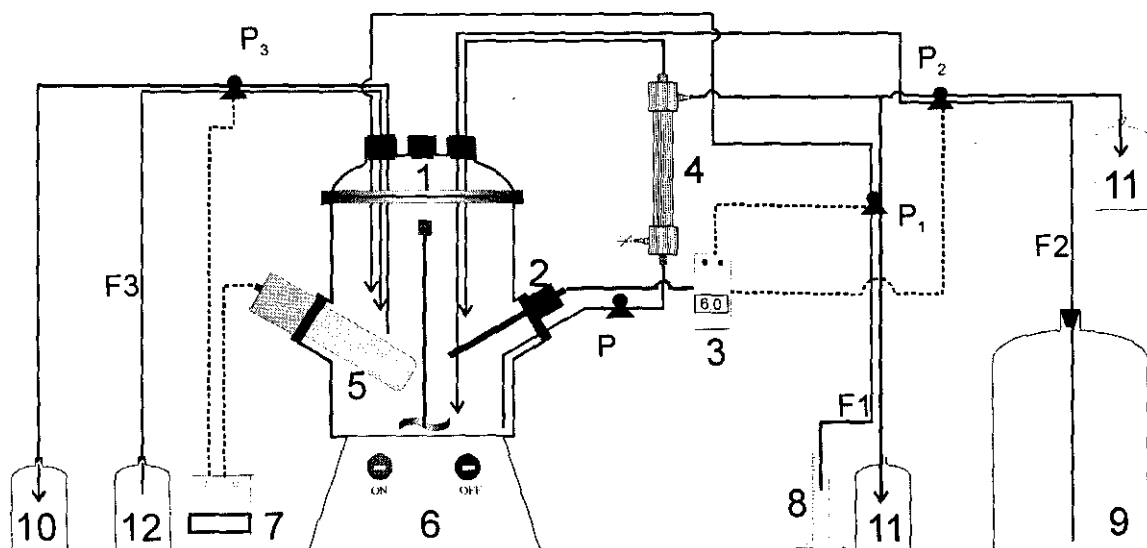
trường hoạt hóa được nuôi cấy ở 37°C trong 18 giờ. Môi trường nhân giống được chuẩn bị bằng cách trộn 40 ml môi trường đã hoạt hóa vào 360 ml môi trường lên men. Quá trình lên men được thực hiện trong bình lên men 1l có cánh khuấy ở 400 vòng/phút, ở 37°C, kiểm soát pH trong quá trình lên men bằng dung dịch NaOH 5M.

Môi trường lên men: các thí nghiệm lên men liên tục được tiến hành với nguồn cơ chất là glucoza. Nồng độ glucoza ban đầu là 30 g.l⁻¹ ứng với nồng độ polypepton và cao nấm men cùng là 10 g.l⁻¹. Sau đó nồng độ glucoza sử dụng cho quá trình lên men liên tục là từ 50 đến 64 g.l⁻¹.

Tuần hoàn tế bào: Khối lọc dòng ngang MICROZA PSP-103 (Asahi Kasei Co., Nhật bản) được sử dụng để tuần hoàn tế bào trong thiết bị lên men.

Kiểm soát nồng độ tế bào: Một đục kế (turbidostat) với đầu dò laze (LA-300LT, Automatic System Research Co., Nhật bản) được đặt trực tiếp trong thiết bị lên men để đo trực tiếp độ đục. Đục kế được dùng để kiểm soát mật độ tế bào tại một giá trị đặt trước thông qua việc xác định mối quan hệ giữa độ đục của dịch lên men và nồng độ tế bào.

Hệ thống lên men: Thí nghiệm lên men được thực hiện trong bình lên men thể tích 1lit, thể tích làm việc là 400 ml, nhiệt độ lên men 37°C và sử dụng cánh khuấy tốc độ 400 vòng/phút. Quá trình lên men được duy trì ở pH = 6.0 bằng cách sử dụng dung dịch NaOH 10M để trung hòa axit sinh ra. Sơ đồ lên men liên tục được trình bày ở hình 1. Đầu tiên quá trình lên men được tiến hành ở chế độ lên men gián đoạn tại pH = 6.0. Khi nồng độ glucoza trong môi trường giảm xuống còn khoảng 2÷4 g.l⁻¹ thì bắt đầu chuyển sang chế độ lên men liên tục. Trong suốt quá trình lên men liên tục, tế bào vi khuẩn được tuần hoàn trong thiết bị lên men đồng thời glucoza được tiếp liên tục vào bình lên men nhờ hệ thống cấp dịch cơ chất phụ thuộc pH môi trường [4]: hệ thống gồm 2 dòng độc lập là dung dịch NaOH 10M và dung dịch glucoza được nối qua 1 bơm mà sự hoạt động của nó phụ thuộc pH môi trường lên men được đặt trước. Khi vi sinh vật sinh ra axit lactic, pH môi trường giảm xuống dưới giá trị pH = 6.0 đã đặt trước và bơm bắt đầu hoạt động để bơm dung dịch kiềm vào để trung hòa axit lactic sinh ra nhằm duy trì pH = 6.0 của môi trường. Khi kiềm được bơm vào, pH môi trường lại tăng lên và bơm lại hoạt động nhưng để bơm dịch glucoza vào. Vì trong môi trường có mật glucoza nên quá trình lên men vẫn tiếp tục và pH môi trường lại giảm xuống và quá trình bơm tiếp tục hoạt động để bơm dung dịch kiềm vào lại



Hình 1. Sơ đồ hệ thống lên men liên tục axit lactic sử dụng tế bào tuần hoàn kết hợp hệ thống kiểm soát mật độ tế bào nhờ đục kế.

được lập lại. Mật độ tế bào được kiểm soát nhờ đục kế. Tại giá trị mật độ tế bào đặt trước, hệ thống kiểm soát mật độ tế bào bắt đầu hoạt động: hệ thống gồm bơm được nối với 2 dòng độc lập

là dòng cung cấp nguồn nitơ (polypepton, cao nấm men) và dòng rút dịch lên men có chứa tế bào vi sinh vật ra ngoài. Mỗi một dòng đi vào thiết bị lên men được cân bằng với một dòng đi ra từ thiết bị lên men như sự thể hiện ở hình 1.

1. Bình lên men; 2. Điện cực pH; 3. Thiết bị kiểm soát pH; 4. Khối lọc dòng ngang; 5. Đầu dò laze của đục kế; 6. Máy khuấy từ; 7. Thiết bị kiểm soát độ đục; 8. Dung dịch NaOH; 9. Dung dịch glucoza; 10. Dịch lên men có chứa tế bào vi khuẩn; 11. Dịch lên men không chứa tế bào vi khuẩn (axit lactic thô); 12. Dung dịch chứa nguồn dinh dưỡng nitơ; F_1 , F_2 và F_3 là các dòng pha loãng; P_1 , P_2 và P_3 : các bơm.

Do đó, tốc độ pha loãng D_t của toàn bộ hệ thống lên men được tính toán như sau:

$$D_t = \frac{(F_1 + F_2 + F_3)}{V} \quad \text{hay } D_t = D_1 + D_2 + D_3$$

Trong đó:

- F_1 là vận tốc dòng dung dịch NaOH bơm vào bình lên men, ml/phút (F_1 được cân bằng nhờ dòng rút ra ngoài của môi trường lên men không có tế bào vi khuẩn, thông qua bơm 1).
- F_2 là vận tốc dòng cung cấp cơ chất (dịch glucoza) cho bình lên men, ml/phút (được cân bằng nhờ dòng rút ra ngoài của môi trường lên men không có tế bào vi khuẩn, thông qua bơm 2).
- F_3 là vận tốc dòng cung cấp nguồn dinh dưỡng nitơ, ml/phút (được cân bằng với dòng rút ra ngoài của môi trường lên men có chứa tế bào vi khuẩn).
- V là thể tích làm việc của bình lên men, ml.
- D_1 , D_2 , D_3 là tốc độ pha loãng hệ thống lên men bởi dung dịch kiềm, dịch cung cấp cơ chất và dịch cung cấp nguồn dinh dưỡng nitơ, h^{-1} .
- D_t là tốc độ pha loãng của toàn bộ hệ thống lên men, h^{-1} .

2.2 Phương pháp phân tích: Mật độ tế bào được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD_{562nm}) nhờ máy so màu (UVIDEC-320, Japan Spectroscopic Co., Nhật bản). Quan hệ giữa độ đục của môi trường lên men và nồng độ tế bào được xác định qua đường chuẩn. Hàm lượng glucoza, axit lactic được xác định bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC, LC-10AD, RID-6A Refractive Index Detector, Shimadzu, Nhật bản) sử dụng cột Aminex HPX-87H (Biorad, Mỹ) tại 500C và tốc độ pha động là 0.400 ml/ph sử dụng pha động là dung dịch H_2SO_4 5 mM.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tác động của việc sử dụng hệ thống kiểm soát độ đục môi trường lên men đến quá trình lên men

Một số công trình nghiên cứu đã chứng minh rằng bằng cách tăng nồng độ tế bào vi sinh vật có thể tăng được năng suất tạo axit lactic [1, 6, 8÷10]. Chúng tôi đồng ý với nhận định trên. Tuy nhiên trong các công trình đã công bố, các tác giả không thiết lập được sự kiểm soát đối với nồng độ tế bào. Điều này làm cho vi sinh vật tiếp tục phát triển cho đến khi đạt đến trạng thái cân bằng. Quá trình phát triển này phụ thuộc vào tốc độ pha loãng được sử dụng mà tốc độ pha loãng này lại được sử dụng như là một yếu tố xác định sự giới hạn về khả năng cung cấp dinh dưỡng cho hệ thống và do đó, quá trình phát triển của vi sinh vật bị hạn chế. Điều này dẫn đến hiện tượng số lượng tế bào có khả năng hoạt động bị giảm xuống, đồng thời số lượng tế bào chết hoặc mất khả năng hoạt động sẽ tăng lên khi quá trình lên men kéo dài [5]. Do đó, sử dụng hệ thống kiểm soát độ đục có thể duy trì một lượng tế bào hoạt động ở mức ổn định trong suốt quá trình lên men. Sự điều khiển này sẽ loại bỏ số tế bào thừa được tạo thành trong khi vẫn luôn duy

trì được sự phát triển liên tục của tế bào tại một giá trị nồng độ tế bào xác định trước. Bằng việc tăng tốc độ pha loãng, vi khuẩn lactic sẽ phát triển nhanh hơn nên để kiểm soát nồng độ tế bào tại một giá trị xác định trước ta cần phải tăng tốc độ cung cấp dịch chứa nguồn dinh dưỡng nitơ. Bảng 1 trình bày kết quả về sự liên hệ giữa tốc độ cung cấp dịch chứa nguồn dinh dưỡng nitơ khi nồng độ tế bào cũng như tốc độ pha loãng tăng lên.

Bảng 1. Tốc độ cấp dịch chứa nguồn dinh dưỡng nitơ trong quá trình lên men liên tục axit lactic sử dụng *Lactococcus lactis* IO-1

Thông số	Tốc độ pha loãng		
Tốc độ pha loãng D_3, h^{-1}	0.2	0.5	1.15
Nồng độ tế bào, $g.l^{-1}$	4.6	6.0	15.3
Tốc độ dòng cấp dịch chứa nguồn dinh dưỡng nitơ $F_3, ml/h$	16	44	100
Hệ số sinh trưởng riêng μ, h^{-1} ($\mu = D_3 = F_3/V$)	0.04	0.11	0.25

Từ kết quả trên có thể nhận thấy, khi nồng độ tế bào trong môi trường càng cao thì tốc độ cung cấp dịch chứa nguồn dinh dưỡng nitơ phải tăng lên. Khi dịch chứa nguồn dinh dưỡng nitơ được bơm vào bình lên men thì đồng thời môi trường lên men cùng một lượng tế bào vi khuẩn sẽ được rút ra ngoài nhờ nguyên tắc hoạt động của hệ thống kiểm soát độ đục. Do nguyên tắc hoạt động như vậy nên có thể nhận thấy rằng tốc độ dòng cấp dịch chứa nguồn dinh dưỡng nitơ có thể được sử dụng để tính toán hệ số sinh trưởng riêng (μ) và do đó có thể đánh giá được lượng glucoza dùng để tạo sinh khối tế bào trong quá trình lên men.

Quá trình lên men liên tục tại nồng độ tế bào 15 $g.l^{-1}$ ở các tốc độ pha loãng khác nhau

Hình 2 biểu diễn động thái quá trình lên men liên tục tại các tốc độ pha loãng khác nhau. Đầu tiên quá trình lên men được thực hiện ở chế độ lên men gián đoạn trong khoảng 8 giờ nhằm tạo đủ lượng sinh khối tế bào. Sau đó, hệ thống tuần hoàn tế bào bắt đầu hoạt động. Trong cùng thời gian đục kế với đầu dò laze cũng hoạt động. Sau khi nồng độ tế bào đạt giá trị định trước (15 $g.l^{-1}$), quá trình lên men liên tục bắt đầu. Nồng độ glucoza ban đầu trong dịch cung cấp cơ chất là 53 $g.l^{-1}$.

Từ đồ thị ta thấy nồng độ tế bào được duy trì ở mức 15 $g.l^{-1}$ trong suốt quá trình lên men. Nồng độ lactat trong môi trường giảm xuống khi độ pha loãng tăng. ở tốc độ pha loãng 0,35 h^{-1} nồng độ lactat trong môi trường là 42,4 $g.l^{-1}$ và dư lượng glucoza là 0,9 $g.l^{-1}$ và khi tăng tốc độ pha loãng lên 0,5 h^{-1} thì nồng độ lactat trong môi trường là 37 $g.l^{-1}$ và dư lượng glucoza là 5,8 $g.l^{-1}$. Từ đó có thể nhận thấy rằng khả năng bị ức chế bởi axit lactic đối với vi khuẩn lactic sẽ giảm đi khi tăng tốc độ pha loãng. Tuy nhiên giai đoạn tạo sinh khối để đạt được giá trị nồng độ tế bào định trước diễn ra khá dài, điều này không có lợi cho quá trình lên men liên tục. Vấn đề này cần phải được giải quyết để rút ngắn thời gian tạo sinh khối cũng như kéo dài được quá trình lên men liên tục.

Bảng 2 thể hiện các thông số động học của quá trình lên men liên tục tại các nồng độ tế bào và tốc độ pha loãng khác nhau. Tại tốc độ pha loãng thấp, quá trình lên men được thực hiện với nồng độ tế bào thấp tương ứng để tránh tạo ra sự ức chế phát triển của tế bào. Khi tốc độ pha loãng tăng lên, nồng độ tế bào cũng có thể được tăng tương ứng vì khi đó sự ức chế này có thể được loại bỏ nhờ tác động của tốc độ pha loãng cao. Tại tốc độ pha loãng $0,2 h^{-1}$ với nồng độ tế bào $4,6 g.l^{-1}$ và tốc độ pha loãng $0,5 h^{-1}$ với nồng độ tế bào $6,0 g.l^{-1}$, nồng độ lactat trong môi trường được duy trì ở mức tương đương, (39,2 so với 38,6 $g.l^{-1}$). Năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị thể tích tăng từ 8,2 lên 19,3 $g.l^{-1}.h^{-1}$. Tại các tốc độ pha loãng khác nhau, dư lượng glucoza trong dịch axit lactic thô được duy trì ở mức thấp, cho dù ở tốc độ pha loãng $1.15 h^{-1}$ dư lượng này đã tăng lên đôi chút (3,8 $g.l^{-1}$) so với ở tốc độ 0,2 và $0,5 h^{-1}$. Cũng tại tốc độ pha loãng $1.15 h^{-1}$, nồng độ lactat trong dịch lên men giảm đáng kể, xuống còn 30 $g.l^{-1}$ đồng thời năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị sinh khối tế bào giảm nhẹ, xuống còn 2,3 $g.g^{-1}.h^{-1}$.

Như vậy có thể thấy rằng, khi tốc độ pha loãng tăng lên thì axit lactic sinh ra sẽ được chuyển ra ngoài nhanh hơn, do đó làm giảm khả năng ức chế sự hoạt động của tế bào. Tuy nhiên việc duy trì quá trình lên men ở nồng độ tế bào cao sẽ làm giảm năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị sinh khối tế bào. Cũng dễ dàng nhận thấy rằng khi tốc độ pha loãng tăng lên thì lượng glucoza dùng để tạo sinh khối cũng tăng lên. Điều này có thể được giải thích là do khi tốc độ pha loãng tăng thì nguồn dinh dưỡng nitơ được cung cấp cho tế bào cũng tăng lên kéo theo lượng glucoza dùng để tạo sinh khối cũng tăng theo. Như vậy, khi hoạt động ở tốc độ pha loãng lớn thì có tác dụng nhanh chóng loại bỏ sự ức chế của axit tạo ra đến sự phát triển của tế bào nhưng đồng thời cũng làm cho các tế bào sinh trưởng mạnh mẽ hơn. Sự tác động đồng thời của 2 yếu tố này làm cho số lượng tế bào không những được duy trì ở mức ổn định mà còn luôn tạo ra một lượng tế bào mới có khả năng hoạt động mạnh nên quá trình lên men được duy trì ổn định trong thời gian dài. Đồng thời với tác động này là dư lượng glucoza trong dịch lên men cũng tăng lên.

Bảng 2. ảnh hưởng của nồng độ tế bào và tốc độ pha loãng đến quá trình lên men.

Thông số	Đơn vị	Tốc độ pha loãng		
		0,2	0,5	1,15
Tốc độ pha loãng (D)	h^{-1}	0,2	0,5	1,15
Nồng độ tế bào (X)	$g.l^{-1}$	4,6	6,0	15,3
Dư lượng glucoza (S)	$g.l^{-1}$	1,9	0,3	3,8
Nồng độ lactat trong dịch lên men (P)	$g.l^{-1}$	39,2	38,6	30,1
Năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị thể tích (D,P/V)	$g.l^{-1}.h^{-1}$	8,2	19,3	34,6
Năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị sinh khối tế bào (D,P/X)	$g.g^{-1}.h^{-1}$	1,8	3,2	2,3
Lượng glucoza tiêu thụ (D ₂ S ₀ -D ₂ S)	$g.l^{-1}.h^{-1}$	8,7	20,6	38,0
Glucoza tạo sinh khối (D ₂ S ₁ -D ₂ S)-(D,P)	$g.l^{-1}.h^{-1}$	0,5	1,3	3,4
Hiệu suất lên men (Y_{ph})	%	94,5	93,7	91,0

Mặt khác, khi so sánh kết quả đạt được ở nồng độ tế bào $15 g.l^{-1}$, có thể thấy rằng dù cho nồng độ tế bào tăng rất nhiều ($15 g.l^{-1}$ so với $6 g.l^{-1}$) nhưng nồng độ axit lactic trong môi trường lên men không khác nhau nhiều (38,6 $g.l^{-1}$ so với 37 $g.l^{-1}$) trong khi năng suất tạo lactat trên 1

đơn vị sinh khối tế bào lại giảm đáng kể ($3,2 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ so với $1,2 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Như vậy có thể thấy rằng hệ thống lên men này có thể hoạt động hiệu quả ở một nồng độ tế bào không cao hơn nhiều so với lên men gián đoạn mà vẫn cải thiện đáng kể năng suất lên men và đặc biệt là năng suất tạo lactat trên 1 đơn vị sinh khối tế bào đạt được cao hơn nhiều nghiên cứu về quá trình lên men liên tục axit lactic sử dụng kỹ thuật tuần hoàn tế bào [9].

Summary

ESTABLISHMENT OF CONTINUOUS L-LACTIC ACID PRODUCTION BY LACTOCOCCUS LACTIC 10-1 AT HIGH DILUTION RATE AND HIGH CELL DENSITY.

Continuous L-lactic acid production by *Lactococcus lactis* IO-1 at high dilution rate and high cell density was investigated. An efficient bioreactor which consisted in a pH-dependent substrate feed system coupled with cross flow filtration and Turbidostat control culture system was developed. L-lactic acid production and productivity were dependent upon cell density, dilution rate. At a cell concentration of 4, 6 and 15 g.l^{-1} and a feed glucose concentration of 53 g.l^{-1} , volumetric L-lactic acid productivity of 8.2, 19.3, and $34.6 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ were obtained at dilution rates of 0.20, 0.50 and 1.15 h^{-1} respectively. The respective residual glucose concentrations in the spent medium were 1.90, 0.24 and 3.80 g.l^{-1} . By increasing cell density, volumetric productivity increased proportionally. At high cell density culture, higher dilution rate contributed to avoid higher lactate concentration in the culture system resulting higher productivity. Specific lactate productivity obtained were higher than that reported in many previous works. However, increasing too much cell concentration may cause a low value of specific lactate productivity.

Tài liệu tham khảo

1. **Bibal, B., Vayssier, Y., Goma, G., and Pareilleux, A.:** High concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell recycle reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 746-754 (1991).
2. **Datta, R., Tsai, S. P., Bonsignore, P., Moon, S. H., and Frank, J. H.:** Technology and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.*, **16**, 221-231 (1995).
3. **Hofvendahl, K. and Hahn-Hogerdal, B.:** Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enz. Microbiol. Technol.*, **26**, 87-107 (2000).
4. **Ishizaki, A. and Vonkaveesuk, P.:** Optimisation of substrate feed for continuous production of lactic acid by *Lactococcus lactis* 10-1. *Biotechnol. Let.*, **18**, 1113-1118 (1996).
5. **Ishizaki, A., Ohta, T., and Kobayashi, G.:** Batch culture growth model for lactate fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 123-130 (1989). **Mehaia, M. A. and Cheryan. M.:** Immobilization of *Lactobacillus bulgaricus* in a hollow-fiber bioreactor for production of lactic acid from acid whey permeate. *App. Biochem. Biotechnol.*, **14**, 21-27 (1987).
6. **Ohleyer, E., Blanch, H. W., and Wilke, C. R.:** Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**, 317-332 (1985).
7. **Ohleyer, E., Wilke, C. R., and Blanch, H. W.:** Continuous production of lactic acid

- from glucose and lactose in a cell recycle reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11, 457-463 (1985).
8. **Senthuran, A., Senthuran, V., Mattiasson, B., and Kaul, R.:** Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 841-853 (1997).
 9. **Xavier, A. M. R. B., Gonçães, L. M. D., Moreira, J. C., and Carrondo, M. J. T.:** Operational patterns affecting lactic acid production in ultrafiltration cell recycle reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 320-327 (1995).
 10. **Zayed, G. and Winter, J.:** Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 362-366 (1995).

CHỌN CHỦNG NẤM MEN PHÙ HỢP ĐỂ SẢN XUẤT NƯỚC GIẢI KHÁT CÓ ĐỘ CỒN THẤP TỪ TRÁI CÂY

NGUYỄN QUANG THẢO

Trường ĐHSP Hà Nội

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nước giải khát là loại đồ uống đã được con người biết và sử dụng cách đây hàng thế kỷ, đến nay đã trở thành ngành sản xuất lớn với quy mô hàng chục tỷ lít/năm, mang lại lợi nhuận rất lớn cho nhiều hãng và tập đoàn sản xuất [7]. Việc khám phá ra bí mật của nhiều loại trái cây có chứa các chất dinh dưỡng như: các loại axit, đường, muối khoáng, vitamin... đã mở ra hướng đi mới cho ngành sản xuất nước giải khát dinh dưỡng từ nước trái cây (bao gồm nước giải khát không có cồn và nước giải khát có độ cồn thấp) nhanh chóng được thị trường chấp nhận [5],[6] vì theo các nhà Sinh lý học và Y học thì đây là nguồn cung cấp năng lượng nhanh và có hiệu quả nhất đối với cơ thể con người [2],[6].

Việt Nam có nguồn nguyên liệu hết sức phong phú [2], là một trong những điều kiện thuận lợi để phát triển mặt hàng nước giải khát có độ cồn thấp từ trái cây. Việc nghiên cứu sản xuất mặt hàng này đang được thực hiện tại một số cơ sở chuyên ngành và bước đầu đã thu được một số kết quả nhất định. Tuy nhiên một trong những khó khăn nhất hiện nay là làm thế nào để có được chủng nấm men phù hợp với quy trình công nghệ và chất lượng sản phẩm? Trong phạm vi bài viết, chúng tôi chỉ xin đề cập đến việc chọn chủng nấm men phù hợp để sản xuất nước giải khát có độ cồn thấp từ trái cây vì đây được coi là một trong những khâu quyết định của công nghệ và chất lượng sản phẩm.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu chính

- Dịch các loại quả: nho (Ninh Thuận), dứa (Phú Thọ), vải thiều (Bắc Giang), dâu (Hưng Yên), được bổ sung thêm đường (gọi tắt là: siro quả) bằng cách: thêm dịch đường đặc ở 100 °C vào dịch quả, cho đến khi hàm lượng đường của siro quả đạt 500-520 g/l và giữ nhiệt độ 60 - 65 °C trong 30 phút sau đó hạ nhanh nhiệt độ xuống 20 - 25 °C.

- Đường trắng sacaro (Công ty Đường Lam Sơn)

- Chủng nấm men: *S. cerevisiae* var (C.H. Pháp), *S. carlbergensis* (Viện nghiên cứu Rượu - Bia- Nước giải khát), chủng T2 (do chúng tôi phân lập được từ dịch vải thiều),

2.2 Phương pháp nghiên cứu:

- Xác định hàm lượng đường bằng phương pháp Bertrand [1]

- Xác định hàm lượng cồn bằng phương pháp gián tiếp dùng bình tỷ trọng [4] và xác định nhanh trên máy Density-DA-300.

- Xác định axit tổng số (theo axit tartaric) bằng KOH 0,1N với chỉ thị màu là Phenophtalein [4]

- Xác định axit bay hơi (theo axit axetic) bằng phương pháp gián tiếp [1]

- Xác định độ trong qua mật độ quang OD (Optical density) trên máy BECKMAN ở bước sóng 600 nm (đối với mẫu có màu vàng rơm) và 700 nm (đối với mẫu có màu đỏ nhạt).

- Đánh giá cảm quan theo thang điểm 20 [3]

III. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Tiêu chuẩn chọn nấm men

Nấm men sử dụng để lên men nước giải khát có độ cồn thấp từ trái cây phải đạt các yêu cầu cơ bản sau:

- Có khả năng lên men dịch trái cây ở nhiệt độ thấp
- Có thể tạo được độ cồn không quá 5%V
- Có khả năng kết lắng nhanh sau khi kết thúc lên men
- Tạo được hương thơm đặc trưng của nguyên liệu và sản phẩm lên men
- Ổn định lâu dài trong sản xuất

3.2. Chọn chủng nấm men

Qua nhiều khâu tuyển chọn từ bộ sưu tập nấm men của các đơn vị chuyên ngành thuộc: Trường ĐHBK Hà Nội, ĐHSP Hà Nội, ĐHKHTN, Viện Công nghiệp Thực phẩm, Viện nghiên cứu Rượu-Bia-Nước giải khát... với các chủng lên men vang, bia, chúng tôi đã chọn được 3 chủng nấm men có khả năng đáp ứng được các yêu cầu tuyển chọn cơ bản đã nêu trên. Đó là các chủng: *S. cerevisiae* var (Ký hiệu là S1), *S. carlbergensis* (Ký hiệu là S2) và chủng T2.

Dịch lên men được pha chế từ siro dịch quả theo các tỷ lệ sau: (Bảng 1) và bổ sung thêm nước sạch để có hàm lượng đường tổng số bằng 170 g/lít.

Bảng 1

Thành phần siro quả của dịch lên men

Ký hiệu Mẫu	Tỷ lệ siro quả (%)			
	Nho	Dâu	Vải thiều	Dứa
D1	40	10	20	30
D2	50	0	20	30
D3	40	15	20	25
D4	40	15	30	30
D5	30	20	10	40
D6	20	0	40	40

Dịch lên men được thanh trùng ở 60 - 65°C trong 30 phút sau đó làm lạnh nhanh tới khi nhiệt độ dịch lên men đạt từ 16-18°C.

Tiến hành lên men chính ở 18 - 20°C với số lượng giống ban đầu là 12×10^6 tế bào/ml dịch lên men, pH dịch lên men: 4,5 - 4,7, nồng độ ôxy hoà tan ban đầu là 7mg/lít. Kết thúc giai đoạn lên men chính, nhiệt độ của dịch lên men được hạ xuống và giữ ở mức 2 - 4°C trong thời gian từ 25 - 30 ngày.

Kết quả phân tích sơ bộ các chỉ tiêu hoá lý, cảm quan đối với các mẫu cho thấy: Mẫu có ký hiệu là D3 và D6 được đánh giá là tốt nhất, sau đó là mẫu D4.

Theo chúng tôi điều này là phù hợp vì mẫu có ký hiệu D3 được lên men từ 40% siro dịch nho, mẫu D6 được lên men từ 40% siro dịch vải thiều - đây là những nguyên liệu vừa có giá trị dinh dưỡng cao lại vừa có hương vị rất đặc trưng [2]. Vì vậy trong các thí nghiệm tiếp theo,

chúng tôi tập trung nghiên cứu để sản xuất nước giải khát có độ cồn thấp từ dịch lên men có ký hiệu là D3 (gồm dịch trái nho, dâu, dứa, vải thiều) và D6 (gồm dịch trái vải thiều, nho, dứa).

Tiếp tục tiến hành các thí nghiệm lên men với các chủng S1, S2 và T2 trên môi trường D3 và D6 ở các điều kiện đã xác lập như trên chúng tôi thu được kết quả (Bảng 2 và Bảng 3)

Bảng 2

Kết quả lên men của một số chủng nấm men trên môi trường D3.

Chỉ tiêu phân tích	Đ.vị	Chủng nấm men		
		<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>T2</i>
Hàm lượng cồn	%V	4,5 ± 0,2	4,0 ± 0,2	4,1 ± 0,2
Hàm lượng đường sót	g/l	89,8 ± 0,3	93,4 ± 0,3	94,4 ± 0,4
Hàm lượng axit tổng số	g/l	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Hàm lượng axit bay hơi	g/l	0,32 ± 0,04	0,26 ± 0,04	0,24 ± 0,05
Độ trong (sau 30 ngày)	OD (700nm)	0,147 ± 0,012	0,151 ± 0,014	0,162 ± 0,012
Màu sắc		Đỏ nhạt	Đỏ nhạt	Đỏ nhạt
Hương, vị		Thơm, đặc trưng	Thơm, không đặc trưng	Thơm
Cảm quan chung	20 điểm	15,3 ± 0,3	11,8 ± 0,2	14,5 ± 0,3

Bảng 3.

Kết quả lên men của một số chủng nấm men trên môi trường D6

Chỉ tiêu phân tích	Đ.vị	Chủng nấm men		
		<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>T2</i>
Hàm lượng cồn	%V	4,3 ± 0,1	3,8 ± 0,2	4,2 ± 0,2
Hàm lượng đường sót	g/l	92,7 ± 0,3	94,2 ± 0,4	88,2 ± 0,3
Hàm lượng axit tổng số	g/l	3,3 ± 0,1	3,1 ± 0,2	3,0 ± 0,2
Hàm lượng axit bay hơi	g/l	0,32 ± 0,06	0,24 ± 0,05	0,24 ± 0,04
Độ trong (sau 30 ngày)	OD (600nm)	0,154 ± 0,013	0,161 ± 0,012	0,149 ± 0,013
Màu sắc		Vàng rơm nhạt	Vàng rơm nhạt	Vàng rơm nhạt
Hương, vị		Thơm	Thơm, không đặc trưng	Thơm, đặc trưng
Cảm quan chung	20 điểm	14,2 ± 0,3	12,7 ± 0,4	15,4 ± 0,3

Kết quả trên cho thấy: chủng *S1* (*S. cerevisiae* var) có khả năng lên men tốt trên môi trường D3, tạo được hương, vị đặc trưng và đạt điểm cảm quan cao hơn 2 chủng còn lại. Theo chúng tôi *S1* là chủng nấm men đã được tuyển chọn để lên men vang từ trái nho vì vậy khi lên men trên môi trường D3 (có 40% siro dịch nho) đã tạo được hương vị tốt hơn 2 chủng còn lại. Do đó sử dụng chủng *S1* để lên men nước giải khát có độ cồn thấp từ môi trường D3 là phù hợp hơn.

Khi lên men trên môi trường D6 cả 3 chủng đều có khả năng lên men tốt, nhưng chủng T2 tạo được hương vị đặc trưng và đạt số điểm cảm quan cao nhất ($15,4 \pm 0,3$). Điều này là phù hợp vì chủng T2 được phân lập và tuyển chọn để lên men vang từ dịch vải thiều nên khi lên men trên môi trường D6 (có 40% siro dịch vải thiều) đã tạo được hương vị đặc trưng hơn so với 2 chủng còn lại.

Riêng chủng S2 (*S. carlbergensis*) mặc dù có khả năng lên men tốt trong các môi trường D3 và D6, nhưng hương vị của sản phẩm đều không đặc trưng cho sản phẩm lên men từ trái cây. Chủng S2 là chủng nấm men được dùng cho công nghệ sản xuất bia, mặc dù khi sử dụng lên men bia đã cho kết quả tốt nhưng khi sử dụng để sản xuất nước giải khát lên men từ trái cây lại không tạo được sản phẩm có chất lượng cảm quan phù hợp với yêu cầu và mục tiêu nghiên cứu.

Kết quả trên cho thấy: sử dụng chủng T2 để lên men nước giải khát có độ cồn thấp từ môi trường D6 là phù hợp và có hiệu quả hơn.

IV. KẾT LUẬN

1. Từ bộ sưu tập nấm men của một số cơ sở chuyên ngành và phân lập từ dịch vải thiều, chúng tôi đã chọn được 2 chủng nấm men phù hợp để sản xuất nước giải khát có độ cồn thấp từ trái cây đó là chủng *S. cerevisiae* var và T2.

2. Chủng *S. cerevisiae* var phù hợp để sản xuất nước giải khát có độ cồn thấp từ dịch trái: nho, dâu, dứa, vải thiều, sản phẩm có màu đỏ nhạt tự nhiên.

3. Chủng T2 phù hợp để sản xuất nước giải khát có độ cồn thấp từ dịch trái: vải thiều, nho, dứa, sản phẩm có màu vàng rom nhạt tự nhiên. Các sản phẩm đều có hương vị đặc trưng của nguyên liệu và sản phẩm lên men.

SUMMARY

THE SELECTION OF YEAST

SUITABLE TO FRUIT LOW ALCOHOL BEVERAGE MAKING

NGUYEN QUANG THAO

The studying on the selection of yeast suitable to make fruit low alcohol beverage making by fermented method is necessary and take an important role in beverage technology. We have been selected the strain of yeast *S. cerevisiae* var to produce low alcohol beverage from: grape, strawberry, pine apple, lychee and T2 to produce low alcohol beverage from: lychee, grape, pine apple.

Both were considered that suitable to the technology and product standard questions.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Đạt, Ngô Văn Tâm .1974. Phân tích lương thực thực phẩm. Bộ Lương thực Thực phẩm. (Tr. 127, 230-232, 244)
2. Vũ Công Hậu. 1993. Chế rượu vang trái cây trong gia đình. NXB Nông nghiệp (Tr.11-15)
3. Hà Duyên Tư. 1999. Kỹ thuật phân tích cảm quan. NXB Tổng cục TCĐLCL. (Tr. 325-330)
4. AOAC. 1984. Official methods of analysis. 14th (Ed). (p. 220, 227)
5. Dermot O' Donnell. 2000. Flavoured alcoholic beverages - New age or old aged? Proceeding. 26 th Convention of the insitute of Brewing - Asia Pacific Section. Australia. (p.142)
6. Ruthven. P. 1988. Whats Brewing in the Asia Pasific: 1988 and into the third Millennium. Proceedings. 25 th Convention of the Institute of Brewing - Asia Pacific Section. 22 - 27 March. Australia. (p. 4-8).
7. World news. 2000. Brewing and Beverage industry International. N^o 1.

NGHIÊN CỨU TÁCH DÒNG GEN CRY IV TỪ CHỦNG PHÂN LẬP *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENIS* P₁

VÕ THỊ THỨ, NGUYỄN THỊ HOA, VŨ THỊ BÍCH HƯƠNG

Viện công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG.

Bệnh sốt rét, sốt xuất huyết, viêm não nhật bản xuất hiện ở hầu hết các tỉnh thành ở nước ta làm ảnh hưởng đến tình hình kinh tế, xã hội. Việc phòng chống và thanh toán dứt điểm các bệnh trên là một trong những nhiệm vụ trọng tâm của nước ta hiện nay. Tuy vậy, thực tế cho thấy bệnh sốt rét, sốt xuất huyết không những không bị dập tắt mà còn có nguy cơ lây lan ra diện rộng. Thực tế đòi hỏi phải có biện pháp tích cực để kiểm soát các vector truyền bệnh một cách an toàn và hiệu quả mới có thể khống chế được các bệnh do muỗi truyền.

Một trong những biện pháp an toàn và hiệu quả được tổ chức Y tế Thế giới (W.H.O.) khuyến khích sử dụng để phòng và chống các bệnh sốt xuất huyết, sốt rét là sử dụng chế phẩm sinh học sản xuất từ loài phụ *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti).

Để có thể đưa ra chế phẩm sinh học diệt muỗi hiệu quả, hai hướng nghiên cứu luôn được tiến hành song song đó là: nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm, trong đó việc phân lập và tuyển chọn chủng có hoạt lực cao đóng vai trò quan trọng. Mặt khác, việc nghiên cứu nhằm tạo ra chủng tái tổ hợp diệt muỗi sử dụng thuận lợi và thích hợp luôn được đặt ra.

Việc tách dòng gen mã hoá protein diệt muỗi (gen cry IV) từ chủng *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* phân lập hướng tới mục đích nhận được chủng tái tổ hợp diệt muỗi là nội dung của bài báo này.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

Vật liệu sử dụng trong thí nghiệm là chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) phân lập P₁, VN₆. Các chủng chuẩn: *Bacillus thuringiensis israelensis* 1884 nhận được từ Trung tâm Quốc tế về Bacillus diệt côn trùng, Viện Pasteur Paris; chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* ORN- 60A của Trung tâm Quốc tế về Công nghệ Gen và Công nghệ Sinh học, New Delhi, Ấn Độ.

Hoá chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: hoá chất thông dụng để phân lập, nuôi cấy và nghiên cứu đặc điểm của chủng vi khuẩn Bt (cao men, trypton, pepton, glucose, các muối khoáng, các chất nhuộm màu...). Các hoá chất dùng để chạy PCR (d-NTP, Taq - polymerase và các đoạn môi có ký hiệu Dip 2A, Dip 2B). Hoá chất sử dụng để tách chiết ADN plasmid và chạy điện di (lysozim, SDS, agarose...). Các hoá chất dùng trong biến nạp (T₄ ligase, vector PCR 2.1, IPTG, X-gal...). Các hoá chất dùng để chạy điện di protein (polyacrylamid, SDS, TEMED...).

2. Phương pháp nghiên cứu

- Phân lập *Bacillus thuringiensis* theo Travels và cs [6].

Phân loại *Bacillus thuringiensis* thành loài phụ *Bacillus thuringiensis israelensis* theo De Bajac [2] kết hợp với Whiteley [5] và Frachon [8].

- Tách dòng gen cryIV (nay được gọi gen cry 4 [4]) từ chủng Bti bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR với cặp môi Dip 2A (5' GGT GCT TCC TAT TCT TTG GC 3'), Dip 2B (5' TGA CCA GGT CCC TTG ATT AC 3') vào PCR vector 2.1. Sau đó biến nạp vào *E. coli* chủng DH₅α.

Chọn các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường thích hợp có bổ sung IPTG và X-gal. Kiểm tra thể biến nạp bằng cách cắt với enzym giới hạn.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập và phân loại *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Chủng *Bacillus thuringiensis* P₁ phân lập được từ mẫu đất ở Đông Anh, Hà Nội với các đặc điểm Gram ⁺, tế bào hình que, xuất hiện đơn, chuỗi, bào tử hình oval, không phình. Trong quá trình hình thành bào tử tổng hợp protein tinh thể hình cầu.

Phân loại *Bacillus thuringiensis* thành loài phụ được sử dụng khá phổ biến hiện nay là định typ huyết thanh. Các chủng Bt có cùng một typ huyết thanh được xếp vào cùng một loài phụ. Loài phụ *Bacillus thuringiensis israelensis* thuộc typ huyết thanh H₁₄ và có hoạt lực diệt côn trùng hai cánh (*Diptera*).

Chủng Bt P₁ đã được định typ huyết thanh. Kết quả cho thấy chủng thuộc typ huyết thanh H₁₄ giống chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* VN₆ phân lập ở Việt Nam và chủng chuẩn *Bacillus thuringiensis israelensis* ORN-60A phân lập được ở Israel (bảng 1).

Cả 3 chủng đều có tinh thể hình cầu bao gồm các protein chính có trọng lượng phân tử 130, 67, 28 kDa (bảng 1).

Hoạt lực diệt muỗi *Aedes aegypti* và muỗi *Culex* của chủng Bti P₁ gần tương đương với chủng Bti VN₆ (chủng phân lập có hoạt lực cao với *Aedes aegypti* [1]) và chủng chuẩn ORN-60A (bảng 2).

Bảng 1. Kết quả định typ huyết thanh của chủng phân lập và chủng chuẩn

Ký hiệu chủng	Hình dạng tinh thể	Định typ huyết thanh*	Thành phần protein (kDa)
P ₁	Hình cầu	H ₁₄	130, 67, 28 kDa
VN ₆	Hình cầu	H ₁₄	130, 67, 28 kDa
ORN-60A	Hình cầu	H ₁₄	130, 67, 28 kDa

* Số liệu do Trung Tâm Bacillus diệt côn trùng, Viện Pasteur Paris cung cấp

Bảng 2. Kết quả thử bọ gây *Aedes aegypti* của chủng *Bacillus thuringiensis israelensis*

Ký hiệu chủng Bti	Dịch nuôi cấy (μl)	Lượng nước (ml)	Ấu trùng muỗi (con)	Tỷ lệ chết (%)
P ₁	100	100	20	85
VN ₆	100	100	20	95
ORN-60A	100	100	20	90

2. Kết quả tách dòng gen cry IV

Để có thể tách dòng một đoạn gen, đoạn gen đó cần phải được dính vào một vector tách dòng. Chúng tôi đã sử dụng vector PCR 2.1 để làm vector tách dòng gen cry IV. Vector PCR 2.1 có kích thước 3,9 kb, mang gen kháng sinh Ampicilin và Kanamycin. Vector PCR 2.1 đã được

thiết kế mở vòng sản với hai đầu dính sole, phù hợp với trình tự của sản phẩm PCR do vậy không cần phải xử lý bằng enzym cắt hạn chế trước khi tạo vector tái tổ hợp.

Trong thí nghiệm, chúng tôi đã sử dụng cặp mồi có ký hiệu Dip 2A (5' GGT GCT TCC TAT TCT TTG GC 3'), Dip 2B (5' TGA CCA GGT CCC TTG ATT AC 3') để nhân bản gen cry IV với khuôn là plasmid của chủng Bt phân lập P₁ đã được xác định có chứa gen cry IV. Với cặp mồi Dip 2A, 2B, chúng tôi nhận được sản phẩm PCR có chiều dài là 1,3 kb

Để tạo vector tái tổ hợp, chúng tôi tiến hành gắn trực tiếp 200 mg sản phẩm PCR có trọng lượng phân tử là 1,3 kb vào vector tách dòng PCR 2.1 (3,9 kb). Phản ứng gắn được xúc tác nhờ enzym T₄ ligase. Như vậy vector tái tổ hợp sẽ có độ dài 5,2 kb.

Plasmid riêng lẻ không có khả năng tự nhân bản vì vậy muốn nhận được một lượng lớn bản sao cần phải đưa plasmid vào tế bào chủ. Nhờ quá trình nhân lên của tế bào chủ mà plasmid cũng nhân theo. Loại tế bào chủ được dùng trong thí nghiệm là vi khuẩn *E.coli* chủng DH₅ α . Kết quả biến nạp dương tính sẽ xuất hiện các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường thạch LB + Ampicillin + X- gal + IPTG.

Mặc dù theo lý thuyết các khuẩn lạc màu trắng đều mang plasmid tái tổ hợp. Tuy nhiên trong quá trình gắn sản phẩm PCR với vector có thể có một số sản phẩm không đặc hiệu cũng được gắn vào vector. Để loại trừ trường hợp này cần phải sàng lọc bằng cách tách chiết lại plasmid tái tổ hợp từ tế bào *E.coli* đã biến nạp, sau đó kiểm tra bằng điện di trên gen agarose 1%.

Chú thích: cột 1: plasmid của vector PCR 2.1, cột 2: plasmid của dòng số 1, cột 3: plasmid của dòng số 3, cột 4: plasmid của dòng số 5

Theo lý thuyết về chạy điện di thì phân tử ADN nào có kích thước càng lớn thì càng di chuyển chậm, nghĩa là ảnh quan sát được sẽ có một vạch sáng cao hơn so với các phân tử ADN có kích thước nhỏ hơn. Vector tái tổ hợp ở các khuẩn lạc màu trắng ngoài phần gốc của vector PCR 2.1 (3,9 kb) ra còn gắn thêm đoạn ADN ngoại lai dài 1,3 kb nữa nên khi di chuyển sẽ chậm hơn vector PCR 2.1 (khuẩn lạc xanh). Vì vậy, thể hiện sự chênh lệch nhau về độ cao giữa hai vạch sáng trên băng điện di. Quan sát ảnh điện di trên chúng tôi nhận thấy cả 3 khuẩn lạc trắng 1, 3, 5 đều có khả năng chứa đoạn ADN ngoại lai.

Chúng tôi cũng đã cắt plasmid tái tổ hợp với enzym giới hạn EcoRI để nhận đoạn ADN ngoại lai riêng rẽ (trong trường hợp đoạn ADN ngoại lai không có vị trí cắt của enzym EcoRI).

Kết quả điện di cho thấy khi cắt mở vòng plasmid tách ra từ 3 khuẩn lạc trắng đều cho 2 băng đúng với chiều dài của vector PCR 2.1 (3,9kb) và đoạn ADN ngoại lai (1,3 kb) cần tách dòng. Qua đây có thể cho rằng đã nhận được 3 dòng chứa đoạn ADN ngoại lai 1,3 kb. Mặc dù vậy, để khẳng định một cách chắc chắn sự có mặt của đoạn ADN ngoại lai, chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR với cặp mồi Lep 2A, Lep 2B để nhân bản gen cryIV của plasmid tái tổ hợp và so sánh với chủng gốc *Bacillus thuringiensis israelensis* P₁. Kết quả điện di được trình bày ở hình 4 cho thấy đoạn ADN của tái tổ hợp được nhân lên bằng 1,3 kb (hình 4, cột 3,4,5) và đúng bằng đoạn ADN được nhân lên của chủng Bti P₁.

Qua đó thấy rằng đã nhận được tái tổ hợp chứa dòng gen cry IV (1,3 kb) từ chủng Bti phân lập P₁ ở trong nước. Gen cryIV của chủng P₁ đang được đọc trình tự để so sánh với các gen cryIV được công bố ở BGSC (Bacillus Genetic Stock Centre).

III. KẾT LUẬN

- Từ mẫu đất thu thập được ở Đông Anh, Hà Nội, đã phân lập được chủng *Bacillus thuringiensis* P₁ với đặc điểm: Gram ⁺, hình que, xuất hiện đơn, chuỗi, bào tử hình oval, không phình, tổng hợp tinh thể protein hình cầu, có hoạt lực diệt muỗi.

- Đã phân loại chủng *Bacillus thuringiensis* P₁ thành loài phụ *Bacillus thuringiensis israelensis* trên cơ sở định typ huyết thanh và xác định gen cryIV.

- Đã tách được dòng gen cry IV có độ dài 1,3 kb của chủng Bti P₁

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Thị Thứ và cs, 2000, Tách dòng và biểu hiện gen mã hoá protein diệt ấu trùng muỗi từ chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* phân lập ở Việt nam. Hội Nghị Sinh học toàn quốc, Hà Nội, 8/2000:167-171.
2. Barjac. D & Frachon. E, 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains. Entomophaga 35 (2): 233-240.

3. Carozzi N.B, Vance C.K, Gragory W. W, Stephen E, Michael G. Koziel, 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Appl. Environ. Microbiol, 57: 3057-3061.
4. Crickmore, D.R. Zeiler at all, 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol 62 : 807-813.
5. Hofte H., Whitely H.R,1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbial.Rev. June: 242 - 255.
6. Russel.S, S. Traves, 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol, 53: 1263-1266.
7. Sambrook J; Fristch F and T. Maniatis,1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd . Cold Spring Harbor Laboratory Press . Cold Spring Harbor, N.Y.
8. Thiery & E. Franchon, 1997. Identification, Isolation, Culture and preservation of Entomopathogenic Bacteria. Manual of Techniques in Insect Pathology. ISBN0-12-432555-6. Academic Press Limited : 56-57.

SUMMARY

CLONING OF CRY IV GENE FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENIS* P₁ ISOLATE

VO THI THU, NGUYEN THI HOA, VU THI BICH HUONG

Institute of Biotechnology, (N.C.S.T.)

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* P₁ strain showed high toxicity toward *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* larvae was isolated from sample collected in Dong Anh, Ha Noi, Viet Nam.

The classification characteristics of the strain according to H serotype revealed that the isolate P₁ was belong to H₁₄ serotype of *Bacillus thuringiensis israelensis*. The strain is aerobic sporeforming microorganisms, which produces proteinaceous ovoid crystalline inclusions. These inclusions are composed at least 3 polypeptides of 130, 67, 28 kDa coded by cry IV and cyt genes.

The cry IV gene of *Bacillus thuringiensis israelensis* P₁ was determined by PCR with Dip 2A (5' GGT GCT TCC TAT TCT TTG GC 3'), Dip 2B (5' TGA CCA GGT CCC TTG ATT AC 3') primers. 1,3 kb fragment of PCR product of plasmid Bti P₁ was ligated with PCR vector 2.1 (3,9 kb) and transformed into *E. coli* DH₅α. Restriction analysis with EcoRI enzyme revealed that the recombinant contained 1,3 kb insert and vector 3,9 kb. The result was also confirmed by PCR.

The nucleotide of cloned gene is undergone to sequence and compare with cry IV genes reported in BGSC (Bacillus Genetic Stock Centre).

MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG LÊN CHẤT LƯỢNG TINH DÊ ĐÔNG LẠNH VÀ KẾT QUẢ THỤ TINH NHÂN TẠO BẰNG TINH ĐÔNG LẠNH

f

ĐỖ VĂN THU, TRỊNH THỊ KIM THOA, NGUYỄN ANH

Viện công nghệ sinh học

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam có tiềm năng lớn về thiên nhiên, thích nghi cho nghề nuôi dê, con dê rất phù hợp cho phát triển kinh tế miền núi, nhưng con dê "bò sữa của nhà nghèo" chưa phổ biến, công tác giống ít được quan tâm. Để phát triển chăn nuôi dê, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đã nhập một số giống dê và tinh dê cọng rạ. Nhập tinh đông lạnh rất cần thiết cho lai tạo giống, song nếu phục vụ sản xuất đại trà thì rất tốn kém, hiệu quả kinh tế không cao. Trong khi đó ở nước ta công nghệ sản xuất tinh đông lạnh bò, lợn, ... phục vụ cho thụ tinh nhân tạo (TTNT) và lưu giữ quỹ gen đã phát triển, chúng ta đã xây dựng được ngân hàng tinh trùng tại Trung tâm tinh đông viên Moncada. Gần đây có một số công trình nghiên cứu về công nghệ sinh sản của dê nhằm nâng cao khả năng sinh sản. Tuy vậy chưa có công trình nghiên cứu về công nghệ bảo tồn tinh dịch dê ở -196°C . Để góp phần phục vụ cho TTNT và lưu giữ quỹ gen, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: "Một số yếu tố ảnh hưởng lên CHẤT lượng tinh dê đông lạnh và kết quả thụ tinh nhân tạo bằng tinh đông lạnh"

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: tinh dịch dê thuộc các giống: Barbari, Beetal, Jamnapari, Alpine, Bách thảo, dê cỏ, tuổi 2-6 năm, trọng lượng cơ thể 35-75 kg, dê khỏe mạnh, đang trong thời kỳ cho tinh phục vụ TTNT, nuôi dưỡng theo khẩu phần chăn nuôi dê của Trung tâm nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây, lấy tinh vào buổi sáng bằng âm đạo giả, khoảng cách 2 lần lấy tinh 2-3 ngày.

Phương pháp nghiên cứu: tinh dịch dê có hoạt lực tinh trùng tiến thẳng $A \geq 70\%$ được rửa bằng dung dịch rửa Krebs - ringer - phosphate - glucose (Corteel, 1974), sau khi loại bỏ tinh thanh, tinh trùng pha với môi trường đông lạnh có thành phần (glucose, Na- citrate, lòng đỏ trứng gà, glycerol, chất kháng khuẩn), tinh pha loãng cân bằng ở 5°C , nhỏ viên và đông lạnh theo phương pháp của Evans và Maxwell (1987). Hoạt lực tinh trùng tiến thẳng, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình: theo phương pháp của Milovanov (1962) và Chemineau (1991). Tinh dê đông lạnh giải đông ở 37°C với khoảng thời gian 60 giây, dùng súng bắn tinh dẫn tinh cho dê cái.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của phương pháp rửa tinh dịch lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh

Enzym phospholipase A có trong tinh thanh dê thủy phân lecithin lòng đỏ trứng thành các chất gây độc làm giảm sức sống của tinh trùng trong môi trường có lòng đỏ. Muốn hạn chế ảnh hưởng xấu của enzym này đến sức sống của tinh trùng, cần rửa tinh dịch loại bỏ tinh thanh. Kết quả ảnh hưởng của phương pháp rửa tinh dịch dê lên sức sống của tinh trùng sau giải đông ở 37°C , trình bày ở bảng 1.

Bảng 1 cho thấy: rửa tinh dịch một lần hoặc hai lần để loại bỏ tinh thanh trước khi pha loãng tinh dịch với môi trường đông lạnh (có lòng đỏ trứng gà) có tác dụng tốt lên sức sống tinh

trùng sau giải đông ủ ở 37°C so với tinh dịch không được rửa trước khi pha loãng. Cường độ rửa tinh dịch khác nhau có ảnh hưởng lên sức sống của tinh trùng sau đông lạnh. Rửa tinh dịch hai lần trước khi pha loãng với môi trường có lòng đỏ cho sức sống tinh trùng cao hơn khi rửa tinh dịch một lần ($P < 0,01$). Thời gian ủ tinh dịch càng tăng thì sức sống tinh trùng giảm càng rõ ở phương pháp không rửa tinh dịch so với rửa tinh dịch một lần hoặc rửa hai lần. Tinh dịch sau giải đông ủ ở 37°C là nhiệt độ gần với nhiệt độ tối ưu (40°C) đối với hoạt tính của enzym ngưng kết lòng đỏ, vì vậy đã sản sinh ra axit béo và lysolecithin gây độc đối với tinh trùng, cho nên hoạt lực tinh trùng giảm đáng kể sau 4 giờ ủ trong trường hợp không rửa tinh dịch trước khi pha loãng với môi trường có lòng đỏ (18,25%). Rửa tinh dịch loại bỏ tinh thanh trước khi pha loãng đã góp phần làm giảm ảnh hưởng xấu của enzym phospholipaseA đối với sức sống của tinh trùng, cho nên đã duy trì tốt sức sống tinh trùng sau đông lạnh (rửa một lần 31,25%, rửa hai lần 33,75%). Rửa tinh dịch hai lần trước khi pha với môi trường cho hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh ủ 6 giờ (30,00%) cao hơn rất rõ rệt ($P < 0,001$) so với hoạt lực tinh trùng nếu không rửa tinh dịch (6,25%) hoặc rửa tinh dịch một lần trước khi pha loãng (20,00%).

Bảng 1

Ảnh hưởng của phương pháp rửa tinh dịch lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh

Phương pháp Thời gian ủ ở 37°C	Hoạt lực tinh trùng (%)		
	Không rửa tinh dịch	Rửa tinh dịch 1 lần	Rửa tinh dịch 2 lần
0 giờ	40,00 ± 4,08	40,00 ± 2,04	41,25 ± 1,25
2 giờ	35,35 ± 4,09	37,50 ± 1,44	38,75 ± 1,25
4 giờ	18,25 ± 1,38	31,25 ± 2,39	33,75 ± 1,25
6 giờ	6,25 ± 1,25	20,00 ± 2,04	30,00 ± 2,04

Kết quả chúng tôi nhận được phù hợp với kết quả của một số tác giả (Corteel. 1974; Drobnis.1980; Ritar. 1982): hoạt lực tinh trùng sau 6 giờ ủ: không rửa 3,4%, rửa một lần 20,2%, rửa hai lần 34,5%. Phân tích kết quả nhận được chúng tôi thấy: rửa tinh dịch hai lần để loại tinh thanh trước khi pha loãng tinh dịch với môi trường đông lạnh có lòng đỏ trứng gà là yếu tố tích cực duy trì sức sống tinh trùng sau đông lạnh ủ ở 37°C.

3.2 ảnh hưởng của tỷ lệ pha tinh dịch với dung dịch rửa lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh

Sức sống tinh trùng sau đông lạnh không chỉ phụ thuộc vào số lần rửa tinh dịch, thành phần môi trường đông lạnh... mà còn chịu ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng tinh dịch với dung dịch rửa khi ly tâm loại tinh thanh. Kết quả sức sống tinh trùng sau giải đông ủ ở 37°C dưới ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng tinh dịch với dung dịch rửa, trình bày ở bảng 2.

BẢNG 2
Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng tinh dịch với dung dịch rửa lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh (pha trong môi trường có 20% lòng đỏ)

Phương pháp rửa và tỷ lệ pha loãng	Hoạt lực của tinh trùng trong thời gian ủ ở 37°C			
	0 giờ	2 giờ	4 giờ	6 giờ
Rửa tinh dịch 1 lần				
1:5 (tinh dịch : dung dịch rửa)	40,00 ± 2,04	37,00 ± 1,22	4,00 ± 0,58	0,0 ± 0,00
1:9 (tinh dịch : dung dịch rửa)	43,75 ± 2,39	42,50 ± 2,23	25,00 ± 2,04	4,50 ± 0,96
Rửa tinh dịch 2 lần				
1:5 (tinh dịch : dung dịch rửa)	44,50 ± 2,10	40,00 ± 2,04	22,50 ± 1,44	10,00 ± 2,04
1:9 (tinh dịch : dung dịch rửa)	46,25 ± 2,39	45,00 ± 2,04	39,25 ± 1,49	34,25 ± 1,49

Bảng 2 cho thấy: tỷ lệ khác nhau về pha loãng tinh dịch với dung dịch rửa đã dẫn đến sự khác nhau về áp lực thẩm thấu, năng lực đệm, pH, đặc biệt là sự khác nhau về độ nhớt và tỷ trọng của tinh pha loãng, do đó ảnh hưởng tới khả năng phân tách tinh thành khỏi tinh trùng cho nên sức sống tinh trùng sau đông lạnh phụ thuộc vào tỷ lệ pha loãng tinh dịch với dung dịch rửa. Sức sống tinh trùng khi pha loãng tinh dịch với dung dịch rửa theo tỷ lệ 1:9 cao hơn pha loãng với tỷ lệ 1:5. Trong thời gian ủ, dưới tác động gây độc của lysolecithin và axit béo đã làm giảm sức sống của tinh trùng, cho nên hoạt lực tinh trùng sau thời gian ủ ở 37°C thấp hơn rõ rệt trong trường hợp rửa tinh dịch một lần so với rửa tinh dịch hai lần. Sau 2 giờ ủ, hoạt lực tinh trùng thấp nhất (37,00%) trong trường hợp rửa tinh dịch một lần và pha loãng với tỷ lệ 1:5. Hoạt lực tinh trùng cao nhất trong trường hợp rửa tinh dịch hai lần và pha loãng với tỷ lệ 1:9 (45,00%). Hoạt lực tinh trùng thấp (4,00%) sau khi ủ 4 giờ và tinh trùng chết hoàn toàn sau khoảng thời gian ủ 6 giờ, trong trường hợp rửa tinh dịch một lần và tỷ lệ pha loãng 1:5. Hoạt lực tinh trùng trong trường hợp rửa tinh dịch hai lần và pha loãng với tỷ lệ 1:9 sau 4 giờ ủ (39,25%) cao hơn rất rõ rệt ($P < 0,001$) so với trường hợp rửa tinh dịch một lần và pha loãng với tỷ lệ 1:5; 1:9 hoặc rửa tinh dịch hai lần và pha loãng theo tỷ lệ 1:5. Tinh dịch rửa hai lần và pha loãng với tỷ lệ 1:9, sau 6 giờ ủ, tinh trùng có hoạt lực cao nhất và đủ tiêu chuẩn phối giống (34,25%). Kết quả chúng tôi nhận được phù hợp với công bố của Ritar và Salamon (1982). Với kết quả nhận được chúng tôi thấy pha loãng tinh dịch với dung dịch rửa theo tỷ lệ 1:9 và rửa tinh dịch hai lần trước khi đông lạnh, cho kết quả cao về sức sống tinh trùng sau đông lạnh.

3.3 ảnh hưởng của tỷ lệ glycerol trong môi trường lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh

Glycerol có vai trò quan trọng trong đông lạnh và bảo tồn tinh dịch đẻ ở nhiệt độ thấp (-196°C), ảnh hưởng đến hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh. kết quả trình bày ở bảng 3.

Bảng 3
Ảnh hưởng của tỷ lệ glycerol trong môi trường lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh

Giống	Hoạt lực (%) tinh trùng sau đông lạnh ứng với tỷ lệ glycerol			
	3%	5%	7%	9%
Barbari	50 ± 2,38	51 ± 2,74	57 ± 1,47	49 ± 1,63
Beetal	53 ± 3,49	57 ± 0,82	59 ± 2,48	55 ± 1,87
Bách Thảo	41 ± 1,47	54 ± 1,68	54 ± 2,86	55 ± 1,78
TB	48 ± 3,54	54 ± 2,15	57 ± 2,29	53 ± 2,17

Bảng 3 cho thấy: môi trường đông lạnh tinh dịch có tỷ lệ glycerol khác nhau, đã tạo ra số lượng hạt nhỏ ly ti glycerol không giống nhau, vì vậy số lượng hạt glycerol bám vào lỗ nhỏ trên màng tinh trùng khác nhau, do đó khả năng làm giảm sức căng bề mặt của tế bào tinh trùng khác nhau, dẫn đến hiệu quả ngăn cách nước thấm vào bên trong tinh trùng khác nhau, cho nên đã tạo ra khả năng khác nhau về bảo tồn lạnh và sự điều chỉnh áp lực thẩm thấu khác nhau giữa môi trường đông lạnh và phía trong tinh trùng. Do đó tỷ lệ glycerol có ảnh hưởng lên hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh. Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh cao nhất (57%) và cao hơn rất rõ rệt ($P < 0,001$) khi tinh dịch đông lạnh trong môi trường có 7% glycerol so với pha tinh dịch trong môi trường có 3% glycerol. Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh khác nhau không rõ ($P > 0,05$) khi đông lạnh tinh dịch trong môi trường có 5% glycerol so với 9% glycerol (54%; 53%). Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh có chiều hướng giảm khi tăng tỷ lệ glycerol trong môi trường đông lạnh từ 7% lên 9%.

Kết quả chúng tôi nhận được về ảnh hưởng của tỷ lệ glycerol trong môi trường lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh, phù hợp với công bố của một số tác giả: Chauhan (1990), Olav Lyngset (1965), Corteel (1977), Chemineau (1991). Với kết quả nhận được chúng tôi thấy môi trường có tỷ lệ glycerol 7% dùng để đông lạnh tinh dịch cho sức sống tinh trùng sau đông lạnh cao.

3.4 ảnh hưởng của thời gian cân bằng tinh dịch ở +5°C lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh

Bảng 4
Ảnh hưởng của thời gian cân bằng tinh dịch ở 5°C lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh

Tinh dịch dê	Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh ứng với thời gian cân bằng		
	1 giờ	2 giờ 35 phút	4 giờ
Barbari	35,0 ± 3,16	39,2 ± 1,50	39,6 ± 1,89
Beetal	36,2 ± 1,78	41,2 ± 1,54	41,3 ± 1,02
Alpine	37,6 ± 2,04	41,6 ± 1,03	42,0 ± 0,95
TB	36,3 ± 1,29	40,7 ± 0,80	41,0 ± 0,75

Bảng 4 cho thấy: thời gian cân bằng tinh dịch ở +5°C trước đông lạnh có ảnh hưởng lên sức sống tinh trùng sau đông lạnh. Tăng thời gian cân bằng tinh dịch trước đông lạnh từ 1 giờ lên 2 giờ 35 phút có tác dụng tăng sức sống tinh trùng sau đông lạnh. Tiếp tục tăng thời gian cân bằng tinh dịch lên 4 giờ thì sức sống tinh trùng sau đông lạnh tăng không rõ so với sức sống tinh trùng sau đông lạnh trong trường hợp cân bằng tinh dịch với khoảng thời gian 2 giờ 35 phút. Với kết quả thu được chúng tôi thấy cân bằng tinh dịch ở 5°C trước đông lạnh với khoảng thời gian 1 giờ không đủ cho tinh trùng thích nghi dần với sự hạ nhiệt độ trong quá trình đông lạnh. Cân bằng tinh dịch ở +5°C trước đông lạnh với khoảng thời gian 2 giờ 35 phút hoặc 4 giờ đáp ứng thoả mãn cho tinh trùng thích nghi dần với sự hạ nhiệt độ trong quá trình đông lạnh.

3.5. Kết quả bảo tồn tinh dịch đê ở -196°C và thụ tinh nhân tạo bằng tinh đê đông lạnh

Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%) sau đông lạnh

Tinh dịch trong quá trình đông lạnh, bảo tồn trong nitơ lỏng -196°C, và giải đông, do những biến đổi hoá lý đã gây tổn thương đối với tinh trùng. Kết quả trình bày ở bảng 5.

Bảng 5
Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau đông lạnh

Giống	Tinh nguyên	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%) sau đông lạnh				
	Acrosom	Kỳ hình	Acrosom	Cổ	Thân	Đuôi
Barbari	2.42 ± 0.21	34.06 ± 1.07	12.01 ± 1.00	1.89 ± 0.24	9.48 ± 0.67	10.80 ± 0.4
Beetal	2.37 ± 0.32	37.66 ± 2.22	11.61 ± 0.77	1.83 ± 0.18	9.80 ± 0.6	14.54 ± 1.63
Bách Thảo	2.46 ± 0.34	36.32 ± 0.96	12.11 ± 0.80	1.68 ± 0.07	9.50 ± 0.2	13.90 ± 0.1
TB	2.42 ± 0.16	35.99 ± 0.95	11.89 ± 0.47	1.81 ± 0.10	9.90 ± 0.6	12.00 ± 0.6

Bảng 5 cho thấy: tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở tinh sau đông lạnh cao hơn so với tinh nguyên. Tinh trùng sau đông lạnh có tỷ lệ kỳ hình chung là 35,99%. Tinh trùng đông lạnh và bảo tồn ở nitơ lỏng -196°C, do tác động của lạnh sâu đã làm cho chòm đầu acrosom dễ bị trương phồng, vỡ tung, thậm chí bong ra khỏi đầu tinh trùng, do đó tỷ lệ acrosom hư hỏng ở tinh trùng sau đông lạnh tăng 4,9 lần so với tinh nguyên. Tinh trùng đông lạnh dưới tác động của các lực cơ học trong quá trình ly tâm tách bỏ tinh thanh, khuấy trộn, nhỏ viên và các biến đổi về tính chất hoá lý của môi trường đông lạnh và nhiệt độ bảo tồn, đã làm tăng tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở cổ, thân và đuôi. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở cổ thấp hơn kỳ hình ở thân và đuôi. Tinh trùng đông lạnh có tỷ lệ kỳ hình ở phần đuôi cao nhất: 12,00%. Kết quả nhận được về tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh đê đông lạnh phù hợp với kết quả của Deka, 1997.

Kết quả thụ tinh nhân tạo bằng tinh đê đông lạnh

Tinh đê đông lạnh dạng viên, sau 12 - 18 tháng bảo tồn trong nitơ lỏng -196°C, tinh trùng có hoạt lực sau giải đông 40 - 50%. Tinh đông lạnh được sử dụng phối giống cho 09 đê cái sinh sản, nuôi tại Trung tâm nghiên cứu đê và thỏ Sơn Tây. Kết quả thụ tinh bằng tinh đê đông viên trình bày ở bảng 6.

Bảng 6
. Kết quả thụ tinh nhân tạo bằng tinh dê đông lạnh

Đực giống	Tinh đông lạnh			Số dê cái được phối giống	Số dê cái thụ thai	Số dê con
	Thời gian bảo tồn ở -196°C	Hoạt lực khi phối giống (A%)	Số tinh trùng tiến thẳng (triệu) / lần phối			
Beetal (55)	18 tháng	50	181,9	05	04	07
Barbari (27.92)	12 tháng	50	261,0	02	01	sảy thai
Barbari (55)	17 tháng	40	144,0	01	01	02
Bách Thảo (78)	18 tháng	45	125,4	01	01	01

Tỷ lệ thụ thai: 77,8%

Tỷ lệ đẻ: 85,7%

Số con trung bình/lứa: 1,7 con

Bảng 6 cho thấy: tinh đông lạnh, sau 12 - 18 tháng bảo tồn ở nitơ lỏng -196°C vẫn còn khả năng thụ tinh. Tỷ lệ thụ thai đạt 77,8%. Tỷ lệ đẻ của dê cái là 85,7%. Số dê con sinh ra trong một lứa là 1,7 con. Dê con sinh ra do phối bằng tinh đông lạnh phát triển bình thường. Kết quả thụ tinh nhân tạo bằng tinh dê đông lạnh, chúng tôi nhận được, tuy là kết quả bước đầu, thực hiện trên quy mô thí nghiệm với số dê cái còn ít, nhưng đã khẳng định kết quả bảo tồn tinh dịch dê đông lạnh, góp phần lưu giữ quỹ gen của các giống dê.

IV. KẾT LUẬN

Rửa tinh dịch loại tinh thanh có tác dụng duy trì sức sống tinh trùng dê sau giải đông ở 37°C tốt hơn so với không rửa tinh dịch pha với môi trường có lòng đỏ, rửa tinh dịch 2 lần tốt hơn 1 lần.

Pha loãng tinh dịch với dung dịch rửa theo tỷ lệ 1:9 cho hoạt lực tinh trùng sau giải đông cao hơn so với tỷ lệ 1:5.

Môi trường đông lạnh có glycerol 7% cho hoạt lực tinh trùng sau giải đông cao hơn so với môi trường có 3; 5; 9% glycerol.

Cân bằng tinh dịch ở 5°C trước đông lạnh với khoảng thời gian 2 giờ 35 phút hoặc 4 giờ cho hoạt lực tinh trùng sau giải đông cao hơn so với khoảng thời gian 1 giờ.

Xây dựng được công nghệ đông lạnh tinh dê. Tinh dê đông lạnh sau 12 - 18 tháng bảo quản ở nitơ lỏng -196°C đạt tỷ lệ thụ thai là 77,8%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chauhan M.S., Anand S.R., 1990. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goats semen. *Theriogenology*. 34: 5, 1003-1013, 15 ref.
2. Chemineau P. and Cagnié, Y. 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO. Animal Production and Health, paper 83 - Rome 1991.
3. Corteel J.M., 1974. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 14, 741-5.

4. Corteel J.M., 1977. Production, storage and insemination of goats semen. Proceedings of the Symposium: Management of Reproduction in Sheep and Goat, S., Jul. 24-25, Madison.
5. Deka B.C., Rao A.R., 1987. Effect of storage at -196°C on quality of goat semen frozen with and without seminal plasma in Tris-based extender. *Cheiron*. 16: 2, 65-69, 12 ref.
6. Drobnis E.Z., Nelson E.A., and Burrill M.J., 1980. Effect of several processing variables on motility and glutamicoxalacetic transaminase levels for frozen goat semen. II. Washing. *J. Anim. Sci.* 51 (Suppl. I), 439.
7. Evans G., Maxwell W.M.C., 1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Ed. 2, xi + 194 pp. Sydney, Australia, Butterworths.
8. Olav Lyngset, John Aamdal and Veiert Volle. 1965. Artificial insemination in the goat with deep frozen and liquid semen after hormonal synchronization of oestrus. *Nord. Vet - Med.* 17, 178-181.
9. Ritar A.J. and S. Salamon. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 1982, 35, 305- 12.

SUMMARY

some elements that effect the quality of frozen goat semen and the result of artificial fertility given by frozensemen

Do Van Thu et al.

Institute of Biotechnology

Washing semen in order to remove seminal plasma that results in maintaining survival of goat spermatozoa during post - thawing incubation at 37°C is better than unwashing semen diluted with diluent containing egg - yolk. Washing semen twice is better than once. Diluting semen with washing liquid at the rate 1: 9 obtains higher motile of spermatozoa during post - thawing incubation in comparison with the rate 1:5.

Freezing diluent containing 7% glycerol ensures higher motile of spermatozoa after thawing in comparison with that containing 3; 5 or 9% glycerol.

The incubation of semen at 5°C before its freeze within 2 hours and 35 minutes or 4 hours obtains the higher motile of spermatozoa after thawing in comparison with the period of time one hour.

Constructing the technology of freezing goat semen. Frozen goat semen after 12 - 18 months of maintenance at minus 196°C obtains the rate of fertility 77.8%.

NGHIÊN CỨU PROTEAZA AXIT TỪ ASPERGILLUS NIGER –92 VÀ ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT PHOMAT

ĐẶNG THỊ THU, ĐỖ THU HÀ, LÊ SỸ HỒNG LAM, LÊ NGỌC TÚ, LÂM XUÂN THANH

Viện Công nghệ sinh học & công nghệ thực phẩm

I. MỞ ĐẦU

Sữa là một loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng đặc biệt. Sữa được sử dụng ở dạng tươi hoặc sản phẩm chế biến và sản phẩm sữa lên men. Phomat là một sản phẩm protein sữa lên men có giá trị dinh dưỡng cao, chúng được sản xuất bằng cách làm đông tụ casein, gia công cơ học và ủ để chín tới. Trong sản xuất phomat, quá trình làm đông tụ casein là một trong những khâu quan trọng, người ta thường sử dụng renin làm đông tụ sữa [1. 2. 3] song do sự khan hiếm và tính không kinh tế của nguồn nguyên liệu renin, mà người ta đã nghiên cứu và sử dụng thay thế bằng proteaza từ vi sinh vật. Trong bài này chúng tôi nghiên cứu proteaza axit nhằm thay thế renin trong quá trình đông tụ sữa. Điều này có ý nghĩa thực tiễn đáng kể.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Chủng VSV *Aspergillus niger*- 92 có nguồn gốc từ Pháp, lấy từ bộ sưu tập giống của Viện CNSH-CNTP ĐHBK-HN, các chủng vi khuẩn lactic từ chế phẩm Flora danica MSP-CHR Hasnen.

- Sữa tươi có nguồn gốc từ Ba vì, được thanh trùng theo phương pháp Pasteur, bảo quản ở 4-10°C, sử dụng trong 48 tiếng.

-Các thiết bị: Hệ thống HP Amino Quant Series II phân tích axit amin, thiết bị sắc cột Pharmacia Biotech (Thụy Điển), máy đo màu quang học 752 (Trung Quốc)...

-Môi trường nuôi cấy VSV: Môi giữ giống-thạch malt.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy *A.niger*-92 bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm bậc hai.

Xác định hoạt lực proteaza bằng phương pháp Anson cải tiến (Anson. 1958, Petrova.1966)

Xác định protein hoà tan bằng phương pháp Lowry

Xác định nitor tổng số bằng phương pháp Kendan (Kjeldal)

Phân tách protein bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit-SDS (SDS-PAGE)

Phân tích axit amin tự do bằng phương pháp dẫn xuất hoá OPA và FMOC trên hệ H Amino Quant Series II.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chọn chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp proteaza axit cao và tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy bề mặt.

Từ 9 chủng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* có khả năng tổng hợp proteaza axit chúng tôi

chọn được chủng *A. niger-92* có khả năng sinh tổng hợp proteaza axit có hoạt độ cao nhất (HdP=18.0 đv/g).

Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy bề mặt *A.niger-92* để thu proteaza axit.

Chọn môi trường nuôi cấy trong điều kiện thí nghiệm là cám gạo, có thành phần(%): protein-13.30, đường-3.0, tinh bột-24.5, độ ẩm-12.0. Theo nhiều tài liệu nghiên cứu, chúng tôi chọn các yếu tố cố định là: nhiệt độ nuôi là 30°C, thời gian nuôi là 40 giờ. Các yếu tố chúng tôi để thực hiện quá trình tối ưu hoá: độ ẩm, tỉ lệ sunfat amon-(NH₄)₂SO₄ và tỉ lệ bào tử cấy truyền.

3.1.1. hoạch thực nghiệm bậc hai điều kiện nuôi cấy *A.niger-92* nhằm thu enzym có hoạt độ proteaza axit cao:

+ Chọn hàm mục tiêu và các thông số tối ưu:

Hàm mục tiêu Y: Hoạt độ proteaza axit cao nhất-HdP/g chế phẩm.

X₁-Độ ẩm,%. X₂-Tỉ lệ (NH₄)₂SO₄,%. X₃-Tỉ lệ bào tử,%

Có nghĩa Y tiến tới max với X các yếu tố ràng buộc :

X₁ (-1,682 , +1,682), X₂ (-1,682 , +1,682), X₃ (-1,682 , +1,682)

+ Các mức thí nghiệm:

Bảng 1

Các mức thí nghiệm

Mức thí nghiệm	Độ ẩm X ₁ , %	Tỉ lệ (NH ₄) ₂ SO ₄ X ₂ , %	Tỉ lệ bào tử X ₃ , %
Mức 0	55	1	0,3
Khoảng biến đổi	5	0,5	0,1
Mức -1	50	1,5	0,2
Mức +1	60	0,5	0,4
Mức -1,682	46	0,2	0,15
Mức +1,682	63	1,8	0,45

Các thí nghiệm qui hoạch thực nghiệm được bố trí và cho kết quả ở bảng sau

Bảng 2

Ma trận thực nghiệm và kết quả

Số T/ng	Các thông số kỹ thuật						HdP/g Y
	Giá trị mã			Giá trị thực			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	
1	-1	-1	-1	50	0,5	0,2	12,5
2	1	-1	-1	60	0,5	0,2	11,6
3	-1	1	-1	50	1,5	0,2	12,5
4	1	1	-1	60	1,5	0,2	11,8
5	-1	-1	1	50	0,5	0,4	14,7
6	1	-1	1	60	0,5	0,4	15,3
7	-1	1	1	50	1,5	0,4	16,7
8	1	1	1	60	1,5	0,4	17,4
9	-1,685	0	0	46	1	0,3	18
10	1,685	0	0	63	1	0,3	10,1

11	0	-1,685	0	55	0,2	0,3	17,3
12	0	1,685	0	55	1,8	0,3	13,2
13	0	0	-1,685	55	1	0,15	15
14	0	0	1,685	55	1	0,45	15,2
15	0	0	0	55	1	0,3	16,4
16	0	0	0	55	1	0,3	16,5
17	0	0	0	55	1	0,3	18,2
18	0	0	0	55	1	0,3	17,7
19	0	0	0	55	1	0,3	16,8
20	0	0	0	55	1	0,3	17,8

3.1.2. Kết quả xử lý số liệu.

Sử dụng chương trình tính toán tin học và dùng chuẩn student với mức ý nghĩa 5% để kiểm tra tính có nghĩa của các hệ số hồi quy. Ta rút ra phương trình hồi quy có dạng sau:

$$Y = 17,25 - 0,095 X_1 + 1,742 X_3 - 1,25 X_1^2 - 0,827 X_2^2 - 0,88 X_3^3$$

+ Kiểm tra tính tương thích của mô hình hồi quy:

Để kiểm tra tính tương thích của mô hình hồi quy ta dùng chuẩn Fisher.

Kết quả tính toán với mức ý nghĩa $\alpha = 1\%$ và bậc tự do là 14 và 5 thu được

fit (=3,114) < fb (= 10,1). Do vậy, ta có thể kết luận mô hình tìm được ở trên là tương thích

3.1.3. Tìm điểm tối ưu theo phương pháp khảo sát bề mặt mục tiêu:

Từ phương trình hồi quy ta nhận thấy các hệ số bậc hai của phương trình (b_{11} , b_{22} , b_{33}) đều mang dấu âm vậy mặt mục tiêu của mô hình có dạng Elipcoïd, tức là mô hình này có miền cực đại trong vùng khảo sát được chọn. Do đó, ta tìm được một điểm đặc biệt trong miền cực đại này thoả mãn yêu cầu hàm mục tiêu đề ra.

Bảng 3

Kết quả tính toán cho ta các giá trị của điểm đặc biệt là:

Giá trị mã			Giá trị thực		
X_1	X_2	X_3	Độ ẩm (%)	$(NH_4)_2SO_4$ (%)	Bào tử (%)
-0,394	0	0,69	54,3	1	0,4

Qua quá trình tính toán ta thu được điều kiện tối ưu để sinh tổng hợp proteaza axit cao. Độ ẩm của môi trường (X_1) = 54,3%. Tỷ lệ $(NH_4)_2SO_4$ (X_2) = 1%. Tỷ lệ bào tử cấy vào (X_3) = 0,4 %

3.2. Tách và làm sạch chế phẩm proteaza axit từ A.niger-92.

- Tinh sạch enzym bằng sắc ký trao đổi ion trên DEAE cellulose trên sắc ký cột của Pharmacia Biotech.

Chế phẩm thô sau khi kết tủa cồn ở nồng độ 75% (v/v) được tiến hành chạy sắc ký cột trao đổi ion (DEAE cellulose). Cột DEAE cellulose Hiprep 16/10 DEAE (d=16 mm, h=100 mm). Enzim được chiết bằng gradien NaCl (0,0-0,5 M) trong dung dịch đệm axetat 0,05 M, pH5,6, tốc độ dòng chảy 0,3ml/phút, 5ml/1 phần dịch chiết. Kết quả thể hiện ở hình 1

Qua hình 1 tại nồng độ NaCl=0,44M ở phần chiết ống 23 enzym bắt đầu được chiết và đạt cực đại ở ống 27 thu được hoạt độ proteaza axit và protein cao nhất. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Imseniski, Oreschenco, và Florova (1973). Kết quả tách và làm sạch proteaza axit được thể hiện ở bảng sau.

Bảng 4

Hiệu suất thu hồi và mức độ làm sạch chế phẩm proteaza axit

Các bước làm sạch	Tổng lượng protein (mg)	Hoạt độ		Mức độ làm sạch (lần)	Hiệu suất %
		Tổng (đv HđP)	riêng (đv/mg protein)		
Dịch chiết thô	5250	2176	0,415	1	100
Sau khi rửa cón	1065	1387	1,302	3,14	63,74
Sau khi sắc ký trên DEAE cellulose	242	845,55	3,494	8,4	38,86

3.3. Kiểm tra độ đồng nhất của proteaza axit bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit-SDS PAGE của Laemmli

Độ tinh sạch của enzym được kiểm tra lại bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit.

Tiến hành điện di đứng với protein chuẩn 5 μ l: Phosphorylase b - 94 kDa. Albumin (Bovinen Serum Albumin) - 67 kDa. Carbonic anhydrase - 30 kDa. Trypsin inhibitor - 20,1 kDa. α -Lactalbumin - 14,4 kDa Đệm Tris-glycine, pH 8,3, hiệu điện thế 120V, thời gian 60 phút.

Kết quả thể hiện ở điện di đồ hình bên.

0: Mẫu protein chuẩn. 1: Dịch chiết thô của enzym. 2: Dịch enzym sau khi rửa bằng etanol. 3: Dịch enzym sau khi sắc ký trên DEAE cellulose.

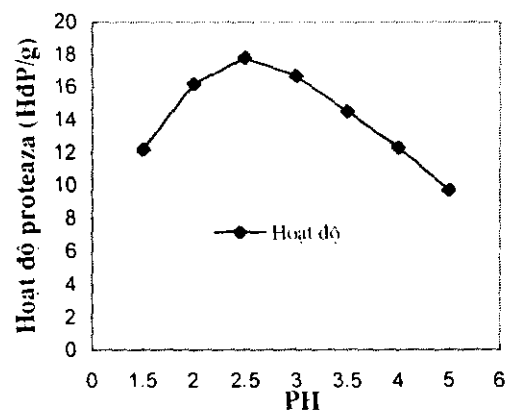
Kết quả tách và làm sạch enzym bằng sắc ký trao đổi ion trên DEAE cellulose chỉ còn 1 băng (mẫu 3) tương ứng với trọng lượng phân tử khoảng 70 kDa. Theo các tài liệu đã công bố proteaza axit có trọng lượng phân tử khoảng 40 kDa nên chúng tôi cho rằng enzym này có izozim với khối lượng phân tử gần tương đương nhau nên chạy sắc ký một lần chưa đủ tách khỏi nhau.

3.4. Một số đặc tính proteaza axit thu được từ *A.niger-92*

3.4.1.- Ảnh hưởng của pH tới hoạt độ proteaza axit

Dịch chiết enzym thô được ủ với cơ chất Hemoglobin ở tại các pH 1,5. 2,5. 3. 3,5. 4. 5. Trong 1 giờ ở nhiệt độ 30°C.

Hoạt độ đạt cao nhất ở pH = 2,5 (HđP=17,8), giảm mạnh ở pH=3,5 và đến pH=5 hoạt độ enzym chỉ còn 11 đv/g. Vậy pH tối ưu của enzym là 2,5.

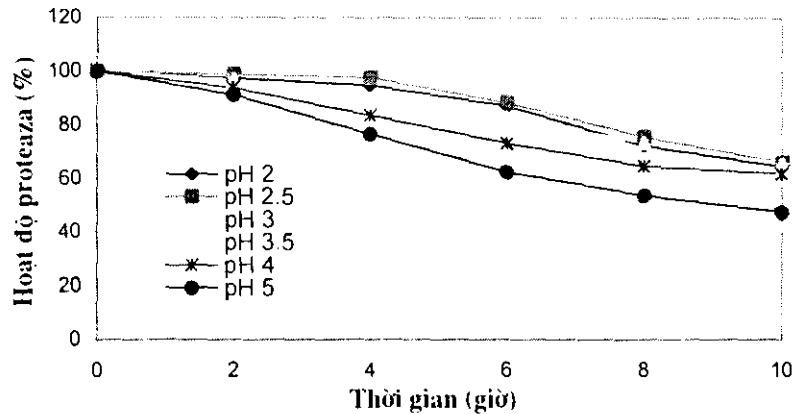


Hình1. ảnh hưởng của pH đến hoạt độ

3.4.2.- Ảnh hưởng của pH tới tính bền enzym

Enzim bền ở các pH khác nhau, chúng tôi tiến hành nghiên cứu dải pH 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5. Ở nhiệt độ 30°C, trong thời gian 10 giờ cứ 2 giờ xác định hoạt lực một lần.

Ta nhận thấy ở pH 2 - 4 hoạt độ sau 10 tiếng còn trên 60%, ở pH 5 hoạt độ chỉ còn 47,6%. Vậy enzym bền vững trong vùng pH 2-4, kết quả này phù hợp với Yoshida 1957.

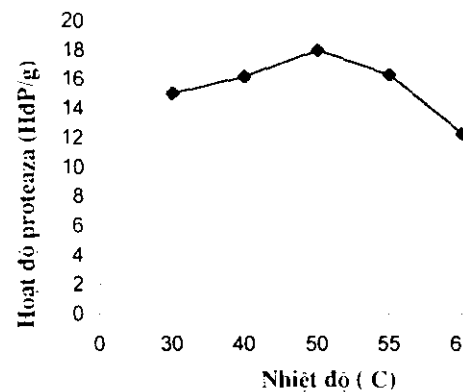


Hình 2. Ảnh hưởng của pH tới tính bền enzym

3.4.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt độ proteaza axit

Dịch chiết enzym thô được ủ với cơ chất Hemoglobin ở tại các nhiệt độ khác nhau: 30°C, 40°C, 50°C, 55°C, 60°C. Trong 1 giờ ở pH 2,5. Kết quả cho thấy hoạt độ enzym tăng dần ở 30°C và đạt cực đại ở 50°C (HdP=17,9 đv/g), giảm mạnh ở 60°C HdP=12,3 đv/g.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Dorokhov 1986. Vậy nhiệt độ tối ưu của enzym này là 50°C.

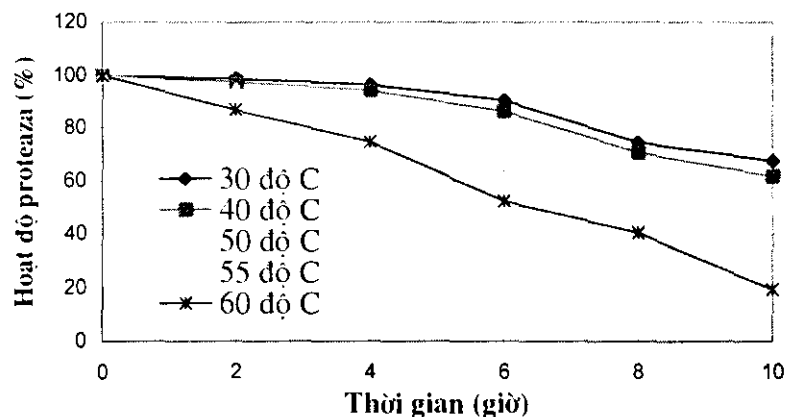


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt

3.4.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới tính bền enzym

Nhiệt độ có tác động mạnh mẽ tới hoạt tính của enzym, chúng tôi thí nghiệm với dải nhiệt độ 30°C; 40°C; 50°C; 55°C; 60°C, ở pH 2,5, thời gian xác định trong 10 giờ, cứ 2 giờ xác định mẫu một lần.

Kết quả cho thấy hoạt độ enzym bắt đầu giảm từ ở giờ thứ 8 trở đi và giảm mạnh ở giờ thứ 10. Tại 40°C ở giờ thứ 10 vẫn còn 61,5% hoạt lực, còn ở 60°C thì hoạt độ lúc đó chỉ còn 19,5% so với hoạt lực tại mốc thời gian 0 giờ. Vậy enzym bền ở nhiệt độ 30 - 40°C.



Hình 4. ảnh hưởng của nhiệt độ tới tính bền enzym

3.5. Nghiên cứu ứng dụng proteaza axit từ *A.niger-92* trong quy trình sản xuất phomat.

Tiến hành thử nghiệm sử dụng các dạng chế phẩm proteaza axit thu được từ *A.niger-92* (dưới dạng kỹ thuật và dạng thô) thay thế renin làm đông tụ sữa theo các tỉ lệ khác nhau. Kết quả thành phần hoá học thể hiện ở bảng __

Bảng 4

Thành phần hoá học sau hai tháng ngâm chín

TT	Loại phomat	Độ ẩm%	Độ chua °T	Nitơ tổng số %	Protein hoà tan%
1	100% Renin	52,11	152	36,37	12,49
2	100% chế phẩm E kỹ thuật	52,01	151	36,46	13,35
3	100% dịch E thô	52,03	150	36,42	14,54
4	50% chế phẩm E kỹ thuật+50 % Rennin	52,01	150	36,38	13,18
5	70% chế phẩm E kỹ thuật+30% Rennin	52,00	151	36,41	13,31
6	50% dịch E thô 50% Rennin	52,10	150	36,38	13,43
7	70% dịch E thô 30% Rennin	52,02	151	36,42	13,37

quan các mẫu đều có màu vàng, hương thơm đặc trưng, cấu trúc bề mặt mịn, bên trong có các lỗ xốp.

Phân tích axit amin tự do bằng phương pháp dẫn xuất hoá OPA và FMOC trên hệ H Amino Quant Series II.

Tiến hành phân tích các mẫu phomat được sản xuất từ các chế phẩm enzym khác nhau. Kết quả thể hiện ở bảng -

Bảng 5

Hàm lượng axit amin tự do của phomat thành phẩm

TT	Axit amin	Mẫu phomat 1 (100% renin)	Mẫu phomat 2 (100% Enzim thô)	Mẫu phomat 3 (100% enzym kỹ thuật)	Mẫu phomat 4 (50% renin+50% enzym thô)
1	Aspartic acid	1.33	3.14	1.14	0.92
2	Glutamic acid	8.62	14.28	4.54	.71
3	Aspargin	1.68	2.40	1.94	1.41
4	Serin	0.57	1.26	1.59	0.42
5	Glutamin	8.81	12.21	9.02	7.54
6	Histidin	4.39	2.54	4.58	3.02
7	Glycin	3.97	1.09	2.30	3.55
8	Threonin	4.69	5.44	4.60	4.44
9	Alanin	7.76	7.86	6.03	5.02
10	Arginin	13.04	10.12	5.03	9.49
11	Tyrosin	7.57	3.36	11.40	7.26
12	Cystien+ Cystin	0.91	1.31	0.92	0.44
13	Valin	7.93	6.34	11.40	7.26
14	Methionin	5.65	0.97	5.34	3.45
15	Tryptophan	10.50	17.25	11.03	11.79
16	Phenylalanin	11.05	18.32	7.61	12.51
17	Isoleucin	32.34	32.31	28.74	25.45
18	Leucin	23.32	5.56	29.56	18.89
19	Lysin	2.75	3.67	1.83	2.73
20	4 – Hydroxy Prolin	2.57	3.67	1.83	2.73
21	Prolin	7.66	7.03	13.48	7.38
Tổng số		167.11	160.72	174.24	139.75

Qua bảng 5 có thể nhận thấy :

Lượng axit amin tự do tổng của các mẫu phomat đều xấp xỉ nhau. Lượng axit amin của mẫu phomat 4 thấp hơn cả (139.75) đó có thể là do tác dụng kìm hãm lẫn nhau của proteaza axit và renin. Còn lượng axit amin tự do của mẫu 3 là cao hơn cả, có thể các proteaza vi sinh vật có khả năng phân cắt protein triệt để hơn (Sawada, Tsuru, 1970).

Tất cả các mẫu này đều có chứa đầy đủ các axit amin không thay thế.

IV. KẾT LUẬN

1. Từ 9 chủng nấm mốc trong bộ sưu tập chủng của Viện CNSH-CNTP ĐHBK-HN đã chọn được chủng nấm mốc *Aspergillus niger* - 92 có hoạt độ proteaza axit cao.
2. Bằng phương pháp quy hoạch toán học thực nghiệm, đã nghiên cứu tối ưu hoá điều kiện nuôi

bề mặt *A. niger* - 92 để thu hoạt độ proteaza axit cao, chúng tôi đã thu được kết quả là: Độ ẩm môi trường: 54,3%. Tỷ lệ sunfat amon $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ bổ xung: 1%. Tỷ lệ bào tử cấy truyền: 0,4%

3. Sử dụng phối hợp các biện pháp làm sạch enzym: như kết tủa ở nồng độ cồn 75% (v/v), sắc ký cột trên DEAE-celluloza thu được chế phẩm enzym tinh khiết có độ sạch gấp 8,4 lần so với dịch enzym thô ban đầu, hiệu suất thu hồi là 38, 86 %. Điện di trên gel polyacrylamit có thể giả thuyết có izozim.
4. Đã xác định được một số đặc tính của proteaza axit *A. niger* - 92 là: có pH tối ưu là 2,5, độ bền pH ở trong vùng 2 – 4. Nhiệt độ tối ưu là 50°C, bền trong vùng nhiệt độ 30 - 40°C. Điểm đẳng điện (pI) bằng 3.
5. Hàm lượng các axit amin tự do của các mẫu phomat làm từ renin và từ chế phẩm proteaza axit của *A. niger* – 92 đều xấp xỉ nhau và chứa đủ các axit amin không thay thế.
6. Phomat được sản xuất từ chế phẩm proteaza axit của *A. niger* – 92 và renin đều có chất lượng dinh dưỡng và giá trị cảm quan gần tương đương nhau. Vậy proteaza axit của *A. niger* – 92 có khả năng là chất thay thế renin trong công nghệ sản xuất phomat do tính kinh tế và điều kiện thu nhận dễ dàng .

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1- Abdou S, Ghita I, El-Shibiny S. The use of microbial rennet [*Endothia parasitica*, *Mucor michei* proteaza] and pepsin in the manufacture of Domiati cheese. Egyptian J. Dairy Science 2 (2), P. 147-154. 1976.
- 2- Nakanishi, Tand Nakazawa. Y. XVII International Dairy Congress, 1974.
- 3- Picon A, Gaya P, Medina M, Nunez M. The effect of liposome-encapsulated *Bacillus substilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. J. Dairy Science 78 (6), P. 1238-1247, 1995.

SUMMARY

STUDY ON CHARACTERISTICS OF PROTEASE ACID FROM ASPERGILLUS NIGER –92 AND APPLY TO CHEESE PROCESSING.

Among 9 strains of fungi *Aspergillus* type , *A. niger*-92 strain was chosen because of high ability synthetic of acidic protease. Optimization culture conditions: W=54,3%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 1%, spores =0,14%. Study on some characteristics of this strain's enzyme is pH opt: 2,5 , stable in a range of pH from 2 to 4, t^o opt: 50°C, stable in a range of temperature from 30^o to 50°C (pI= 3). Using this enzyme for cheese processing, the product equal some same style cheese in the market in total amino acid and it contained essential amino acid.

ẢNH HƯỞNG CỦA NaCl VÀ KClO₃ ĐẾN MỘT SỐ CHỈ TIÊU SINH LÝ, SINH HÓA CỦA 4 GIỐNG LÚA CHỊU MẶN KHÁC NHAU.

VÕ MINH THỨ

Trường Đại học Sư phạm Quy Nhơn

NGUYỄN NHƯ KHANH

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Môi trường nước mặn kìm hãm quá trình sinh trưởng, phát triển của thực vật nước ngọt (glycophyte) nói chung, trong đó có cây lúa [2,3,6]. Cây lúa ở giai đoạn mạ rất mẫn cảm với mặn [3]. Dưới tác động của NaCl nhiều chỉ tiêu sinh lý- sinh hóa trong cây lúa bị biến đổi, làm giảm năng suất và phẩm chất của hạt [4,6]. Vì vậy, để tìm hiểu ảnh hưởng của NaCl và KClO₃ đến một số chỉ tiêu sinh lý- sinh hóa của 4 giống lúa chịu mặn khác nhau, chúng tôi đã tiến hành phân tích hàm lượng các nguyên tố khoáng, huỳnh quang diệp lục và phổ điện di isozym trong cây mạ.

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

1.1. Đối tượng nghiên cứu: gồm 4 giống lúa

- TH85: thích ứng rộng, chịu mặn khá
- OM1589 (OM15): chịu mặn tốt.
- OM1327-14 (OM13): chịu mặn kém.

Ba giống lúa này do trung tâm Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp Bình Định cung cấp.

- CR203: không chịu mặn, do Viện Di truyền nông nghiệp cung cấp.

1.2. Phương pháp trồng cây trong môi trường nhân tạo ở giai đoạn mạ.

Sau khi hạt nảy mầm được 3 ngày, chọn các cây mầm dài như nhau cho vào đĩa Petri có chứa môi trường Knop, mỗi đĩa 50 cây. Nuôi cây mầm trong buồng ánh sáng, có cường độ 7.000 lux, nhiệt độ trung bình 27°C.

Khi cây mạ được 14 ngày tuổi thay môi trường nuôi cấy mới gồm 3 công thức.

- Đối chứng (dung dịch Knop).
- Mặn (dung dịch Knop + NaCl 0,9%).
- Mặn có thêm KClO₃ (dung dịch Knop + NaCl 0,9% + KClO₃ 50PPm). KClO₃ 50PPm là nồng độ tối ưu được chọn qua thử nghiệm.

Khi cây mạ được 21 ngày tuổi, lấy mẫu đem phân tích chỉ tiêu hàm lượng nguyên tố khoáng, huỳnh quang diệp lục và phổ isozym peroxidase esterase.

1.3. Phương pháp phân tích mẫu.

- Phân tích hàm lượng nguyên tố khoáng Ca, Mg, Fe, K, Na, P, Cl bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (do Viện hóa học thuộc Trung tâm khoa học và công nghệ Quốc gia phân tích). Phân tích hàm lượng nitơ theo phương pháp MicroKjeldahl.

- Đo huỳnh quang diệp lục: đem toàn bộ cây mạ nuôi trong đĩa Petri ở các công thức thí nghiệm đặt ở ngoài ánh sáng trời. Dùng máy Hansatech để đo huỳnh quang diệp lục ở lá mạ. Nhiệt độ ở thời điểm đo 27-30°C, thời gian chiếu sáng trên là 3 phút.

- Phổ điện di isozym peroxidase và esterase được phân tích trên nền gel polyacrylamit (phân tích tại Phòng thí nghiệm Khoa sinh- ĐHKHTN Hà Nội).

II. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.

2.1. Ảnh hưởng của NaCl và KClO₃ đến hàm lượng các nguyên tố khoáng trong cây mạ.

Hàm lượng các nguyên tố khoáng có liên quan đến khả năng chống chịu ở thực vật [1]. Để đánh giá khả năng hấp thụ và tích lũy các nguyên tố khoáng trong cây mạ được tác động của NaCl và KClO₃, chúng tôi tiến hành phân tích các nguyên tố Ca, Mg, Fe, Na, P, K, Cl, N, kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1
Hàm lượng các nguyên tố khoáng trong cây mạ của 4 giống lúa chịu mặn khác nhau dưới tác động của NaCl và KClO₃ (mg/kg trọng lượng khô).

Giống	Ca		Mg		Fe		K		Na		P		Cl		N	
	(mg/kg)	% so đ.c	(mg/kg)	% so đ.c	(mg/kg)	% so đ.c	(mg/kg)	% so đ.c	(mg/kg)	% so đ.c	(mg/kg)	% so đ.c	(mg/kg)	% so đ.c	(mg/kg)	% so đ.c
Đ.C	9357	100,00	3150	100,00	266	100,00	14350	100,00	2183	100,00	1518	100,00	490	100,00	13840	100,00
	±10,50		±17,06		±16,45		±7,89		±4,96		±13,24		±30,56		±15,86	
NaCl	5707	61,65	2425	76,98	207	77,81	11420	79,58	14960	685,29	2484	163,63	9796	1999,18	11825	86,44
	±25,06		±7,67		±5,80		±4,56		±24,16		±9247		±16,11		±13,64	
NaCl+KClO ₃	7612	82,22	1925	61,11	216	81,20	13500	94,03	14845	680,02	4141	272,79	12450	2540,81	12621	91,19
	±28,62		±11,41		±6,18		±15,60		±9,30		±11,41		±8,51		±20,95	
Đ.C	7181	100,00	2975	100,00	679	100,00	15497	100,00	2083	100,00	2070	100,00	815	100,00	14365	100,00
	±25,10		±35,46		±4,62		±13,80		±15,68		±13,84		±9,21		±21,59	
NaCl	6262	87,27	2150	72,26	311	45,80	11240	72,53	18190	873,25	3105	150,00	10635	1427,60	12493	86,96
	±44,36		±55,31		±4,42		±11,07		±30,29		±18,76		±30,69		±13,16	
NaCl+KClO ₃	6340	88,28	2050	68,90	337	49,63	14106	91,02	17768	853,00	2312	111,69	12225	1500,00	12780	88,96
	±28,28		±56,29		±7,99		±12,09		±29,04		±17,19		±23,51		±41,40	
8632	100,00	2840	100,00	496	100,00	12850	100,00	1100	100,00	3450	100,00	8190	100,00	12803	100,00	
	±62,20	±55,92		±7,47		±11,41		±12,78		±23,43		±10,44		±43,67		
5957	69,01	2100	73,94	233	46,93	10270	79,92	18200	1654,5	2934	85,04	14287	1744,44	9845	76,89	
	±40,64	±52,59		±4,43		±12,94		±33,82	4	±27,16		±50,89		±39,31		
5582	64,66	1915	67,42	405	81,65	10980	85,44	17730	1611,1	2139	62,00	18980	2317,46	10295	80,41	
	±30,16	±44,35		±6,30		±13,49		±49,26	8	±22,30		±38,06		±25,89		
6632	100,00	2650	100,00	269	100,00	10950	100,00	1503	100,00	1518	100,00	1837	100,00	13466	100,00	
	±40,44	±50,01		±3,94		±16,25		±13,80		±16,11		±17,43		±21,58		
5090	76,74	2115	79,81	235	87,36	9893	90,34	19880	1322,6	2932	193,14	11634	633,31	9635	71,69	
	±43,97	±37,36		±4,40		±13,58		±46,50	8	±17,84		±32,11		±53,90		
4782	72,10	1950	73,58	245	91,07	9986	91,19	15586	1036,6	4141	272,73	14287	777,73	9916	73,63	
	±47,80	±63,82		±4,96		±15,55		±48,33	9	±16,21		±44,34		±31,39		

Số liệu thu được ở bảng 1 cho thấy hàm lượng các nguyên tố khoáng Ca, Mg, Fe, K, Na, Cl, P, N đều biến động theo giống lúa cũng như theo công thức thí nghiệm.

Ở công thức đối chứng: hàm lượng các nguyên tố khoáng Ca và Mg đạt trị số cao nhất ở giống TH85 (9357 mg/kg đối với Ca và 3150 mg/kg đối với Mg) và thấp nhất ở giống CR203 (6632 đối với Ca và 2650 mg/kg đối với Mg).

Hàm lượng Fe, K, N cao nhất trong cây mạ giống OM15 (trị số đó là 679, 15497 và 14365 mg/kg chất khô). Đối với Fe thì giống TH85 có hàm lượng thấp nhất (226mg/kg). Còn đối với K thì giống CR203 đạt trị số thấp nhất (10950 mg/kg). Hàm lượng nitơ và kali trong cây mạ giống TH85 thấp hơn giống OM15 nhưng cao hơn giống CR203 và OM13.

Hàm lượng natri trong cây mạ của giống chịu mặn tốt TH85 và OM15 cao hơn trong giống chịu mặn kém OM13 và không chịu mặn CR203 (2183 đối với TH85 và 2083 đối với OM15, còn giống CR203 và OM13 chỉ đạt 1503 và 1100mg/kg chất khô). Đối với Cl giống TH85 và OM15 có hàm lượng thấp hơn giống OM13 và CR203.

Trong môi trường nuôi cấy mạ có NaCl hầu như hàm lượng các nguyên tố khoáng như Ca, Mg, Fe, K, N trong cây mạ các giống đều giảm xuống. Hàm lượng Na và Cl tăng lên rất nhiều so với cây mạ sống trong môi trường không có NaCl. Điều đó chứng tỏ rằng khi có mặt của NaCl thì sự xâm nhập của ion Na^+ và Cl^- vào trong cây rất mạnh. Chính sự xâm nhập và tích lũy natri, clo trong cây với hàm lượng cao sẽ gây độc cho cây, từ đó kìm hãm các quá trình sinh lý, sinh hóa, sinh trưởng, phát triển của cây lúa.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy ở điều kiện mặn, giống chịu mặn tốt TH85 và OM15 tích lũy Na và Cl trong cây mạ thấp hơn giống chịu mặn kém OM13 và không chịu mặn CR203. Cụ thể, hàm lượng natri trong cây mạ của giống TH85 là 14960 và của giống OM15 là 18190, hàm lượng clo trong cây của giống TH85 là 9796 và của giống OM15 là 10635. Trong khi đó hàm lượng natri của giống OM13 là 18200 và của giống CR203 là 19880. Hàm lượng clo của giống OM13 là 14287 và của giống CR203 là 11634 mg/kg chất khô.

Việc bổ sung KClO_3 vào môi trường có NaCl đã làm tăng sự tích lũy nhiều nguyên tố khoáng trong cây mạ như Fe, K, N. KClO_3 làm hạn chế sự tích lũy Mg, đặc biệt là Na trong cây lúa. KClO_3 cũng có ảnh hưởng tốt đối với việc tích lũy kali trong cây mạ. Hàm lượng kali trong cây mạ ở công thức có xử lý KClO_3 tăng lên nhiều nhất ở giống TH85 và OM15 (18,21% và 12,54%) tiếp đến là giống OM13(6,91%), thấp nhất là giống CR203(0,94%).

2. 2. Ảnh hưởng của NaCl và KClO₃ đến huỳnh quang điệp lục của cây mạ lúa.

Kết quả đo huỳnh quang điệp lục hữu hiệu của cây mạ 4 giống lúa được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy huỳnh quang điệp lục của cây mạ khác nhau ở 4 giống lúa.

Ở công thức đối chứng, huỳnh quang điệp lục hữu hiệu của cây mạ giống chịu mặn tốt TH85, OM15 cao hơn giống chịu mặn kém OM13 và CR203 ở các mức ánh sáng 80, 90 và 100% ánh sáng toàn phần.

Dưới tác động của NaCl huỳnh quang điệp lục hữu hiệu của cây mạ TH85 giảm xuống từ mức ánh sáng 60-100%. Giống OM15 có huỳnh quang hữu hiệu giảm từ mức ánh sáng 30-100%, giống OM13 giảm từ mức ánh sáng 30-90%, còn giống CR203 giảm từ mức ánh sáng 60-100%. Dưới tác động của NaCl tỉ số Fv/FM của giống chịu mặn tốt TH85 và OM15 đạt cực đại ở mức ánh sáng cao hơn giống chịu mặn kém OM13 và không chịu mặn CR203. Cụ thể, ở mức ánh sáng 80%, trị số huỳnh quang hữu hiệu đạt cực đại đối với giống TH85 là 0,786, giống OM15 là 0,783.

Bảng 2
Huỳnh quang điệp lục hữu hiệu của cây mạ 4 giống lúa chịu mặn khác nhau dưới ảnh hưởng của mặn NaCl và mặn có xử lý KClO₃

Mức ánh sáng	Công thức	Huỳnh quang điệp lục hữu hiệu (F _v /F _M)			
		TH85	OM15	OM13	CR203
30	Đ.C	0,754±0,009	0,803±0,007	0,743±0,011	0,731±0,012
	NaCl	0,783±0,006	0,716±0,023	0,742±0,012	0,781±0,016
	NaCl+KClO ₃	0,710±0,016	0,727±0,002	0,799±0,015	0,756±0,001
40	Đ.C	0,769±0,003	0,786±0,014	0,772±0,006	0,755±0,003
	NaCl	0,755±0,032	0,720±0,006	0,749±0,027	0,778±0,008
	NaCl+KClO ₃	0,729±0,004	0,748±0,006	0,798±0,003	0,735±0,008
50	Đ.C	0,765±0,015	0,831±0,008	0,761±0,008	0,766±0,023
	NaCl	0,779±0,017	0,765±0,009	0,716±0,011	0,794±0,013
	NaCl+KClO ₃	0,783±0,002	0,766±0,018	0,795±0,001	0,751±0,005
60	Đ.C	0,743±0,021	0,823±0,009	0,791±0,007	0,797±0,022
	NaCl	0,736±0,003	0,745±0,020	0,751±0,005	0,774±0,013
	NaCl+KClO ₃	0,790±0,008	0,785±0,022	0,758±0,010	0,751±0,055
70	Đ.C	0,792±0,004	0,830±0,006	0,806±0,003	0,761±0,002
	NaCl	0,680±0,012	0,733±0,005	0,766±0,012	0,747±0,006

	NaCl+KClO	0,771±0,004	0,754±0,008	0,794±0,003	0,752±0,011
80	Đ.C	0,808±0,027	0,816±0,001	0,772±0,004	0,806±0,005
	NaCl	0,786±0,011	0,783±0,007	0,753±0,010	0,747±0,013
	NaCl+KClO	0,771±0,004	0,759±0,008	0,822±0,003	0,801±0,010
90	Đ.C	0,762±0,013	0,811±0,002	0,767±0,004	0,748±0,019
	NaCl	0,741±0,003	0,740±0,004	0,725±0,005	0,675±0,005
	NaCl+KClO	0,826±0,018	0,816±0,013	0,775±0,008	0,784±0,014
100	Đ.C	0,787±0,006	0,813±0,004	0,692±0,008	0,764±0,010
	NaCl	0,764±0,007	0,711±0,019	0,764±0,008	0,759±0,013
	NaCl+KClO	0,769±0,002	0,749±0,006	0,786±0,005	0,744±0,002

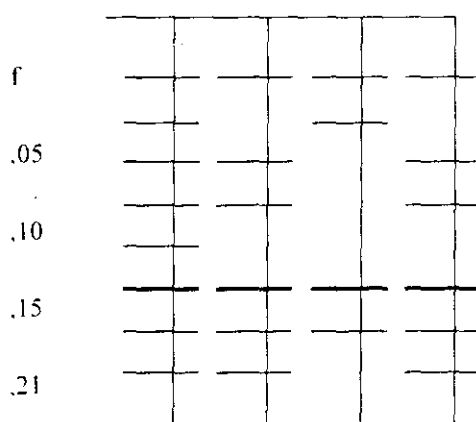
Còn ở giống OM13 trị số đó là 0,766 ở mức ánh sáng 70%, và ở giống CR203 là 0,794 ở mức ánh sáng 50%.

Việc xử lý KClO₃ cũng làm tăng huỳnh quang diệt lục hữu hiệu của các giống lúa từ mức ánh sáng 50-100% (đối với TH85), từ mức ánh sáng 30-100% (OM15), từ mức ánh sáng 30-100% (OM13) và CR203 ở mức ánh sáng 70,80,90%.

2.3. Phổ điện di isozym peroxidase và esterase của cây mạ.

Để tìm hiểu mối quan hệ giữa đặc tính giống và phổ điện di isozym chúng tôi đã tiến hành phân tích phổ điện di isozym peroxidase và esterase trong cây mạ 21 ngày tuổi trồng trong dung dịch dinh dưỡng Knop. Kết quả phân tích như sau:

- Phổ điện di isozym peroxidase./

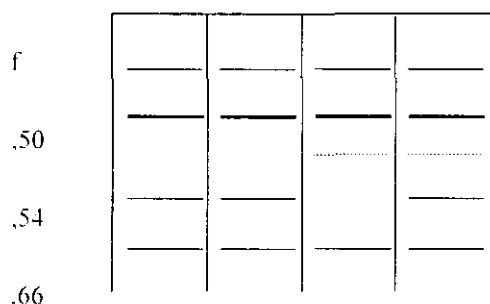


Hình 1: Phổ điện di isozym peroxidase của 4 giống lúa chịu mặn khác nhau.

từ trái sang phải: OM15-OM13-CR203-TH85

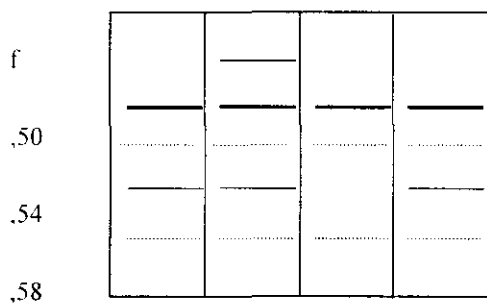
Kết quả phân tích phổ isozym peroxidase ở hình 1 và ảnh 1 cho thấy giống OM15 có số băng Rf nhiều nhất (8 băng), 2 giống OM13 và TH85 có số băng Rf bằng nhau (6 băng). Như vậy ở giống chịu mặn tốt OM15 và TH85 có số băng Rf nhiều hơn ở giống không chịu mặn CR203.

Tính đa hình của enzym esterase cũng liên quan đến hệ thống phân loại của cây lúa [3]. Kết quả phân tích của chúng tôi cũng cho thấy phổ điện di isozym esterase không giống nhau ở các giống lúa chịu mặn khác nhau (hình 2,3)



Hình 2: Phổ điện di isozym esterase của các giống lúa nhuộm với β -naptylaxetat.

Từ trái sang phải:
OM15-OM13-CR203-TH85.



Hình 3: Phổ điện di isozym esterase của các giống lúa nhuộm với α -naptylaxetat.

Ảnh 3: Phổ điện di isozym esterase nhuộm với α -naptylaxetat.

Từ trái sang phải: OM15-OM13-CR203-

Hình 2 và ảnh 2 cho thấy phổ điện di isozym esterase nhuộm với β -naphthylaxetat của tất cả 3 giống lúa OM15, TH85, OM13 đều xuất hiện băng Rf 0,5; 0,64; 0,68. Giống CR203 không có băng Rf 0,64. Hai giống CR203 và TH 85 có xuất hiện thêm băng Rf 0,66 nhưng không rõ nét. Còn giống OM13 xuất hiện thêm băng Rf 0,50. Băng Rf 0,5 ở các giống lúa xuất hiện rõ nét hơn so với các băng khác.

Khi nhuộm α -naphthylaxetat chúng tôi thấy 4 giống lúa đều có băng Rf 0,54; 0,58; 0,64. Trong đó băng Rf 0,54 xuất hiện rõ nét nhất. Giống CR203 có số băng Rf ít nhất (3 băng) (hình 3, ảnh 3).

Nhìn chung số băng Rf của 3 giống OM15, TH85, OM13 nhiều hơn của giống CR203. Điều này cũng có thể liên quan đến mức độ chịu mặn của các giống lúa. Nghĩa là ở các giống lúa chịu mặn tốt và khá có số băng Rf của isozym esterase nhiều hơn và xuất hiện rõ hơn so với giống không chịu mặn CR203.

III. KẾT LUẬN.

1. NaCl nồng độ 0,9% kìm hãm khả năng hấp thụ và tích lũy các nguyên tố khoáng Ca, Mg, Fe, K, N và làm tăng sự tích lũy Na, Cl trong cây mạ của 4 giống lúa.
2. Huỳnh quang Diệp lục của cây mạ 4 giống lúa OM15, TH85, OM13, CR203 giảm ở các mức ánh sáng từ 30-100% dưới tác động của NaCl 0,9%.
3. Xử lý $KClO_3$ có tác dụng tốt đối với sự tích lũy các nguyên tố khoáng N, Ca, K, P, Fe, Cl và làm tăng trị số cực đại của huỳnh quang Diệp lục hữu hiệu đối với 4 giống lúa.
4. Các giống lúa chịu mặn tốt OM15, TH85 có số băng isozym peroxidase và esterase nhiều hơn giống không chịu mặn CR203

TÓM TẮT

ẢNH HƯỞNG CỦA NaCl VÀ $KClO_3$ ĐẾN MỘT SỐ CHỈ TIÊU SINH LÝ, SINH HÓA CỦA 4 GIỐNG LÚA CHỊU MẶN KHÁC NHAU.

Mặn kìm hãm sinh trưởng, phát triển, làm giảm sút năng suất và phẩm chất của cây trồng, trong đó có cây lúa. Trước tiên mặn làm biến đổi nhiều chỉ tiêu sinh lý- sinh hóa theo chiều hướng bất lợi. Điều đó cũng được thể hiện qua các công trình nghiên cứu mà chúng tôi đã công bố trên các tạp chí sinh học số 1, 4/1998, tạp chí Di truyền học và ứng dụng số 1, 3/1995, số 4/1997, số 1/1999. Trong phạm vi bài viết này chúng tôi chỉ đề cập ảnh hưởng của mặn đến khả năng hấp thụ và tích lũy các nguyên tố khoáng, huỳnh quang Diệp lục, mối liên quan giữa đặc tính giống và phổ điện di isozym peroxidase, esterase của cây mạ 4 giống lúa chịu mặn khác nhau OM15, TH85, OM13, CR203.

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy NaCl 0,9% làm giảm khả năng hấp thụ và tích lũy

các nguyên tố khoáng Ca, Mg, P, K, Fe, N, làm tăng sự tích lũy Na^+ , Cl^- trong cây mạ. Huỳnh quang diệp lục hữu hiệu của cây mạ cũng giảm dưới tác động của NaCl. Các giống lúa chịu mặn tốt (OM15, TH85) sự giảm sút các chỉ tiêu này ít hơn so với giống chịu mặn kém OM13 và không chịu mặn CR203. Phổ điện di isozym peroxidase, esterase của giống lúa chịu mặn tốt có số băng nhiều hơn giống không chịu mặn.

Việc xử lý KClO_3 cũng đã làm giảm tác hại của mặn, làm tăng sự tích lũy các nguyên tố khoáng, tăng huỳnh quang diệp lục hữu hiệu của cây mạ.

Summary

THE INFLUENCE OF THE SALINITY AND SALINITY WITH THE ADDITION OF KClO_3 ON SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICES OF DIFFERENT SALT TOLERANT RICE BREED SEEDLINGS

VO MINH THU, QUINHON PE-DAGOGICAL INSTITUTE

NGUYEN NHU KHANH, HANOI UNIVERSITY & EDUCATION

Our experimental results showed that the salinity inhibited the ability of mineral element absorption in rice seedling, but the accumulation of Na and Cl increased.

Effective chlorophyll fluorescence (Fv/FM) of rice seedling leaves was reduced under the influence of NaCl 0,9%.

NaCl with the addition of KClO_3 increased the accumulation of some mineral elements in the seedlings and had better effect on the ratio Fv/FM than NaCl 0,9%.

High salt tolerant rice varieties have greater bands of isozymes of peroxidase, as well as of esterase than CR203 no having the ability of salt tolerance.

TÀI LIỆU THAM KHẢO.

1. Fimothy, David Colner, Emanuel Epstein, 1995. Plant physiol. 108: 1715-1724.
2. Flower T.J and Yeo. A.R, 1989. Effect of Salinity on plant growth and crop yields. Nato ASI series, vol.19.
3. International rice research note, 1996. Principal component analysis and variety classification in relation to rice seedling salinity tolerarice, vol.21, No.2-3
4. Proceeding of the international rice genetics symposium, 1996. Rice genetics, IRRI, Manila, Philippines, P.83-89.
5. Nguyễn Như Khanh, Võ Minh Thứ, 1995. Tính đa hình isozym peroxidase và esterase của một số giống lúa chịu hạn và mặn. Tạp chí Di truyền học và ứng dụng, số 3: 30-32.
6. Võ Minh Thứ, Lê Dụ, Nguyễn Như Khanh, 1998. Ảnh hưởng của NaCl và KClO_3 đến sự tích lũy các nguyên tố khoáng, hàm lượng nitơ và năng suất lúa TH 85. Tạp chí sinh học, số 20: 50-54.

HIỆU QUẢ DIỆT SÂU HẠI CÂY NÔNG - LÂM NGHIỆP CỦA BÀO TỬ NẤM *BEAUVERIA BASSIANA*

PHẠM THỊ THUỶ¹, NGÔ TỰ THÀNH², NGUYỄN VĂN ĐÌNH²

¹ Viện Bảo vệ thực vật

² Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội

I. MỞ ĐẦU

Các nấm ký sinh côn trùng ngày càng quan trọng trong việc kiểm soát quần thể côn trùng gây hại [13, 14, 16]. *Beauveria bassiana* (Bb) là một trong những nấm ký sinh đã được nghiên cứu nhiều nhất [11, 15, 17]. Nó đã được dùng để phòng trừ các loại sâu hại như bọ Colorado hại khoai tây [17, 18], rầy nâu hại lúa [4, 10], sâu róm hại thông [7, 8], sâu tơ hại rau [5, 6]. Nó cũng lây nhiễm cho sâu đục thân ngô [17]. Bb còn được sử dụng trong biện pháp phòng trừ tổng hợp bao gồm việc sử dụng các giống cây trồng đề kháng sâu hại, áp dụng kỹ thuật canh tác hợp lý, thuốc bảo vệ thực vật hoá học và vi sinh vật [1, 2, 3]. Trong nghiên cứu này chúng tôi tìm hiểu ảnh hưởng của bào tử nấm Bb lên 7 loại sâu hại là sâu tơ, sâu xanh bướm trắng và sâu khoang hại rau, sâu róm thông hại thông, bọ xít xanh, bọ xít đen và rầy nâu hại lúa. Các thử nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nấm *Beauveria bassiana* được phân lập từ một số loại sâu bị nhiễm tự nhiên ngoài đồng ruộng thuộc huyện Từ Liêm, Hà Nội. Nấm được phân lập trên môi trường Sabouraud cải tiến. Mẫu sâu bị nhiễm nấm tự nhiên được rửa sạch bằng nước cất vô trùng rồi được nghiền trong cối sứ và hoà trong nước vô trùng. Dịch sâu được cấy gạt trên môi trường thạch đĩa; các đĩa được ủ ở nhiệt độ 28°C, độ ẩm 85%. Các khuẩn lạc nấm mọc lên có màu trắng, xốp đặc trưng, được kiểm tra dưới kính hiển vi, và xác định là nấm Bb theo khoá phân loại của Barnett và Barry [12], sau đó được nuôi thành chủng thuần khiết để dùng vào các thí nghiệm.

2. Các loại sâu dùng trong nghiên cứu

- Sâu tơ (*Plutella xylostella*) được thu thập tại Mai Dịch, Từ Liêm, Hà Nội.
- Sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapae*) thu tại vườn rau bắp cải của Viện Bảo vệ Thực vật và ruộng rau cải tại Đại Kim, Thanh Trì, Hà Nội.
- Sâu khoang (*Spodoptera litura*) được thu ở dạng trứng tại Mai Dịch, Từ Liêm, Hà Nội, đem về cho nở ra sâu non.
- Sâu róm thông (*Dendrolimus punctatus*) do Lâm trường Sóc Sơn, Hà Nội cung cấp.
- Bọ xít xanh (*Nezara viridula*) và bọ xít đen (*Scotinophora lurida*) được tại Đông Ngạc, Từ Liêm, Hà Nội.
- Rầy nâu (*Nilaparvata lugens*) do Viện Bảo vệ Thực vật cung cấp.

Tất cả các sâu được nuôi đến độ tuổi 2 hoặc 3.

3 Xác định khả năng diệt sâu của bào tử nấm Bb

Dịch bào tử nấm Bb được kiểm tra dưới kính hiển vi với phòng đếm hồng cầu để từ đó chế tạo ra các dịch có nồng độ bào tử từ 2.10^8 đến 10.10^8 /ml. Khi dùng để phun lên sâu, nó được bổ xung với chất bám dính Tween 80 (0,02%). Mỗi loại sâu thí nghiệm được bố trí 3 - 4 công thức phun với dịch bào tử ở các nồng độ khác nhau, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần gồm 10 - 20 con. Hiệu lực diệt sâu của dịch bào tử nấm được tính theo công thức Abbott [9] sau đây:

$$M(\%) = \frac{C_a - T_a}{C_a}$$

Trong đó: M - Tỷ lệ chết của sâu hại (%); C_a - Số lượng sâu sống sót ở công thức đối chứng; T_a - Số lượng sâu sống sót trong công thức có phun dịch bào tử.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dưới đây trình bày hiệu quả của chế phẩm bào tử nấm Bb đối với một số loại sâu hại thường gặp trong nông lâm nghiệp.

1. Hiệu quả lên sâu tơ (*Plutella xylostera*) hại rau bắp cải

Qua bảng 1 dưới đây có thể thấy rằng nồng độ bào tử 9.10^8 /ml có hiệu quả diệt sâu cao nhất và sau 8 ngày đạt 81,25% so với 31,2% ở nồng độ 3.10^8 /ml.

Bảng 1. Hiệu quả diệt sâu tơ của dịch bào tử nấm Bb ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ dịch (x 10^8 bào tử/ml)	Tỷ lệ sâu chết (%) sau khi phun (ngày)					Nhiệt độ trung bình (°C)	Độ ẩm trung bình (%)
	1	2	3	5	8		
3	5,0	10,5	26,3	29,4	31,2	27,5	84,0
6	10,0	15,8	29,8	43,7	63,5		
9	25,0	36,8	59,7	70,6	81,25		

Về ảnh hưởng của phức hệ nhiệt độ - độ ẩm đối với hiệu lực diệt sâu tơ có thể thấy qua bảng 2 dưới đây rằng ở nhiệt độ trung bình 24,1 °C, độ ẩm 84%, tỷ lệ sâu chết ít hơn ở nhiệt độ 28 °C và độ ẩm 87%.

Bảng 2. Hiệu quả diệt sâu tơ của dịch bào tử nấm Bb ở các chế độ nhiệt độ - độ ẩm khác nhau.

Đợt thí nghiệm	Nồng độ dịch (x 10^8 bào tử/ml)	Tỷ lệ sâu chết (%) sau khi phun (ngày)						Nhiệt độ trung bình (°C)	Độ ẩm trung bình (%)
		2	3	5	7	8	10		
1	4	10,0	13,8	19,2	32,0	41,4	56,5	24,1	84,0
	8	13,4	31,1	34,6	52,0	72,0	75,8		
2	4	11,6	15,2	21,7	34,3	45,0	59,5	28,0	87,0
	8	17,2	34,1	48,3	59,7	75,7	79,2		

2. Hiệu quả lên sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapae*) hại rau

Kết quả trình bày trong bảng 3 cho thấy trong phạm vi nồng độ tăng dần từ $2 \cdot 10^8$ đến $6 \cdot 10^8$ bào tử/ml thì hiệu quả diệt sâu xanh nói chung tăng lên; sâu có thể chết tới 100% sau từ 7 đến 10 ngày kể từ khi phun bào tử.

Bảng 3. Hiệu quả diệt sâu xanh bướm trắng của dịch bào tử nấm Bb ở các nồng độ khác nhau

Đợt thí nghiệm	Nồng độ dịch ($\times 10^8$ bào tử/ml)	Tỷ lệ sâu chết sau khi phun (ngày)					Nhiệt độ trung bình ($^{\circ}\text{C}$)	Độ ẩm trung bình (%)
		1	3	5	7	10		
1	2	32,6	53,6	68,2	74,1	98,5	26,1	85,6
	4	37,8	46,2	88,2	100			
	6	48,4	70,2	90,4	100			
2	2	0	6,6	32,1	50,0	64	28,5	81,3
	4	10,0	33,3	64,3	75,0	100		
	6	30,0	83,3	96,4	100			

Ảnh hưởng của phức hệ nhiệt độ - độ ẩm cũng có thể được nhận ra trong bảng 3, và đặc biệt trong bảng 4:

Bảng 4. Hiệu quả diệt sâu xanh bướm trắng của dịch bào tử nấm Bb ở các chế độ nhiệt độ - độ ẩm khác nhau

Đợt thí nghiệm	Nồng độ dịch ($\times 10^8$ bào tử/ml)	Tỷ lệ sâu chết (%) sau khi phun (ngày)				Nhiệt độ trung bình ($^{\circ}\text{C}$)	Độ ẩm trung bình (%)
		2	3	5	7		
1	8	30,0	50,0	70,0	100,0	24,1	84,0
2	8	60,0	70,0	100,0		28,0	87,0

Qua đó có thể thấy rằng với nhiệt độ trung bình 28°C và độ ẩm trung bình là 87%, tỷ lệ sâu chết là cao hơn so với ở nhiệt độ $24,1^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm là 84%. Có thể, phức hệ nhiệt độ - độ ẩm đó là thích hợp cho sự sinh trưởng của nấm Bb trên sâu.

3. Hiệu quả lên sâu khoang (*Spodoptera litura*) hại rau

Bảng 5 cho thấy rằng ở nhiệt độ trung bình $24,5^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm trung bình 86,3% thì dịch bào tử nấm Bb có nồng độ $5 \cdot 10^8$ và $10 \cdot 10^8$ /ml diệt được 50,1% và 60,8% sâu khoang sau 12 ngày, theo thứ tự.

Bảng 5. Tác dụng diệt sâu khoang của dịch bào tử nấm Bb ở các nồng độ khác nhau.

Nồng độ dịch ($\times 10^8$ bào tử/ml)	Tỷ lệ sâu chết (%) sau khi phun (ngày)					Nhiệt độ trung bình (%)	Độ ẩm trung bình (%)
	2	5	7	10	12		
5	8,0	21,2	38,7	44,4	50,1	24,5	86,3
10	12,8	47,2	47,2	51,2	60,8		

Nếu so sánh với các thí nghiệm khác (bảng 1, 2, 3, 4,) thì có thể thấy thêm rằng hiệu quả của dịch bào tử nấm Bb trên sâu khoang là kém hơn so với trên nhiều loại sâu khác.

4. Hiệu quả lên sâu róm thông (*Dendrolimus punctatus*) hại thông

Ở nhiệt độ trung bình 27,3°C và độ ẩm trung bình 83,5% chế phẩm nấm Bb có nồng độ từ 4.10⁸ đến 6.10⁸ bào tử/ml có khả năng diệt sâu róm thông từ 73,8% đến 88,9% sau 10 ngày; mật độ bào tử càng cao thì hiệu quả diệt sâu càng mạnh (bảng 6).

Bảng 6. Tác dụng diệt sâu róm thông của dịch bào tử nấm Bb ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ dịch (x10 ⁸ bào tử/ml)	Tỷ lệ sâu chết (%) sau khi phun (ngày)					Nhiệt độ trung bình (°C)	Độ ẩm TB (%)
	2	3	5	7	10		
4	10,5	15,1	35,2	51,4	73,8	27,3	83,5
5	12,3	18,5	42,1	58,7	81,2		
6	18,7	24,5	48,4	60,2	88,9		

5. Hiệu quả lên bọ xít xanh (*Nezara viridula*) hại lúa

Bảng 7 chỉ ra rằng, ở nhiệt độ trung bình 25°C và độ ẩm trung bình 85%, chế phẩm bào tử nấm Bb (nồng độ 4.10⁸ - 6. 10⁸bào tử/ml) diệt được từ 47,8% đến 60,5% bọ xít xanh hại lúa, sau 21 ngày.

Bảng 7. Hiệu quả diệt bọ xít xanh của dịch bào tử nấm Bb ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ dịch (x10 ⁸ bào tử/ml)	Tỷ lệ bọ xít xanh chết (%) sau khi phun (ngày)							Nhiệt độ trung bình (°C)	Độ ẩm trung bình (%)
	2	5	7	10	15	19	21		
4	6,7	10,5	22,2	25,9	34,6	45,8	47,8	25	85
5	6,9	11,4	25,0	30,8	36,2	46,2	53,8		
6	10,3	17,9	34,1	40,7	42,3	50,2	60,5		

6. Hiệu quả lên bọ xít đen (*Scotinophora lurida*) hại lúa

Qua bảng 8 có thể thấy rằng, ở điều kiện nhiệt độ trung bình 25°C và độ ẩm trung bình 85%, chế phẩm nấm Bb với nồng độ 4.10⁸ đến 6.10⁸ bào tử/ml diệt được từ 54,2% đến 65,4% bọ xít đen hại lúa, sau 21 ngày.

Bảng 8. Hiệu quả diệt bọ xít đen của dịch bào tử nấm Bb ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ dịch (x10 ⁸ bào tử/ml)	Tỷ lệ bọ xít đen chết (%) sau khi phun (ngày)							Nhiệt độ trung bình (°C)	Độ ẩm trung bình (%)
	2	5	7	10	15	19	21		
4	6,7	11,3	18,5	26,9	38,5	44,6	54,2	25	85
5	7,2	20,7	22,5	29,7	42,3	55,6	58,3		
6	10,5	21,5	25,9	30,8	44,7	56,1	65,4		

7. Hiệu quả lên rầy nâu (*Nilaparvata lugens*) hại lúa

Ở nhiệt độ trung bình 25°C và độ ẩm trung bình 85% chế phẩm nấm Bb (nồng độ từ 4,5.10⁸ đến 6.0.10⁸ bào tử/ml) diệt được từ 65,1% đến 85,9% rầy nâu, sau 8 ngày, như nêu trong bảng 9.

Bảng 9. Hiệu quả diệt rầy nâu của dịch bào tử nấm Bb ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ dịch (x10 ⁸ bào tử/ml)	Tỷ lệ bọ xít đen chết (%) sau khi phun (ngày)							Nhiệt độ trung bình (°C)	Độ ẩm trung bình (%)
	2	3	4	5	6	7	8		
4,5	10,1	21,8	31,2	36,5	47,7	59,6	65,1	25	85
5.5	13,3	32,1	40,9	49,1	57,4	64,4	71,9		
6.0	20,7	31,7	44,6	56,0	71,8	80,4	85,9		

IV. KẾT LUẬN

Trong điều kiện phòng thí nghiệm, ở nhiệt độ trung bình 24 - 28°C, ẩm độ trung bình 84 - 86,3%, các dịch bào tử nấm Bb có nồng độ 2 x 10⁸ - 10 x 10⁸ bào tử/ml đều có khả năng rõ ràng diệt 7 loại sâu hại là sâu tơ, sâu xanh, sâu khoang hại rau, sâu róm thông hại thông, bọ xít xanh, bọ xít đen và rầy nâu hại lúa. Tỷ lệ % sâu hại bị chết tăng theo thời gian xử lý sâu và tăng theo nồng độ dịch bào tử.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hà Quang Hùng, 1998. Phòng trừ tổng hợp dịch hại cây trồng (IPM). Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Phạm Thị Nhất, 1993. Sâu bệnh hại cây thực phẩm và biện pháp phòng trừ. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Trần Huy Thọ, 1997. Một số kết quả nghiên cứu về sâu tơ và xây dựng biện pháp phòng trừ tổng hợp sâu hại họ rau thập tự. Tạp chí Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm, số 3, 117 - 120.
4. Phạm Thị Thuỳ, 1992. Một số kết quả nghiên cứu sản xuất và ứng dụng loại nấm *Metathizium* và *Beauveria* để phòng trừ rầy nâu hại lúa và sâu đo xanh hại đay 1990 - 1992. Báo cáo Khoa học về thuốc vi sinh vật - Hội nghị khoa học tại Cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật, Hà Nội 10/1992.
5. Phạm Thị Thuỳ, 1995. Kết quả ứng dụng chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* (Bb) và bước đầu sử dụng Bb để phòng trừ sâu hại kho ở Việt Nam. Tạp chí Nông nghiệp và Công nghiệp Thực phẩm, số 6 - 1995, trang 122 - 124.
6. Phạm Thị Thuỳ, 1996. Đánh giá hiệu lực của chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* trừ một số sâu hại nông nghiệp. Tuyển tập công trình nghiên cứu về biện pháp sinh học. Nhà xuất bản Nông nghiệp, trang 67 - 74.
7. Phạm Thị Thuỳ, 1997. Kết quả thử nghiệm nấm *Beauveria bassiana* trừ sâu róm thông ở Thanh Hoá năm 1996. Tạp chí Bảo vệ Thực vật, số 5, trang 21 - 33.
8. Phạm Thị Thuỳ, 1999. Kết quả ứng dụng nấm *Beauveria bassiana* để phòng trừ sâu róm thông ở Lâm trường Phù Ban Yên - Sơn La. Tạp chí nông nghiệp và Công nghiệp Thực phẩm số 3/1999, trang 119 - 121.
9. Abbott, W.S, 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18, 265 - 267.
10. Aguda, R.M, Rombach, M.C., Roberts, D.W., 1986. Infection of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal. (Homoptera delphacidae) by field application of entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina hyphomycetes). Environmental Entomology 15, 1070 - 1073.
11. Aguda, R.M., Rombach, M.C., Roberts, D.W., 1988. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina hyphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. Entomophaga 33, 315 - 324.

12. Barnett, H.L. and Barry B., 1972. Illustrated genera of imperfecti fungi. Burgess Pub. Co., 426 South sixth Street, Minnesota 55415.
13. Deacon, J.W., 1983. Microbial control of plant pests and disease. Aspects of microbiology No7. American Society for Microbiology. Washington DC.
14. Ferron, P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual reviews of entomology 23, 409 - 442.
15. Macleod, D.M., 1954. Investigation on the genera *Beauveria* and *Tritinachium*. Canadian Journal of botany 32, 818 - 891.
16. Roberts, D.W. and Yendol, W.G., 1971. Use of fungi for microbial control of insects. In Burges, H.D. and Hussey, N.W. (eds). Microbial control of insects and mites. Academic Press. London, pp. 125 - 150.
17. Ronal, M.A. and Richard B., 1987. Microbial ecology: Fundamentals and applications. The Benjamin Cummings publishing company, Inc., pp. 476 - 477.
18. Samsinakova, A., Kalacova, S., 1981. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* population. Journal of invertebrate pathology 38, 169 - 174.

SUMMARY

EFFECT OF *BEAUVERIA BASSIANA* CONIDIA SUSPENSION ON INSECTS PESTS

Entomogenous fungi are potentially important in the control of insect pest population [13, 14, 16]. *Beauveria bassiana* is one of entomogenous fungi, which have been most studied [11, 15, 17]. It has been used to control the Colorado beetle [17, 18], the brown planthopper [4, 10], the pine caterpillar [7, 8], the diamondback moth [5,6]. It also infects the corn ear worm [17].

Beauveria bassiana has also been applied in a mixed control system including the use of insect resistant plant varieties, rational farming techniques, chemical pesticides as well as microbial insecticides [1, 2, 3].

In the present investigation we report the lethal effect of *Beauveria bassiana* conidia suspension on some insect pests.

The fungus *Beauveria bassiana* was isolated from some insect pests infected naturally in the field of ThanhTri district, the suburb of Hanoi; it was identified according to Barnett and Barry [12].

All pests in these experiments were collected from rice fields or vegetable gardens in suburb of Hanoi, except the pine caterpillar, which was provided by the pinetum of SocSon, Hanoi. All of them were raised in the laboratory until the age degree of 2 or 3.

The pests were divided into lots of 20 or 30 organisms. Each lot was sprayed with fungus conidia suspension in concentrations of $2 \cdot 10^8$ - $10 \cdot 10^8$ conidia/ml. The control lot was sprayed with sterile distilled water.

The insecticide effect of conidia suspensions was calculated according to the Abbott formula [10]:

$$M(\%) = \frac{C_a - T_a}{C_a}$$

(M: mortality of insect pests, C_a : control survival rate, T_a : treatment survival rate).

The obtained maximum mortalities of pests were follows:

- The diamondback moth: 81,25% up to 8 days after treatment,
- The small cabbage white: 100% - 5 days,
- The egyptian cotton worm: 60,8% - 12 days,
- The pine caterpillar: 88,9% - 10 days,
- The green stink bug: 60,5% - 21 days,
- The black bug: 65,4% - 21 days,
- The brown planthopper: 85,9% - 8 days.

In addition, the mortilites increased with concentration of conidia suspension and with time.

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG VI SINH VẬT PHÂN GIẢI CELLULOSE TRONG CHUYỂN HOÁ NHANH RƠM RẠ LÀM PHÂN BÓN

LÊ THỊ THANH THUỶ, PHẠM VĂN TOÀN

Viện khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam

I. MỞ ĐẦU

Việt Nam là một nước nông nghiệp với gần 80% dân số sống bằng nghề nông, do vậy, phế thải nông nghiệp (rơm rạ) ngày một lớn. ở một số nơi rơm rạ được sử dụng làm chất đốt, lợp nhà, làm cơ chất nuôi trồng một số loại nấm ăn... nhưng chủ yếu chưa được sử dụng hợp lý, gây lãng phí và ô nhiễm đến môi trường như hiện tượng đốt đồng xảy ra ở Hải Dương, Đan Phượng-Hà Tây, Quảng Ngãi...

Từ thực tế trên gợi ý cho chúng tôi hướng nghiên cứu tìm ra biện pháp sản xuất phân ủ nhanh ngay trên đồng ruộng làm phân bón cho cây trồng, giúp người nông dân tận dụng nguồn phế thải một cách hợp lý và hiệu quả, góp phần xây dựng một nền nông nghiệp sạch và bền vững.

Trong bài báo này, trình bày đến việc phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải cellulose cao và thử nghiệm khả năng phân giải của các chủng lựa chọn đối với rơm rạ ở quy mô nhỏ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

-Các chủng vi sinh vật phân lập từ đất và từ các đồng ủ rơm rạ ở Văn Điển-Hà Nội, Đan Phượng-Hà Tây.

-Rơm rạ sau thu hoạch ở Vĩnh Quỳnh-Văn Điển-Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

-Phương pháp phân lập vi sinh vật phân giải cellulose (TCVN 6168-1996).

-Phương pháp xác định hoạt tính CMC-aza (Williams, 1983)

-Phương pháp xác định mật độ vi sinh vật (CFU/ml) (phương pháp Koch).

-Phương pháp đánh giá độ chín của phân ủ (Subrao-indian, 1980).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có hoạt tính phân giải cellulose

Từ đất và các đồng ủ rơm rạ đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn, 3 chủng xạ khuẩn và 10 chủng nấm sợi có khả năng phát triển tốt trên nguồn cơ chất giấy lọc.

Trong đó, đã tuyển chọn được 3 chủng TN6, TN9, TX3 có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Khả năng phân giải cellulose của các chủng phân lập

STT	Ký hiệu	Nhóm VSV	Hoạt tính CMC aza (R-r,mm)	Tỷ lệ % giảm trọng lượng sau 1 tháng ủ (g)
1	TV1	Vi khuẩn	3,0	8,3
2	TV2	Vi khuẩn	3,5	10,0
3	TV3	Vi khuẩn	4,5	11,7
4	TX1	Xạ khuẩn	7,0	11,3
5	TX2	Xạ khuẩn	7,0	20,0
6	TX3	Xạ khuẩn	<u>8.5</u>	<u>23,3</u>
7	TN1	Nấm	4.0	15,0
8	TN2	Nấm	7,0	23,3
9	TN3	Nấm	5,0	20,0
10	TN4	Nấm	4.5	18,3
11	TN5	Nấm	5.0	16,7
12	TN6	Nấm	<u>15.0</u>	<u>33,3</u>
13	TN7	Nấm	5.5	15,0
14	TN8	Nấm	7.5	25,0
15	TN9	Nấm	<u>14.0</u>	<u>30,0</u>
16	TN10	Nấm	7.0	21,7

Qua bảng thấy: Chủng TN6 có hoạt tính CMC aza cao nhất, tiếp đến là TN9, TX3. Chủng TN6 và TN9 là 2 chủng nấm có khả năng làm giảm trọng lượng rơm lúa cao nhất. Sau 30 ngày giảm 30-33%. Từ kết quả thu được, giữ lại 3 chủng TN6, TN9, TX3 làm đối tượng nghiên cứu tiếp.

3.2. Một số đặc điểm hình thái tế bào, khuẩn lạc của các chủng lựa chọn.

Sau khi tuyển chọn được 3 chủng TX3, TN6, TN9 chúng tôi sơ bộ tiến hành đánh giá một số đặc điểm hình thái tế bào khuẩn lạc.

-TX3: Khuẩn lạc có dạng đường tròn đồng tâm, bề mặt hơi gồ ghề, khuẩn ty cơ chất màu nâu đất, khuẩn ty khí sinh lúc non màu xanh xám, lúc già màu nâu đen, không tiết sắc tố vào môi trường nuôi cấy, khuẩn lạc có mùi hắc, cuống sinh bào tử có dạng xoắn.

-TN6: Khuẩn lạc có dạng xấp mịn, đường kính 4x4,5cm. Màu khuẩn ty dinh dưỡng vàng nâu, màu khuẩn ty mang bào tử lúc non màu trắng, lúc già màu xanh, tiết sắc tố màu vàng nhạt vào môi trường nuôi cấy, khuẩn lạc có mùi hôi, cuống sinh bào tử có dạng cành nhánh.

-TN9: Khuẩn lạc có dạng xấp mịn, đường kính 3,7x4,2cm. Màu khuẩn ty dinh dưỡng vàng cam, màu khuẩn ty mang bào tử lúc non màu xi măng, lúc già màu xanh, tiết sắc tố màu nâu đỏ vào môi trường nuôi cấy, khuẩn lạc có mùi hôi, cuống sinh bào tử có dạng cành nhánh.

3.3. ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự sinh trưởng phát triển của các chủng lựa chọn

3.3.1 pH ban đầu

Xét điều kiện môi trường nuôi cấy có pH từ 4 đến 8 (sử dụng NaOH và H₂SO₄ để điều chỉnh) khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng lựa chọn sau 48h ở các điều kiện pH khác nhau thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3

Ảnh hưởng của pH đến khả năng phát triển của các chủng lựa chọn.

pH	Chủng TN6	Chủng TN9	Chủng TX3
4	+++	+++	-
5	++	+++	-
6	++	++	++
7	+	+	+++
8	+	++	+

Ghi chú: -: không phát triển

+: phát triển yếu

++: phát triển trung bình

+++: phát triển mạnh

Từ kết quả trên thấy: Trong ở mỗi khoảng pH khác nhau thì các chủng biểu hiện khả năng sinh trưởng phát triển khác nhau. Sau khoảng thời gian nuôi cấy 48^h thì chủng TN6 phát triển mạnh nhất ở khoảng pH từ 4-6, chủng TN9 cũng phát triển mạnh ở khoảng pH 4-6, chủng TX3 phát triển mạnh nhất ở pH 6-7.

3.3.2 Nhiệt độ nuôi cấy

Nuôi cấy VSV ở những nhiệt độ khác nhau 15^oC, 30^oC, 45^oC khả năng sinh trưởng của các chủng lựa chọn sau 48h ở các nhiệt độ khác nhau kết quả thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phát triển của các chủng lựa chọn

Nhiệt độ (°C)	Chủng TN6	Chủng TN9	Chủng TX3
15	-	-	-
30	++	++	++
45	+++	+++	+++

Ghi chú: -: không phát triển

+: *phát triển yếu*

++: *phát triển trung bình*

+++: *phát triển mạnh*

Từ kết quả trên thấy: Sau thời gian nuôi cấy 48 giờ cả 3 chủng đều phát triển tốt ở khoảng nhiệt độ 30-45^oC và phát triển mạnh nhất ở nhiệt độ 45^oC. Có nghĩa là 3 chủng này thuộc nhóm ưa nhiệt.

3.3.3 Cường độ thông khí

Nuôi cấy các chủng VSV trên các môi trường thích hợp, ở 2 chế độ nuôi cấy: nuôi cấy tĩnh (tủ ấm 45^oC) và nuôi cấy lắc (máy lắc Gallenamp 80^v/phút). Sau 24^h, 48^h, 72^h kiểm tra mật độ (TB/ml) của các chủng. Kết quả được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5

Ảnh hưởng của cường độ thông khí đến khả năng phát triển của các chủng lựa chọn.

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Mật độ vi sinh vật (CFU/1ml) của các chủng					
	TX3		TN6		TN9	
	Nuôi cấy tĩnh	Nuôi cấy lắc	Nuôi cấy tĩnh	Nuôi cấy lắc	Nuôi cấy tĩnh	Nuôi cấy lắc
24	$6,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$
48	$1,4 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^7$	$8,4 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$
72	$5,2 \cdot 10^9$	$4,6 \cdot 10^{10}$	$2,0 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^{10}$	$2,0 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^{11}$

Qua bảng thấy rằng: ở điều kiện nuôi cấy lắc (tạo điều kiện tăng nồng độ ôxi trong bình nuôi cấy) sau 48h, 72h, mật độ VSV của 3 chủng TX3, TN6, TN9 đều cao hơn so với điều kiện nuôi cấy tĩnh, chứng tỏ các chủng VSV này là chủng hiếu khí.

3.3.4. Thử nghiệm khả năng phân giải cellulose của các chủng lựa chọn trên đồng ủ rơm rạ

Chúng tôi tiến hành ủ đồng ủ rơm rạ bằng phương pháp ủ quy mô nhỏ:

- ủ trong hộp xếp có thông khí, có đảo trộn.
- Rơm rạ độ ẩm 15%
- Bổ sung: 1% urê, 5% supe phot phat, 3% vôi và 1% dịch nuôi cấy vi sinh vật với mật độ 10^8 - 10^9 .
- Điều chỉnh độ ẩm 50-60%.

Sau 1 tháng ủ tiến hành theo dõi:

Sự thay đổi thành phần hoá học của các mẫu ủ sau khi ủ 1 tháng

Tiến hành phân tích các chỉ tiêu C tổng số, N, P_2O_5 , K_2O của mẫu trước và sau ủ 1 tháng (số liệu phân tích tại Bộ môn hoá học đất và môi trường -Viện KHKTNN Việt Nam và Trường đại học Nông nghiệp I-Hà Nội). Kết quả được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6

Hàm lượng C tổng số, N, P, K trong các mẫu ủ

Chỉ tiêu đánh giá (%)	Trước ủ	Sau quá trình ủ				
		Nhiễm TX3	Nhiễm TN6	Nhiễm TN9	Nhiễm hỗn hợp TX3+TN6+TN9	Không bổ sung VSV
$C_{\text{tổng số}}$	50,5	38,2	35,9	35,4	33,9	48,2
N	0,77	0,92	0,90	0,85	0,92	0,85
P_2O_5	0,23	0,33	0,36	0,33	0,38	0,30
K_2O	0,21	0,38	0,28	0,33	0,35	0,25

Qua kết quả bảng trên, ta thấy hàm lượng N, P, K trong mẫu ủ có bổ sung giống vi sinh vật đều cao hơn so với mẫu ủ không bổ sung vi sinh vật. C tổng số trong các mẫu ủ có bổ sung giống vi sinh vật thấp hơn mẫu ủ không bổ sung vi sinh vật. Chứng tỏ trong quá trình ủ, việc bổ sung giống VSV với nguồn dinh dưỡng bổ sung thích hợp tạo cho sản phẩm ủ có chất lượng tốt hơn so với việc ủ không bổ sung VSV.

Một số chỉ tiêu khác so sánh giữa mẫu ủ có bổ sung vi sinh vật phân giải cellulose và mẫu ủ không bổ sung vi sinh vật.

Kết quả thể hiện qua bảng 7

Bảng 7

Một số chỉ tiêu theo dõi khác

Chỉ tiêu	Mẫu ủ	
	Bổ sung vi sinh vật	Không bổ sung vi sinh vật
-Nhiệt độ đồng ủ trong tuần 1,2	Tăng cao hơn	Thấp hơn
-Nhiệt độ đồng ủ trong những tuần sau	Thấp hơn	Cao hơn
-Nước rác chảy ra	ít hơn	Nhiều
-Độ giảm chiều cao đồng ủ	40cm	20cm
-Màu sắc của rơm rạ	Nâu sẫm	Nâu nhạt
-Độ dai của rơm	Sợi mềm, mủn	Sợi mềm, hơi mủn
-Thời gian ủ trung bình	30 ngày	65 ngày

Từ những kết quả trên, thấy rằng việc bổ sung vi sinh vật vào đồng ủ có hiệu quả hơn ủ nhờ vi sinh vật tự nhiên có trong đồng ủ: rút ngắn thời gian ủ, cũng như giảm ô nhiễm môi trường gây ra do kéo dài thời gian ủ.

Đánh giá độ chín của phân ủ

Sử dụng phương pháp thử nghiệm đối với cây trồng là một trong những phương pháp để đánh giá nhanh độ chín của phân ủ. Chúng tôi tiến hành gieo 5g hạt cải ngọt trên khay chứa 1 lượng phân sau khi đã ủ 1 tháng. Sau 5 ngày thu hoạch cải và kiểm tra trọng lượng tươi của rau thu được. Mức độ chín của phân ủ được đánh giá thông qua tỷ lệ nảy mầm, sống của rau, trọng lượng tươi trên mỗi khay. Nếu đạt 60-100g/1 khay chứng tỏ phân ủ là chín, nếu không đạt thì là phân ủ chưa chín. Kết quả được trình bày qua bảng 8.

Bảng 8

Trọng lượng tươi của rau cải sau 5 ngày trồng trên phân ủ từ rơm rạ

STT	Mẫu	Trọng lượng khô của rau cải thu được (g)
1	Nhiễm TX3	75
2	Nhiễm TN6	100
3	Nhiễm TN9	100
4	Nhiễm hỗn hợp	120
5	Không bổ sung VSV	50

Kết quả bảng 8 cho thấy ở các mẫu bổ sung giống VSV phân ủ đã chín. ở mẫu nhiễm hỗn hợp cho kết quả là 120g cao hơn mẫu nhiễm TN6 và TN9 là 20g, cao hơn TX3 là 45g và đặc biệt cao hơn mẫu không bổ sung VSV là 70g.

III. KẾT LUẬN

Từ đất và từ đồng ủ rơm rạ đã tuyển chọn được ba chủng vi sinh vật TX3, TN6, TN9 có hoạt tính CMC aza cao nhất.

Đã xác định được điều kiện sinh trưởng phát triển thích hợp như:

- pH môi trường cho TX3 là 6-7

TN6 là 4-6

TN9 là 4-6

- Khoảng nhiệt độ nuôi cấy thích hợp nhất cho ba chủng là 30-45°C
- Ba chủng đều là vi sinh vật hiếu khí

Có thể sử dụng ba chủng TX3, TN6, TN9 (đặc biệt là hỗn hợp chủng) trong xử lý rơm rạ làm phân bón.

TÓM TẮT

Từ đất và các đồng ủ rơm rạ-Bộ môn Vi sinh vật - Viện khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn, 3 chủng xạ khuẩn và 10 chủng nấm sợi có khả năng phân giải cellulose. Trong đó, tuyển chọn được 3 chủng TX3, TN6, TN9 có hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất.

Chúng tôi đã xác định được điều kiện sinh trưởng thích hợp cho 3 chủng nghiên cứu và tiến hành thử nghiệm khả năng phân giải của các chủng lựa chọn đối với rơm rạ ở quy mô nhỏ.

Kết quả cho thấy 3 chủng vi sinh vật đều có khả năng phân giải rơm rạ. Trong đó TN6 là chủng có khả năng phân giải mạnh nhất.

ABSTRACT

INITIALLY STUDY OF ABILITY TO USE CELLULOLYTIC MICROORGANISM IN THE RAPID TRANSFORMATION OF STRAW INTO FERTILIZER

LE THI THANH THUY, PHAM VAN TOAN

Vietnam Agricultural Science Institute (VASI)

Ten strains of fungi, three strains of actinomyces and three strains of bacterium have been isolated from soil and compost. Selected three strains TX3, TN6, TN9 with highest cellulose activity.

The effects of growth such as temperature, pH, oxygen concentration, were investigated for three strains of microorganism for selection.

The results of studying on decomposition ability of the selected strains towards the straw in a small scale showed TN6 which have highest straw decomposing ability, Can use three strains of microorganism in the rapid transformation of straw into fertilizer.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng và các tác giả, 1978. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập II. NXB khoa học kỹ thuật, Hà Nội.
2. Egorob, N.X. 1983. Thực tập vi sinh vật học (Nguyễn Lâm Dũng dịch). NXB Mir. 118-123.
3. Nguyễn Đức Lượng. 1995. Nghiên cứu, tuyển chọn nấm mốc sinh tổng hợp cellulose cao để xử lý các chất thải hữu cơ chứa cellulose. Luận án phó tiến sỹ khoa học. Đại học Bách khoa, Hà Nội.
4. Gauze, G.F, T.P. Preobraenskaja; M.A.Svetnhicova; L.P.Terekhova; T.S. Maximova. *Opredelitel actinomycetov*. Izd.Nauka. Moskva. 1983.
5. Tendler, M.D. 1959. Studies on thermophilic Actinomycetes Bull Torrey B.t. Club, 56: 71-74.
6. Swarooba Rani, 1996. Enzyme and microbial technology, Jan 1996, 1-80.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CẢI TIẾN CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (M.A) ĐỂ PHÒNG TRỪ BỌ HẠI DỪA Ở BẾN TRE NĂM 2000.

PHẠM THỊ THUYẾT, ĐỒNG THỊ THANH

TRẦN THỊ TUYẾT, PHẠM VĂN NHẠ

Viện Bảo vệ thực vật

I- ĐẶT VẤN ĐỀ:

Trong những năm gần đây, chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* là chế phẩm sinh học đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới cũng như ở nước ta quan tâm nghiên cứu. Ở nhiều nước thuộc châu úc và châu Phi... nấm M.a được nghiên cứu ở mức công nghệ cao và chúng được sử dụng rất phổ biến để phòng trừ cào cào, châu chấu và một số bọ cánh cứng khác... ở Việt Nam từ năm 1990 đến nay, Viện Bảo vệ thực vật cũng nghiên cứu về loại nấm này với mục đích sản xuất và ứng dụng chế phẩm nấm để phòng trừ một số sâu hại đạt kết quả như châu chấu, rầy nâu.

Để nâng cao hơn nữa chất lượng của chế phẩm nấm M.a trên cơ sở tiết kiệm một phần nguyên liệu, năm 2000 chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu cải tiến một số môi trường nuôi cấy và phương pháp nghiên tạo thành dạng chế phẩm tinh. Nhằm ứng dụng phòng trừ bọ hại dừa ở Bến Tre, đây là loại côn trùng lạ mới xuất hiện trong những vùng dừa ở phía Nam mà thuốc hoá học khó phòng trừ.

Nội dung báo cáo này chúng tôi trình bày những kết quả đạt được.

II- NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

2.1. Nghiên cứu cải tiến công nghệ sản xuất chế phẩm nấm M.a:

Vật liệu:

Chủng nấm M.a trên rầy nâu

Các hoá chất: Agar, Pepton, Glucose, muối khoáng và bột ngô, cám ngô, trấu...

Phương pháp nghiên cứu:

2.1.1. Nghiên cứu khả năng phát triển của nấm M.a trên môi trường cấp 1 giảm Pepton và Glucose.

Với mục đích có thể tiết kiệm được một số nguyên liệu đắt tiền, chúng tôi tiến hành thí nghiệm với 3 công thức sau:

MT1: Môi trường nuôi cấy chuẩn thường dùng là Sabouraud khoáng chất.

MT2: Môi trường giảm 5 gr Pepton và 10 gr Glucose trong 1 lít.

MT3: Môi trường giảm 10 gr Pepton và 20 gr Glucose trong 1 lít.

Phương pháp: Khử trùng môi trường, đổ vào đĩa Petri để nguội và cấy nấm M.a theo phương pháp cấy điểm, mỗi công thức nhắc lại 3 lần.

Chỉ tiêu theo dõi hàng ngày:

Đo đường kính khuẩn lạc

Đếm số bào tử/1 cm² theo phương pháp buồng đếm hồng cầu

So sánh đánh giá

2.1.2. Nghiên cứu cải tiến môi trường sản xuất tạo chế phẩm:

Bố trí thí nghiệm với 4 công thức sau:

CT1: Môi trường sản xuất cũ chỉ gồm cám gạo và bột ngô với tỷ lệ: Cám gạo 70%, bột ngô 30%.

CT2: Bổ sung trấu 10%

CT3: Bổ sung trấu 15%

CT4: Bổ sung trấu 20%

Phương pháp: Mỗi công thức nhắc lại 3 lần, khử trùng môi trường cấy nấm M.a, nuôi cấy trong 5 ngày sau đó đem sấy khô và kiểm tra số lượng bào tử trong 1 gr chế phẩm. So sánh kết quả giữa các công thức để tìm ra tỷ lệ trấu thích hợp nhất.

2.1.3. Nghiên cứu phương pháp sấy chế phẩm để đạt hiệu quả cao và bảo quản được lâu dài:

Trước khi sấy 1-2 ngày chúng tôi đưa nấm ra rải trên khay với bề dày sinh khối nấm chỉ 3-5 cm để tiếp tục nấm hình thành số bào tử cực đại sau đó mới tiến hành sấy chế phẩm ở nhiệt độ 50°C với 4 công thức:

CT1: Theo dõi trong 3 giờ

CT2: Theo dõi trong 4 giờ

CT3: Theo dõi trong 5 giờ

CT4: Theo dõi trong 6 giờ

Phương pháp: Cứ sau 30 phút lại đảo chế phẩm một lần và kiểm tra độ thuỷ phân bằng công thức:

G1-G2

$W = \frac{\text{-----}}{\text{-----}} \times 100$

G1-G0

Trong đó:

W: Độ thuỷ phân của chế phẩm (%)

G0: Trọng lượng của hộp nhôm có nắp khi chưa có mẫu (gr).

G1: Trọng lượng của hộp nhôm có nắp khi mẫu chưa sấy (gr)

G2: Trọng lượng của hộp nhôm có nắp khi mẫu đã sấy (gr)

Đếm số lượng bào tử trong 1 gr, từ đó rút ra được công thức tối ưu cho chất lượng chế phẩm và độ thuỷ phân phù hợp để bảo quản được lâu dài.

2.1.4. Nghiên cứu chế phẩm bằng máy tạo bột mịn:

Kiểm tra lại trước khi bảo quản:

Số bào tử/1 gr chế phẩm.

Thử hoạt lực sinh học của nấm trên sâu tơ và sâu xanh bướm trắng hại rau.

2.2. ứng dụng chế phẩm nấm M.a trừ bọ hại dừa ở Bến Tre:

Vật liệu:

- Chế phẩm *Metarhizium anisopliae* được phân lập từ chủng nấm trên bọ dừa do Viện Bảo vệ thực vật sản xuất.
- Chất bám dính Agral của Nhật (0,1%).
- Thuốc Padan 95SP (0,05%)
- Bọ hại dừa được thu thập trên dừa ở một số huyện của tỉnh: Bến Tre, Thị xã, Châu Thành, Giồng Trôm và Mỏ Cày.

Phương pháp nghiên cứu:

2.2. 1. Thử nghiệm trong phòng và trong lồng lưới (ấu trùng và trưởng thành): Tại Chi Cục Bảo vệ thực vật Bến Tre.

Bố trí thí nghiệm: Gồm 4 công thức.

CT1: Đối chứng không phun

CT2: Phun Padan 95SP 0,05%

CT3: Phun riêng nấm M.a 2×10^7 bt/ml

CT4: Phun nấm M.a + bám dính Agral 0,1%

Phương pháp:

- Thí nghiệm trong phòng: Mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 con (ấu trùng và trưởng thành), thức ăn là bẹ lá dừa non.

- Thí nghiệm trong lồng lưới: Mỗi công thức là 200 con/lồng cả ấu trùng và trưởng thành, thức ăn là cả tàu dừa non.

- Phương pháp pha dịch phun: Cho nấm vào trong chậu nước, lọc qua vải thô, lấy dịch bào tử, trước khi phun cho thêm chất bám dính 0,1% lắc đều và phun.

Chỉ tiêu theo dõi hàng ngày:

- Số sâu chết
- Số sâu mọc nấm trở lại
- Thay thức ăn và điều kiện ôn ẩm độ

Hiệu quả được tính theo công thức Abbott (1925)

2.2.2. Thí nghiệm ngoài đồng ruộng:

Đợt 1: Thí nghiệm trên diện hẹp từ 19/7-29/7 tại 3 điểm: Thị xã, huyện Châu Thành, Mỏ Cày. Mỗi điểm phun là 1,0 ha.

Bố trí 2 công thức:

CT1: Đối chứng không phun (mỗi nơi 0,2 ha)

CT2: Phun chung một nồng độ 2.0×10^{12} bào tử/ha + 0,1% Agral + 0,05% Padan ở cả 3 địa điểm.

Đợt 2: Thí nghiệm trên diện rộng từ 3/8-20/9/2000

Địa điểm thí nghiệm: Xã Tam Phước huyện Châu Thành, phường Phú Khương-Thị xã.
 Mỗi địa điểm phun 25 ha.

Bố trí 5 công thức:

CT1: Đối chứng không phun

CT2: Phun nấm M.a 2×10^{12} bt/ha + Agral 0,1% + Padan 95SP 0,05%

CT3: Phun nấm M.a 2×10^{12} bt/ha + Agral 0,1%

CT4: Phun riêng nấm M.a 2×10^{12} bt/ha

CT5: Phun riêng Padan 95SP 0,05%

Phương pháp điều tra chung: Mỗi điểm 3 cây, điều tra trước và sau phun 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 ngày. Mỗi cây dứa phun 1-2 lít chế phẩm, treo lên dứa phun, một số chỗ không có nhà thì phun bằng bình động cơ.

Phương pháp: Chặt nõn dứa mang về nhà đếm tổng số bọ dứa chết, tổng số bọ dứa mọc lại năm.

Phương pháp pha phun như thí nghiệm trong phòng và lồng lưới.

Hiệu quả được tính theo công thức Henderson Tillton (1955)

$$\text{Thu mẫu tính tỷ lệ \% nấm mọc} = \frac{\text{Tổng số nấm mọc trên bọ dứa}}{\text{Tổng số bọ dứa thu được}} \times 100$$

III- KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU:

3.1. Nghiên cứu cải tiến công nghệ sản xuất nấm M.a:

3.1.1. Nghiên cứu khả năng phát triển của nấm M.a trên môi trường cấp 1 có giảm một lượng Pepton và Glucose:

Quá trình nghiên cứu nhiều năm chúng tôi thấy nấm M.a dễ phát triển có thể mọc trên một số loại cơ chất, vì vậy chúng tôi thấy cần tiết kiệm nguyên liệu trong quá trình sản xuất nhanh thì có thể giảm đi một lượng thành phần dinh dưỡng trên môi trường cấp 1 như Pepton và Glucose mà không ảnh hưởng nhiều đến sự phát triển của nấm. Như phần phương pháp đã trình bày. Kết quả nghiên cứu thu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Khả năng phát triển của nấm M.a trên môi trường Sabouraud khoáng chất có giảm Pepton và Glucose sau 10 ngày nuôi cấy.

TT	Tên môi trường	Đường kính khuẩn lạc (cm)	Số lượng bào tử ($\times 10^8$ bt/1cm ²)	Điều kiện thí nghiệm
1	MT1	5,9 ± 0,05	5,5 ± 0,1	pH = 6
2	MT2	5,8	5,3	T: 27,5
3	MT3	5,6	5,1	H = 85,1%

Qua bảng 1 chúng tôi nhận xét: Nấm M.a vẫn phát triển tốt trên cả 3 môi trường trong cùng một điều kiện thí nghiệm. môi trường 2 so với môi trường 1 có sự chênh lệch tương đối ít, còn môi trường 3 có chênh lệch nhưng không đáng kể. Xem xét khả năng mọc của nấm

vấn đạt tiêu chuẩn để đưa vào sản xuất.

Từ kết quả trên chúng tôi rút ra kết luận một lít môi trường có thể giảm lượng Pepton giao động từ 5-10 gr, Glucose từ 10-20 gr mà không ảnh hưởng nhiều đến tốc độ phát triển của M.a. Như vậy để sản xuất nấm với khối lượng lớn chúng ta có thể hạ giá thành được vài nghìn đồng/l lít môi trường.

3.1.2. Nghiên cứu cải tiến môi trường sản xuất nấm M.a:

Đây là loài vi nấm hiếu khí, ngoài chất dinh dưỡng ra chúng còn cần đến độ thông khí để hình thành bào tử. Môi trường cũ gồm cám gạo, bột ngô tuy đảm bảo chất dinh dưỡng song không đủ tạo ra độ thoáng, độ tối xốp cho nấm mọc cho nên cần thêm trấu, nguyên liệu có thể tạo ra điều kiện thông thoáng để nấm phát triển, đồng thời có thể tiết kiệm được nguyên liệu trong quá trình sản xuất lớn. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2

Khả năng hình thành bào tử của nấm M.a trên các môi trường sản xuất có bổ sung trấu sau 7 ngày nuôi cấy.

CT	Môi trường sản xuất (%)	Lượng trấu bổ sung (%)	Số lượng bào tử/gr (x 10 ⁹)	t° (C), H (%)
1	100	0	4,9 ± 0,1	2,7 87
2	90	10	5,9	
3	85	15	4,5	
4	80	20	2,1	

Kết quả ở bảng 2 cho thấy: Số lượng bào tử M.a hình thành có tăng đáng kể, ở công thức 2 đạt là 5,9 x 10⁹ bt/gr so với công thức 1 đạt 4,9 x 10⁹ bt/gr. Vậy nếu thêm một lượng trấu thích hợp (10%) không những chúng ta có thể tiết kiệm được một lượng ngô và cám thay vì trấu mà còn làm tăng chất lượng của chế phẩm. Tuy nhiên nếu thêm quá nhiều trấu từ 15% trở lên môi trường không đảm bảo được chất dinh dưỡng số lượng số lượng bào tử nấm trong 1 gr chế phẩm lại giảm xuống thấp hơn môi trường 1. Như vậy môi trường sản xuất có bổ sung 10% trấu là thích hợp, có thể sử dụng kết quả này vào trong quy trình sản xuất nấm M.a.

3.1.3. Nghiên cứu thời gian sấy tối ưu để bảo quản chế phẩm nấm M.a:

Để chế phẩm nấm có thể sử dụng được lâu dài, điều cần thiết là phải sấy khô để bảo quản chúng, nhưng sấy ở nhiệt độ nào và thời gian như thế nào để không ảnh hưởng đến bào tử nấm, chế phẩm nấm có độ thủy phân thấp không gây mốc trong quá trình bảo quản chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm sấy nấm ở nhiệt độ 50°C, theo dõi ở các ngưỡng thời gian trong 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ. Kết quả thu được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3

Ảnh hưởng của thời gian sấy đến chất lượng chế phẩm nấm M.a.

CT	Thời gian sấy	P _{mẫu tươi} (gr)	P _{mẫu khô} (gr)	Số lượng bt/gr (x 10 ⁹)	Độ thủy phân (%)
1	3	600	402	4,9 ± 0,1	18
2	4	600	391	5,7	12
3	5	600	382	5,9	10
4	6	600	367	4,7	8

Qua bảng 3, chúng tôi nhận thấy nếu sấy dưới 4 giờ thì độ thủy phân trong chế phẩm còn cao và số lượng bào tử/1 gr còn thấp, khi bảo quản dễ bị các nấm hoại sinh như Penicillium, Aspegillus... thực tế những nấm trước cho thấy nếu sấy không đảm bảo độ thủy phân, chế phẩm chỉ giữ khoảng 3 tháng là bị mốc và dính kết lại với nhau. Còn khi sấy trong

khoảng từ 4-5h chế phẩm M.a cho số lượng bào tử cao hơn, mặt khác ở độ thuỷ phân này chế phẩm giữ trong điều kiện bình thường được lâu hơn khoảng 9 tháng đến 1 năm.

Còn khi sấy > 5h độ thuỷ phân thấp có thể đảm bảo không cho sự xâm nhập của các vi sinh vật khác nhưng số lượng bào tử/1 gr chế phẩm lại giảm đi do sấy quá lâu bào tử có thể bị chết. Từ những nhận xét trên, chúng tôi kết luận sấy chế phẩm ở 50°C trong khoảng 4-5h là thích hợp nhất.

Chế phẩm sau khi sấy cho vào máy nghiền, sẽ được chế phẩm dạng bột màu xanh đều. Kiểm tra lại số bào tử trong 1 gr chế phẩm đạt $5,9 \times 10^9$ bt. Như vậy số bào tử thất thoát trong quá trình nghiền là không đáng kể. Chế phẩm đã được nghiền thì chỉ việc hoà vào nước và lọc qua một lớp vải thô là có thể sử dụng được. Chế phẩm tạo ra chúng tôi đã thí nghiệm lại trên sấu tơ và sấu xanh bướm trắng hại rau để xác định hoạt lực của chúng, kết quả thu được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4

Hiệu lực của chế phẩm nấm M.a trừ sấu tơ và sấu xanh bướm trắng.

Loại sấu TN	Nồng độ TN ($\times 10^8$ bt/ml)	Tỷ lệ (%) sấu chết sau các ngày thí nghiệm				to (C) TB	H (%) TB
		1	3	5	8		
Sấu tơ	4	5,0	25,0	33,5	55,8	27,6	84,1
	8	15,0	30,0	45,0	79,2		
Sấu xanh bướm trắng	4	15,0	60,0	80,3	90,3	28,5	85,4
	8	20,0	68,5	85,7	95,5		

Qua bảng 4 chúng tôi rút ra nhận xét là chế phẩm M.a mới sản xuất có hiệu quả cao đối với sấu tơ và sấu xanh bướm trắng hại rau. ở nồng độ càng cao 8×10^8 bt/ml thì hiệu quả chết của sấu càng cao, sau 8 ngày tỷ lệ chết của sấu tơ đạt 79,2% và tỷ lệ chết của sấu xanh chết 95,5%, theo dõi số sấu chết ở các nồng độ trên có thể ẩm, chúng tôi thấy thấy số sấu chết có mọc nấm trở lại đối với sấu tơ là 40% và sấu xanh là 45%.

3.2. Kết quả ứng dụng chế phẩm nấm M.a trừ bọ hại dưa:

3.2.1. Thí nghiệm trong phòng và trong lồng lưới:

Như phần phương pháp đã trình bày về cách bố trí thí nghiệm trong phòng tại Chi Cục Bảo vệ thực vật Bến Tre. Kết quả thử nghiệm chúng tôi trình bày ở bảng 5.

Bảng 5

Hiệu quả của chế phẩm nấm M.a đối với bọ hại dưa

(Thí nghiệm trong phòng từ 18/7-25/7/2000).

Công thức thí nghiệm	Loại thuốc	Nồng độ thí nghiệm	Tỷ lệ (%) bọ hại dưa chết sau các ngày thí nghiệm			
			2	3	5	7
Ấu trùng	Nấm M.a	2×10^7 bt/ml	57,0	100,0	Bắt đầu	Mọc nấm
	+ Agral	+ 0,1%			mọc nấm	60%
Trưởng thành	Karate	0,1%	100,0			
	M.a	2×10^7 bt/ml	50,0	64,0	85,0	100,0
	M.a +	2×10^7 bt/ml	61,0	85,0	100,0	mọc nấm
	Agral	0,1%				75%

Kết quả ở bảng 5 cho thấy nấm M.a có hiệu quả cao với bọ dưa khi thí nghiệm trong phòng với dụng cụ trong bình tam giác, chỉ sau 3 ngày phun nấm với bóm dính Agral của Nhật, ấu trùng bọ dưa chết 100% so với đối chứng và với trưởng thành, nếu dùng riêng công thức nấm M.a với nồng độ 2×10^7 bt/ml sau 5 ngày tỷ lệ bọ dưa chết đạt 100% và 75% nấm mọc lại. Công thức phun hoá học Karate 0,1% chỉ sau 2 ngày chết 100%. Như vậy là thí nghiệm bước đầu khẳng định nấm M.a của Viện Bảo vệ thực vật có hiệu quả với bọ dưa. Từ kết quả trong phòng

chúng tôi triển khai thí nghiệm ngay trong nhà lưới. Kết quả thí nghiệm chúng tôi thu được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6
Hiệu lực của chế phẩm nấm M.a với bọ hại dừa
(Thí nghiệm trong lồng lưới với nồng độ 2×10^7 bt/ml)

Đợt thí nghiệm	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ (%) bọ dừa chết sau các ngày thí nghiệm				
		1	2	3	5	7
Đợt 1 từ 18/7-24/7 M.a + Agral (0,1%)	ấu trùng	50,0	80,0	90,0	100,0	
	Trưởng thành	40,0	51,0	84,0	95,0	100,0
nấm M.a trừ bọ dừa trên diện rộng (Thí nghiệm tháng						
Đợt 2 từ 20/7-26/7 Riêng M.a	ấu trùng	0	0	0	45	60
	Trưởng thành	0	0	0	35	50

Kết quả ở bảng 6 cho thấy: Thí nghiệm trong lồng lưới khi cho thêm bóm dính Agral 0,1% thì chế phẩm nấm M.a có hiệu quả cao với ấu trùng và trưởng thành, sau 5 ngày thí nghiệm thì số ấu trùng chết 100% so với đối chứng và sau 7 ngày trưởng thành cũng chết 100%, điều quan trọng là sau 7 ngày thấy hiện tượng nấm mọc lại trên các bọ dừa đã chết. Theo chúng tôi thì điều kiện khí hậu ở Bến Tre rất thuận lợi cho nấm ký sinh và phát triển, ở nhiệt độ trung bình trong cả đợt thí nghiệm là $27,0^{\circ}\text{C}$ và ẩm độ lý tưởng gần 90%. Riêng công thức phun nấm M.a ở nồng độ 2×10^7 bt/ml thì nấm tác động chậm hơn sau 3-5 ngày mới ký sinh và sau 7 ngày tỷ lệ bọ dừa chết 50-60%. Điều này cho thấy vai trò của chất bóm dính rất quan trọng để nâng cao hiệu quả phòng trừ của chế phẩm nấm M.a và tỷ lệ nấm mọc lại ngay trên bọ dừa rất cao. Số liệu thí nghiệm của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu ở Đài Loan năm 1997.

3.2.2. Thử nghiệm ngoài đồng ruộng:

Như phần đặt vấn đề chúng tôi có nêu diện tích dừa bị hại nặng do bọ dừa tập chung ở một số nơi như thị xã Bến Tre, huyện Châu Thành, Giồng Trôm và Mỏ Cày. Từ kết quả thí nghiệm trong phòng và trong lồng lưới, chúng tôi bố trí thí nghiệm ứng dụng chế phẩm nấm M.a vào hai đợt:

Đợt 1: Trong tháng 7 ở 3 địa điểm. Kết quả thử nghiệm đợt 1 được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7
Hiệu quả phòng trừ của nấm M.a tại Bến Tre

(Thí nghiệm đồng ruộng với nồng độ $2,5 \times 10^{12}$ bt/ha + 0,1% Agral + 0,05% Padan).

Địa điểm phun	Hiệu quả phòng trừ (%) sau các ngày thí nghiệm					t. H (%) TB
	2	3	5	7	10	
Phú Khương-Thị xã	37,0	48,5	51,0	70,0	78,0	26,5
Thanh Tân-Mỏ Cày	23,0	40,0	40,0	65,0	69,0	87,7
Phước Thành-Châu Thành	31,0	50,0	65,0	75,0	80,0	

Số liệu ở bảng 7 cho thấy trong thí nghiệm đồng ruộng, nấm M.a bước đầu cũng có hiệu quả với bọ dừa ở Bến Tre. Sau 5 ngày phun nấm ở cả 3 địa điểm đều bắt đầu cho hiệu quả và sau 7-10 ngày phun đều thấy có hiện tượng bọ dừa chết có nấm mọc lại ngay trên lá dừa. Tỷ lệ

bọ dừa chết đạt 65,0-80,0% và tỷ lệ nấm mọc lại trên bọ dừa khoảng 30% trong điều kiện nhiệt, ẩm độ thích hợp là 26,5°C và 87,7%.

Với số liệu thí nghiệm trong tháng 7, chúng tôi tiếp tục cho ứng dụng chế phẩm nấm M.a trên diện rộng vào đợt 2 trong tháng 8, 9 và 10 ở 4 huyện trên tổng diện tích 50 ha. Kết quả thử nghiệm chúng tôi thu được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8

Hiệu lực của chế phẩm (8-9/2000).

Địa điểm thí nghiệm	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực của chế phẩm (%) sau các ngày thí nghiệm				%, H (%) TB
		10	20	30	45	
Thị xã	M.a + Agral 0,1% + Padan 0,05%	80,0	75,6	70,5	68,3	6,7
	M.a + Agral 0,1%	69,2	73,2	67,7	67,8	
	M.a	62,7	70,0	60,9	57,4	
	Padan 0,05%	42,7	30,0	26,0	11,1	
Châu Thành	M.a + Agral 0,1% + Padan 0,05%	75,5	79,1	83,0	81,0	0,3 có mưa
	M.a + Agral 0,1%	64,3	68,9	60,7	58,9	
	M.a	58,7	67,6	60,9	58,7	
	Padan 0,05%	30,0	20,0	15,0	18,0	

Kết quả bảng 8 cho thấy ở cả hai địa điểm thí nghiệm thì công thức phun nấm M.a + Agral + 0,05% Padan thì có hiệu quả sau 10 ngày phun nấm đạt 75,5-80,0% và hiệu quả kéo dài đến 45 ngày phun đạt 68,3-81%. Công thức không có hoá chất cũng cho hiệu quả đạt được 64,5-69,2%, tuy nhiên kết quả không bằng so với công thức thêm một ít hoá chất và công thức phun riêng M.a. thí nghiệm ở Thị xã và huyện Châu Thành đều cho số liệu tương tự sau 10 ngày tỷ lệ bọ dừa chết đạt 62,7% và sau 45 ngày đạt 57,4%.

Điều tra những cây dừa không phun nấm thì không thấy bọ dừa chết, chứng tỏ là bọ dừa di chuyển chậm và nấm chưa có khả năng phát tán có thể vị trí các cây dừa cách xa nhau.

IV- KẾT LUẬN:

1. Môi trường nhân giống nấm cấp 1 trong 1 lít có thể giảm lượng 5-10gr Pepton và 10-20gr Glucose để sử dụng trong quá trình sản xuất lớn chế phẩm mà không ảnh hưởng nhiều đến khả năng phát triển của nấm M.a.

2. Cần thiết bổ sung thêm một lượng trấu khoảng 10% vào môi trường sản xuất để tăng chất lượng của chế phẩm và tiết kiệm được nguyên liệu trong quá trình sản xuất lớn.

3. Thời gian sấy chế phẩm thích hợp là 4-5h ở 50°C để cho chất lượng chế phẩm nấm đạt $5,9 \times 10^9$ bt/gr chế phẩm được nghiền đảm bảo độ thủy phân 10% cho việc bảo quản lâu dài cũng như sử dụng tiện lợi hơn.

Chế phẩm M.a có hoạt lực diệt sâu tơ cao là 79,2% và sâu xanh bướm trắng là 95,5% sau 8-10 ngày thí nghiệm ở nồng độ 8×10^8 bt/ml.

4. Chế phẩm nấm M.a có hiệu quả cao với bọ dừa ở thí nghiệm trong phòng sau 3-

5 ngày tỷ lệ ấu trùng và trưởng thành của bọ dừa chết đạt 100% và sau 5-7 ngày thấy có hiện tượng mọc nấm trở lại với tỷ lệ 60-75%.

Thí nghiệm trong lồng lưới cũng cho kết quả tương tự như thí nghiệm trong phòng và kết quả đạt được cao khi công thức có thêm chất bám dính Agral tỷ lệ chết đạt sau 7 ngày là 100%, còn công thức phun riêng nấm M.a thì hiệu quả chậm sau 7-10 ngày chỉ đạt 50-60%.

5. Thí nghiệm ngoài đồng trên diện hẹp 5 ha trong tháng 7/2000 tại xã Phước Thanh-Châu Thành, tại Thị xã và tại xã Thanh Tân-Mỏ Cày cho hiệu quả phòng trừ sau 10 ngày đạt từ 70-80%. Thu mẫu bọ dừa chết có nấm mọc lại khoảng 30%.

6. Thí nghiệm trên diện rộng 50 ha trong tháng 8, 9 ở Thị xã và huyện Châu Thành, chế phẩm nấm M.a cũng có hiệu quả trừ bọ dừa và hiệu quả kéo dài đến 45 ngày sau phun tỷ lệ chết đạt được 57,7-68,8% trở đi. Sau 10 ngày thấy hiệu quả ở công thức có thêm một lượng nhỏ hoá chất đạt cao nhất là 75,5-80% và thấy bọ dừa chết có nấm ký sinh trở lại. Các công thức khác cho tỷ lệ chết thấp hơn riêng công thức phun Padan 0,05% thì hầu như không có hiệu quả.

TÓM TẮT

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CẢI TIẾN CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM NẤM METARHIZIUM ANISOPLIAE (M.A) ĐỂ PHÒNG TRỪ BỌ HẠI DỪA Ở BẾN TRÈ NĂM 2000.

Quá trình nghiên cứu cải tiến công nghệ sản xuất chế phẩm M.a trong những năm qua Viện Bảo vệ thực vật đã xác định có thể tiết kiệm được từ 5-10g Pepton và 10-20gr đường Glucose trong 1 lít môi trường nhân giống cấp 1 để sử dụng nhanh trong quá trình sản xuất lớn tạo chế phẩm mà không ảnh hưởng đến chất lượng của nấm. Thí nghiệm bổ sung 10% trấu vào môi trường sản xuất đã làm tăng chất lượng của chế phẩm và tiết kiệm một phần nguyên liệu trong môi trường sản xuất. Thời gian sấy thích hợp ở 50°C trong 4-5 giờ, chất lượng chế phẩm nấm M.a đạt $5,9 \times 10^9$ bt/gr, chế phẩm đảm bảo độ thuỷ phân 10-12%, có thể bảo quản lâu dài và tiện lợi cho quá trình sử dụng để phòng trừ sâu tơ và sâu xanh bướm trắng hại rau đạt kết quả cao sau 8-10 ngày thí nghiệm ở nồng độ 8×10^8 bt/ml, tỷ lệ sâu tơ chết 79,2% và sâu xanh bướm trắng chết 95,5%.

Chế phẩm nấm M.a có hiệu quả cao với bọ hại dừa ở Bến Tre. thí nghiệm trong phòng sau 3-5 ngày cho kết quả tỷ lệ bọ dừa chết 100% và sau 5-7 ngày nấm mọc lại trên bọ dừa 70%. Thí nghiệm trong lồng lưới cũng đạt kết quả cao từ 60-100% sau 7 ngày phun. Thí nghiệm ngoài đồng trên diện hẹp 5 ha ở Châu Thành và Thị xã Bến Tre sau 10 ngày phun tỷ lệ chết đạt 70-80%. Thí nghiệm trên diện rộng 50 ha trong tháng 8-9-10/2000 ở Châu Thành và Thị xã tỷ lệ chết đạt được 75-80% sau 10 ngày phun và 57-68% sau 40 ngày thí nghiệm ở nồng độ $2,5 \times 10^{12}$ bt/ha có thêm bám dính và 1 lượng nhỏ hoá chất. Các công thức khác phun riêng như Padan 0,05% thì hiệu quả thấp hơn hoặc không có hiệu quả.

Summary

Research to improvement on technological production and application

Metarhizium anisopliae* fungus for controlling *Brontispa sp

in Ben Tre province in 2000 year.

PHAM THI THUY ET ALL

NIPP Hanoi.

In technological production *M.a* fungus, may be save from 5-10g pepton, 10-20gr glucose in 1 liter media to multiplication. Mixing 10% seed scale (husk of rice) in media to production, quality of fungal production are better than. Time for drying at 50°C in 5-6 our, spores of *Metarhizium anisopliae* fungus are $5,9 \times 10^9$ per gram and humidity (hygroscopicity) of *M.a* fungus are 10%.

Metarhizium anisopliae fungus was high effective with *Brontispa sp* in lab condition. After 3-5 days of treatment, about 100% *Brontispa sp* were killed by *M.a* fungus and after 5-7 day on body of *Brontispa sp* was occurrence *M.a* fungus about 70%.

Application *M.a* fungus in the field to control *Brontispa sp* at Chau Thanh and Thi xa district, Ben Tre province in 2000 year in large area 50 ha with a concentration of $2,5 \times 10^{12}$ Spores plus 2-3 liters of olive oil and 0,05% chemical per ha, about 75-80% *Brontispa sp* were killed by *M.a* fungus after 10 days of treatment.

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI LÁ MÍA BẰNG VI SINH VẬT

PHÙNG THỊ THUỶ, LÊ VĂN NHƯƠNG, HOÀNG ĐÌNH HOÀ

Đại học bách khoa hà nội

I. MỞ ĐẦU

Lá mía là một nguồn phế thải có khối lượng lớn ở nước ta đặc biệt khi Chương trình Mía đường được triển khai có hiệu quả. Việc xử lý lá mía thành phân hữu cơ sinh học bằng vi sinh vật vừa giải quyết được vấn đề ô nhiễm vừa trả lại cho đất những chất vi lượng cần thiết mà cây đã lấy đi.

Quá trình phân giải lá mía bằng vi sinh vật chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như nguồn vi sinh vật, nhiệt độ, độ ẩm, Từ các mẫu đất, lá mía mục tại các vùng nguyên liệu Thanh Hoá, Hà Tây, Hà Nội chúng tôi đã phân lập được 28 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải CMC. Tuyển chọn được 3 chủng nấm mốc N1, N5, N6, 3 chủng vi khuẩn V2, V3, V4, 3 chủng xạ khuẩn X1, X2, X3 có khả năng phân giải xenluloza tự nhiên tương đối tốt [1,2]. Trong bài báo này chúng tôi giới thiệu một số kết quả nghiên cứu về một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phân giải xenluloza của lá mía.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Lá mía được lấy từ vùng nguyên liệu Gia Lâm - Hà Nội

Vi sinh vật phân lập từ các mẫu đất, lá mía mục ở vùng Gia Lâm, Hà Tây, Thanh Hoá

2.2 Phương pháp nghiên cứu:

Xác định hàm lượng xenluloza thô bằng phương pháp thủy phân axit.

Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS.

Xác định CMC-aza theo phương pháp đo đường kính phân giải.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nguồn vi sinh vật đến quá trình phân giải lá mía

Quá trình phân giải lá mía được xúc tác bởi phức hệ xenlulaza do vi sinh vật sinh ra. Mỗi loài vi sinh vật khác nhau sẽ có khả năng sinh tổng hợp ra phức hệ xenlulaza có hoạt lực khác nhau. Vì vậy để phân huỷ xenluloza trong lá mía một cách có hiệu quả cần có sự phối hợp của nhiều một nhóm vi sinh vật nhất định. Trong thí nghiệm này chúng tôi đã phối trộn các chủng nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn phân lập được thành 4 tổ hợp vi sinh vật sau:

- | | | | |
|----|-----------------------|-----|---------------------------------|
| IV | : Nấm sợi + Vi khuẩn. | VI | : Vi khuẩn + Xạ khuẩn. |
| V | : Nấm sợi + Xạ khuẩn. | VII | : Nấm sợi + Vi khuẩn + Xạ khuẩn |

Bảng 1

Ảnh hưởng của nguồn vi sinh vật đến quá trình phân giải lá mía

Thời gian (ngày)	Tổ hợp giống	Mật độ VSV ($\times 10^8$ CFU/g)	Đường khử (mg/ml)	Hoạt tính CMC aza (D-d,mm)	Lượng xenluloza bị tiêu hao (%)
5	IV	34	0,06	27	6,52
	V	28	0,04	26	6,16
	VI	23	0,03	23	5,34
	VII	43	0,05	27	6,52
10	IV	156	0,66	35	11,19
	V	124	0,64	34	11,05
	VI	97	0,59	30	9,98
	VII	200	0,64	35	11,24
15	IV	465	0,47	28	16,54
	V	268	0,44	27	16,02
	VI	232	0,40	24	13,48
	VII	578	0,45	27	16,54
20	IV	545	0,14	25	19,65
	V	476	0,12	24	19,16
	VI	432	0,12	22	16,85
	VII	667	0,14	25	19,72
25	IV	423	0,45	28	21,36
	V	374	0,42	28	21,13
	VI	328	0,40	22	19,04
30	IV	218	0,52	28	23,12
	V	208	0,50	28	23,00
	VI	212	0,45	21	20,11
	VII	256	0,52	28	23,28

Qua bảng 1, cho thấy mật độ tế bào của các tổ hợp đều đạt cực đại ở ngày thứ 20, trong đó tổ hợp VII có mật độ cực đại cao nhất (667.10^8 CFU/g), sau đó là tổ hợp IV, V, tổ hợp VI có mật độ tế bào thấp nhất. Hoạt tính CMC aza của 2 tổ hợp IV và VII gần tương đương nhau, nhưng sau 30 ngày lượng xenluloza bị tiêu hao ở tổ hợp VII cao hơn tổ hợp IV điều này cho thấy phức hệ enzym của tổ hợp vi sinh vật số VII phân huỷ lá mía tốt hơn các tổ hợp khác trong nghiên cứu vì vậy chúng tôi chọn tổ hợp này cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của độ ẩm đến quá trình phân giải lá mía.

Độ ẩm là tác nhân ảnh hưởng đến sự cung cấp nước và khí cho hoạt động sống của vi sinh vật. Để nghiên cứu ảnh hưởng của độ ẩm đến khả năng phân giải lá mía chúng tôi tiến hành thí nghiệm trong bình tam giác 100ml, mỗi bình chứa 5g lá mía đã sấy khô đến trọng lượng không đổi, rồi dùng dung dịch các muối bão hoà (Height, 1985) điều chỉnh độ ẩm chuẩn từ 60% ÷ 80%, bổ sung 2% giống và tiến hành nuôi sau 15 ngày lấy ra xác định độ giảm xelluloza và độ giảm khối lượng. Dưới đây là kết quả thu được :

Bảng 2

Ảnh hưởng của độ ẩm đến quá trình phân giải lá mía.

Các chỉ tiêu	Độ ẩm (%)			
	60	70	75	80
Khối lượng giảm (%)	16,35	19,00	24,00	19,00
Xelluloza giảm (%)	5,06	18,28	16,32	15,59
Khả năng phát triển của VSV	Kém	Tốt	Tốt	Trung bình

Kết quả bảng 2 cho thấy khi độ ẩm là 70% thì lượng xelluloza bị giảm lớn nhất (23,28%) và độ giảm khối lượng cũng lớn nhất sau đó lần lượt đến các độ ẩm 75%, 80% và thấp nhất là ở độ ẩm 60%. Qua thí nghiệm này chúng tôi cũng lấy độ ẩm để ủ lá mía cho các thí nghiệm sau là 70%.

3.3. Ảnh hưởng của lượng giống ban đầu đến khả năng phân giải lá mía.

Tất cả các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động sống của vi sinh vật đều ảnh hưởng đến quá trình phân giải lá mía. Khi mật độ vi sinh vật quá thấp, quá trình phân giải chậm, tuy vậy khi mật độ vi sinh vật quá lớn lại gây ức chế quá trình do có sự cạnh tranh về môi trường dinh dưỡng giữa các vi sinh vật. Để nghiên cứu ảnh hưởng của lượng giống đến quá trình phân giải lá mía, chúng tôi tiến hành ủ lá mía cắt nhỏ, bổ sung ẩm 70%, vi sinh vật được lấy từ tổ hợp VII với số lượng từ 12.10^6 đến 60.10^6 tế bào/g lá mía và tiến hành lên men rắn ở nhiệt độ phòng. Kết quả thực nghiệm sau 15 ngày nuôi được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3

Ảnh hưởng của lượng giống ban đầu đến quá trình phân giải lá mía.

Các chỉ tiêu	Lượng giống ($\times 10^6$ tế bào/g)					
	12	24	30	36	48	60
Khối lượng giảm(%)	15,00	25,97	20,38	18,00	17,5	16,9
Xelluloza giảm (%)	12,43	18,76	20,12	17,85	14,24	10,42
Khả năng phát triển của VSV	Kém	Trung bình	Tốt	Tốt	Trung bình	Tốt

Theo kết quả bảng 3, cho thấy với mật độ giống ban đầu 30.10^6 tế bào / g thì lượng xelluloza bị tiêu hao là cao nhất (20,12%) còn khi mật độ giống là 60.10^6 tế bào/g, vi sinh vật vẫn phát triển tốt tuy vậy hàm lượng xelluloza tiêu hao thấp nhất. Như vậy, lượng giống ban đầu tốt nhất đối với quá trình phân huỷ lá mía là 30.10^6 tế bào /g cơ chất.

3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ C/N ban đầu đến khả năng phân giải lá mía.

Môi trường sống với thành phần dinh dưỡng thích hợp sẽ tạo điều kiện cho hệ vi sinh vật phát triển tốt, quá trình phân giải diễn ra nhanh hơn. Một trong các chỉ tiêu quan trọng của môi trường dinh dưỡng là tỷ lệ C/N. Hầu hết các bã thải thực vật, động vật, tỷ lệ C/N ban đầu rất khác nhau, vì vậy cần điều chỉnh trước khi lên men.

Lá mía theo phân tích của chúng tôi, tỷ lệ C/N ban đầu là 40. Chúng tôi tiến hành lên men rắn lá mía ở những tỷ lệ C/N khác nhau, bằng cách dùng urê điều chỉnh để có tỷ lệ C/N là: 20, 25, 30, 35, 40. Sau 15 ngày xác định các chỉ tiêu như các thí nghiệm trên. Kết quả trình bày ở bảng sau:

Bảng 4

Ảnh hưởng của tỷ lệ C/N ban đầu đến sự phân giải lá mía.

Các chỉ tiêu	Tỷ lệ C/N				
	40	35	30	25	20
Khối lượng giảm (%)	19,05	17,50	20,74	13,5	13
Xelluloza giảm (%)	19,25	20,87	22,28	17,85	14,24
Khả năng phát triển của VSV	Kém	Trung bình	Tốt	Khá	Tốt

Từ bảng 4, ta thấy tỷ lệ C/N là 30 thì quá trình phân giải xenluloza cao nhất (22,28%). Sự phân giải xenluloza kém nhất là (14,24%) ở môi trường có tỷ lệ C/N là 20:1 song sự phát triển của vi sinh vật ở môi trường này vẫn khá tốt. Điều này do khi nguồn dinh dưỡng quá giàu nitơ thì vi sinh vật phát huy ưu thế tạo sinh khối hơn so với tổng hợp enzym. Như vậy đối với lên men lá mía tỷ lệ C/N thích hợp nhất là 30.

3.5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng phân giải lá mía.

Quá trình sinh trưởng, phát triển và tổng hợp enzym của vi sinh vật thực chất là tổng hợp protein. Quá trình này đòi hỏi phải được cung cấp một lượng nitơ dưới dạng vô cơ hoặc hữu cơ nhất định phụ thuộc vào loài vi sinh vật. Để tìm nguồn nitơ thích hợp cho sự sinh trưởng phát triển và phân huỷ xelluloza trên lá mía, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nuôi tổ hợp VII trên lá mía ở độ ẩm 70%, lượng giống, tỷ lệ C/N thích hợp đã tìm ra với một số nguồn nitơ khác nhau sau 15 ngày nuôi. Kết quả thu được ở bảng 5.

Bảng 5

Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự phân giải lá mía

Các chỉ tiêu	Nguồn nitơ			
	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	pepton	Cao nấm men
Khối lượng giảm (%)	19,50	22,06	17,00	27,62
Xelluloza giảm (%)	17,43	22,72	18,78	26,33
Khả năng phát triển	Trung bình	Tốt	Tốt	Tốt

Qua bảng 5 ta thấy nguồn nitơ thích hợp nhất khi xử lý lá mía bằng tổ hợp vi sinh vật VII là cao nấm men, có thể trong cao nấm men có một số axit amin cần thiết cho quá trình tổng hợp enzym xellulaza. Tuy vậy cao nấm men là một nguồn nitơ rất đắt, nếu dùng trong xử lý lá mía sẽ làm giá thành xử lý cao khó áp dụng rộng rãi. Vì vậy chúng tôi dùng nguồn nitơ là (NH₄)₂SO₄, tuy hiệu quả xử lý thấp hơn cao nấm men nhưng cũng tương đối cao so với các nguồn nitơ khác (22,72). Đây cũng là nguồn nitơ rẻ tiền và dễ kiếm, do đó việc dùng nguồn nitơ này là hợp lý.

IV. KẾT LUẬN

Trong các tổ hợp vi sinh vật phân lập được qua nghiên cứu, tổ hợp VII có khả năng phân giải lá mía mạnh nhất. Một số điều kiện thích hợp cho quá trình phân giải lá mía của tổ hợp vi sinh vật VII như sau :

- Độ ẩm: 70%
- Mật độ giống ban đầu: 30.10⁶ tế bào/g lá mía
- Tỷ lệ C/N: 30/1
- Nguồn N: (NH₄)₂SO₄

summary

studying some factors influencing on sugarcane leaf degradation by microorganism

Among 4 microorganic combinations being formed in [1, 2], we have selected the VII (mixture of fungi, bacteria and actinomyces) with high sugarcane leaf degradation. Having studied some factors influencing on sugarcane leaf degradation such as moisture, starter density, ratio C/N and nitrogen source, we have found out the following suitable conditions for sugarcane leaf degradation as below:

Moisture: 70%, Starter: $30 \cdot 10^6$ cell/g, Ratio C/N: 30/1, Nitrogen source: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Văn Nhung - Báo cáo đề tài cấp nhà nước:

"Công nghệ xử lý một số phế thải nông sản chủ yếu (lá mía, vỏ thải cà phê, rác thải nông nghiệp) thành phân bón hữu cơ sinh học", 2001.

2. Nguyễn Lan Hương, Lê Văn Nhung, Hoàng Đình Hoà

" Tuyển chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính xenlulaza cao và nghiên cứu động học của quá trình phân huỷ lá mía ".

Tạp chí khoa học và công nghệ các trường Đại học Kỹ thuật, số 23 + 24, tr 50 - 54, 2000.

3. Nakasaki.K , Aoki N , Kubota H.

Acelerated composting of grass clippings by controlling moisture level.

Waste. Manage . Res. 12, tr 13- 20, 1994.

4. Nishant R and Hans G. E.

Efferct of C/ N ratio and moisture content on the composting of poplar wood. Biotechnol. Letters, 17, tr 889 - 920, 1995.

SỬ DỤNG VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ, PHÂN GIẢI LÂN ĐỂ SẢN XUẤT PHÂN HỮU CƠ- VI SINH TỪ PHÂN MÙN, RÁC VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ TRÊN CÂY TRỒNG

TRẦN TÚ THUY, VŨ THUY NGA, PHẠM VĂN TOẢN, NGUYỄN NGỌC QUYÊN⁽¹⁾
LÊ VĂN NHƯƠNG, NGUYỄN LAN HƯƠNG⁽²⁾

⁽¹⁾ Viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam

⁽²⁾ Viện công nghệ sinh học-CNTP, Đại học Bách khoa Hà Nội

I. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây sử dụng phân hữu cơ-vi sinh ở Việt nam ngày càng gia tăng do vậy việc nghiên cứu đưa các chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao như cố định nitơ, phân giải lân... để sản xuất phân bón từ phế thải hữu cơ là rất cần thiết. Công việc này mới chỉ được nghiên cứu bước đầu trong một số năm qua, cũng như đánh giá hiệu quả của loại phân bón này trên cây trồng.

II. PHƯƠNG PHÁP VÀ NGUYÊN VẬT LIỆU

Vi sinh vật cố định nitơ và phân giải lân dùng để phối trộn với phân mùn được lấy từ bộ sưu tập vi sinh vật của bộ môn vi sinh vật-viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam. Đặc điểm sinh học của các chủng này được trình bày ở bảng 1. Chúng tôi sử dụng các chủng vi khuẩn trên ở 2 dạng: dạng dinh dưỡng đối với tất cả các chủng vi khuẩn, dạng tiềm sinh đối với vi khuẩn AT19, B14 và 2 vi khuẩn này có khả năng tạo Cyst.

Trước khi phối trộn kiểm tra một số thành phần vi sinh vật ở phân mùn như: vi sinh vật tổng số, vi khuẩn phân giải xenlulo, nấm mốc, xạ khuẩn. Xác định pH của phân mùn và trung hoà pH thích hợp đối với từng loại vi khuẩn dùng để phối trộn.

Bảng 1

Các chủng vi khuẩn dùng trong nghiên cứu

TT	Tên chủng giống	Ký hiệu	Nguồn gốc	Hoạt tính sinh học
1	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	RA18	Bộ môn VSV-Viện KHKTNNVN	Cố định nitơ cộng sinh
2	<i>Azotobacter chroococcum</i>	AT19	Viện VSVNN-LB Nga	Cố định nitơ tự do
3	<i>Bacillus polymyxa</i>	B14	Viện VSVNN-LB Nga	Phân giải lân
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	K01	Bộ môn VSV-Viện KHKTNNVN	Cố định nitơ

Khử trùng phân mùn ở điều kiện hơi nước trong thời gian 2 giờ ở 121°C(1at)

Sau khi nuôi cấy sinh khối vi khuẩn bổ sung vào phân mùn với tỉ lệ để đạt được độ ẩm chế phẩm từ 35-60%. Kiểm tra độ sống sót của vi khuẩn theo phương pháp Koch trên các môi trường đặc hiệu đối với từng loại vi khuẩn trong thời gian 2-3 tháng.

Đánh giá hiệu quả của phân hữu cơ-vi sinh từ phân mùn trên cây trồng:

- Đối với rau cải trắng: Tiến hành trồng trên khay 7 kg đất có nền phân bón ban đầu 40N-80P₂O₅-40K₂O. Thí nghiệm được trồng trong vụ xuân và hè thu 1998, với thời gian là 45 ngày thì thu hoạch, bón 5 g chế phẩm cho mỗi chậu với lượng tế bào 10⁷CFU/g, 10 ngày bón 1 lần.

- Đối với lạc: Thí nghiệm được tiến hành trong vụ xuân và hè thu năm 1998. Cây được trồng trong chậu chứa 7kg đất bón NPK theo tỉ lệ 50-90-30 với lượng tính cho 1kg đất như sau: urê: 0,36g, lân Văn điển: 0,1818g, kali đỏ: 0,02g. Hạt được ủ nảy mầm gieo 3hạt/chậu, bổ sung chế phẩm 5kg/sào có chứa 10⁷CFU/g. Đánh giá hiệu quả của chế phẩm trên cây lạc thông qua xác định chỉ tiêu năng suất sinh vật, năng suất thu hoạch, lượng đạm tổng số tích lũy trong cây.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu nâng cao hiệu quả của phân hữu cơ-vi sinh được sản xuất từ phân mùn

Phân mùn được chế biến từ rác thải gồm rác hữu cơ, phân xí máy qua một loạt công nghệ xử lý sinh học, phân mùn được tạo thành dưới dạng xốp có các thành phần như: pH, độ ẩm, lân, kali tổng số khác nhau do tùy từng thời kỳ xử lý các loại rác thải hữu cơ khác nhau. Phân mùn được sử dụng trong thí nghiệm dùng để phối trộn có thành phần như ở bảng 2.

Bảng 2

Một số tính chất hoá lý của phân mùn

STT	Chỉ tiêu phân tích	
1	PH	5,4
2	Độ ẩm ban đầu (%)	28
3	Độ ẩm sau phối xử lý (%)	16
4	Độ xốp (%)	60
5	Nitơ tổng số (%)	0,726
6	Lân tổng số (%)	0,619
7	Kali tổng số (%)	0,451

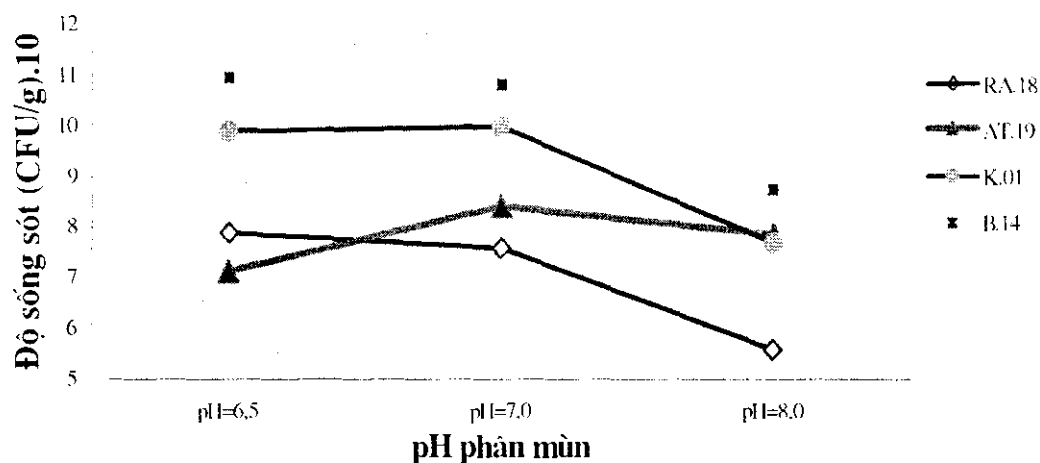
Phân mùn trước khi làm chất mang để phối trộn vi sinh có thành phần vi sinh vật rất đa dạng phong phú thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3

Thành phần và số lượng vi sinh vật trong phân mùn

STT	Nhóm vi sinh vật	Số lượng vi sinh vật (CFU/g)		
		Trạng thái ban đầu	Trạng thái phối khô	Sau khi khử trùng
1	Vi sinh vật tổng số	6.10×10^7	5.60×10^8	0
2	Vi khuẩn phân giải Xenluloza	5.70×10^5	3.73×10^5	0
3	Nấm mốc	2.33×10^7	1.15×10^7	0
4	Xạ khuẩn	9.17×10^3	8.65×10^3	0

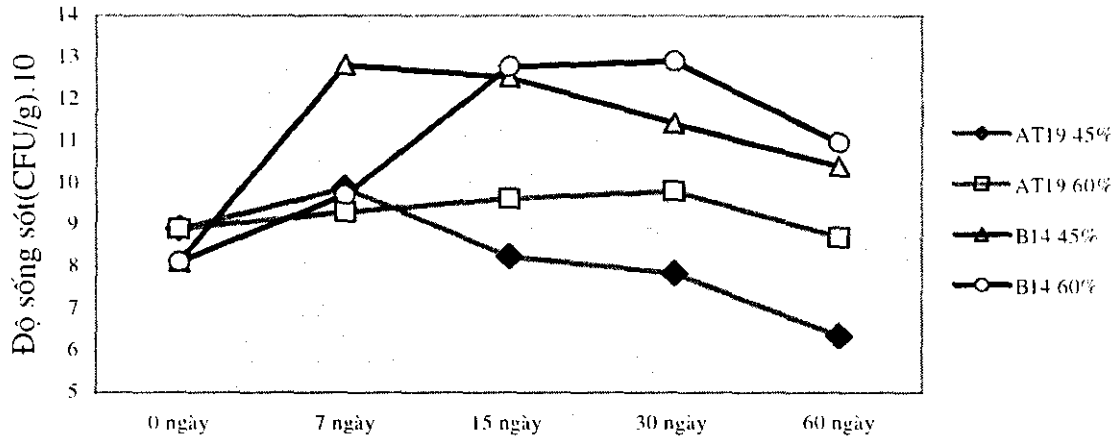
Kết quả bảng 3 cho thấy số lượng vi sinh vật trong phân mùn ở trạng thái ban đầu độ ẩm 28% đều cao hơn khi phân mùn phối khô độ ẩm chỉ còn 16%. Tuy nhiên số lượng nấm mốc cao hơn khi phân mùn phối khô có nghĩa là ở điều kiện khô là môi trường tốt cho sự phát triển của nấm mốc đây cũng là một vấn đề đáng quan tâm trong việc nghiên cứu qui trình sản xuất phân hữu cơ-vi sinh từ phân mùn không khử trùng. Để nghiên cứu pH thích hợp cho từng loại vi khuẩn chúng tôi đã xử lý trung hoà pH khác nhau (đồ thị 1)



Đồ thị 1: ảnh hưởng pH phân mùn tới độ sống sót của vi khuẩn sau 2 tháng

Đồ thị 1 cho thấy pH phân mùn từ 6,5-7,0 là việc thích hợp cho việc phối trộn vi sinh vật chúng tồn tại ở pH này trong thời gian 2 tháng, chế phẩm vẫn đạt tiêu chuẩn tốt.

Nghiên cứu ảnh hưởng của các độ ẩm khác nhau trong phân mùn tới khả năng sống sót

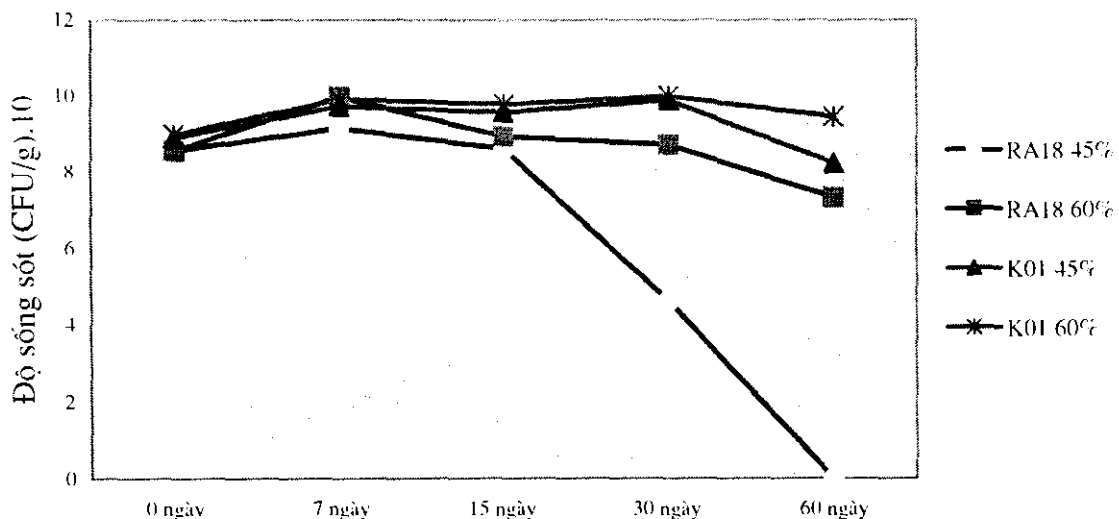


của vi khuẩn trong chế phẩm với thời gian 2 tháng thể hiện ở đồ thị 2,3,4.

Đồ thị 2: ảnh hưởng của độ ẩm phân mùn tới sự sống sót của vi khuẩn AT19 và B14 trong chế phẩm hữu cơ-vi sinh

Đồ thị 2 cho thấy: đối với chủng AT19 trong điều kiện độ ẩm 60% khả năng sống sót của vi khuẩn cao hơn (10^8 CFU/g) so với khi ở độ ẩm 45% (10^6 CFU/g). Còn với chủng B14 chúng tồn tại tốt ở cả 2 độ ẩm 45% và 60%, số lượng tế bào vi khuẩn đạt 10^{10} CFU/g. Còn với chủng vi khuẩn K01 chúng vẫn tồn tại tốt, số lượng tế bào đạt 10^7 CFU/g ở cả 2 độ ẩm 45% và 60%.

Đồ thị 3: Ảnh hưởng của độ ẩm khác nhau tới độ sống sót của vi khuẩn RA18 và K01



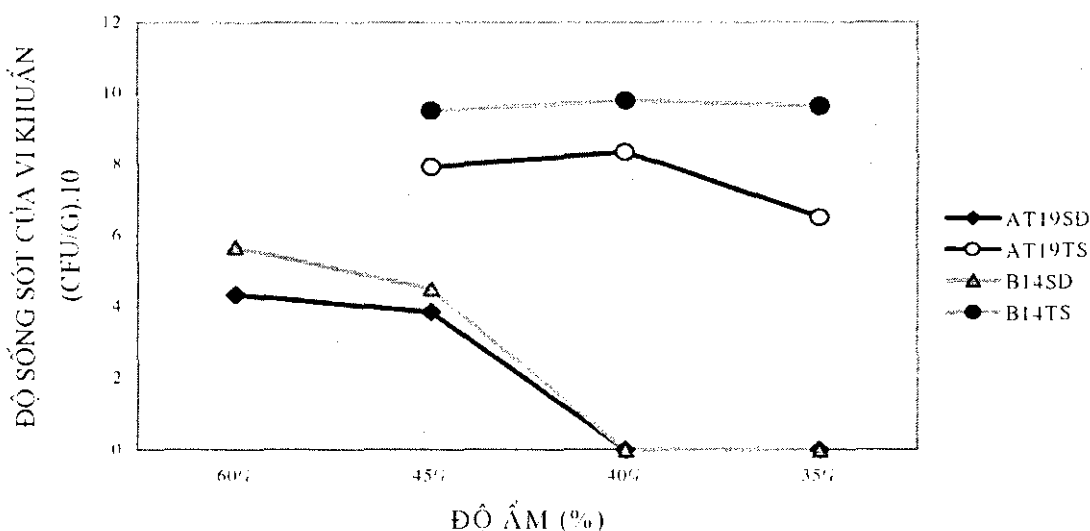
trong chế phẩm hữu cơ-vi sinh

Đồ thị 3 cho thấy độ ẩm khác nhau ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng sống sót của chủng

RA18. Ở độ ẩm 60% chủng vi khuẩn vẫn đạt 10^7 CFU/g sau 2 tháng, trong khi đó ở độ ẩm 45% số lượng tế bào vi khuẩn chỉ đạt 10^4 CFU/g trong thời gian 1 tháng.

Trên nền phân mùn không khử trùng, nếu vi khuẩn AT19, B14 phối trộn ở dạng tiêm sinh thì khả năng sống sót tốt hơn ở 3 độ ẩm 30%, 40%, 45% so với vi khuẩn ở dạng tế bào sinh dưỡng chỉ tồn tại ở độ ẩm 60% là độ ẩm tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn (đồ thị 4). Như vậy có thể thấy rằng những loại vi khuẩn nào có khả năng tạo bào tử chúng sẽ tồn tại trong điều kiện không thuận lợi như khô, chịu được một số độc tố của một số loài vi sinh vật: nấm, xạ khuẩn... tiệt ra

Đồ thị 4: Khả năng sống sót của vi khuẩn AT19 và B14 ở dạng sinh dưỡng và tiêm sinh



trên phân mùn không khử trùng (sau 2 tháng)

3.2.Đánh giá hiệu quả của phân hữu cơ-vi sinh trên cây trồng

Để đánh giá hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh được sử dụng từ phân mùn tiến hành bón cho cây lạc ở 2 vụ xuân, hè thu. Kết quả thu được thể hiện ở các bảng 4,5,6

Bảng 4

Ảnh hưởng của phân hữu cơ-vi sinh tới sự sinh trưởng và phát triển của cây lạc

Thời vụ	Vụ xuân		Vụ hè thu	
	Bón chế phẩm	% tăng so với đối chứng	Bón chế phẩm	% tăng so với đối chứng
Chỉ tiêu theo dõi(chậu)				
Cao cây (cm)	44,10	11,08	43,05	10,96
Số nhánh cấp I (nhánh)	4,00	11,02	3,88	11,08
Số nhánh cấp II (nhánh)	2,00	50,00	2,00	0
Trọng lượng khô thân lá (g)	14,25	12,46	15,72	12,59
Số lượng nốt sần (nốt sần)	252,82	13,21	157,3	10,02

Bảng 5

Ảnh hưởng của phân hữu cơ-vi sinh tới năng suất thu hoạch của lạc (vụ xuân)

Công thức	Số quả trên cây	Quả chắc/cây	Tỉ lệ chắc (%)
Đối chứng: Nền	16,14	9,28	57,5
Nền + phân mùn	10,76	6,80	63,9
Nền + chế phẩm HCVS	13,57	8,70	64,2

Bảng 6

Ảnh hưởng của phân hữu cơ-vi sinh tới khả năng tích lũy đạm trong cây lạc (vụ xuân)

Công thức	Hàm lượng đạm tổng số (%)	Hàm lượng protein (%/g)
Đối chứng: Nền	0,750	4,688
Nền + phân mùn	1,507	9,433
Nền + chế phẩm HCVS	1,687	10,540

Kết quả được trình bày ở bảng 4,5,6 cho thấy ở công thức có bón phân hữu cơ-vi sinh các chỉ tiêu năng suất sinh vật tăng 12,6%, tăng tỉ lệ hạt chắc và hàm lượng đạm, protein so với công thức đối chứng không bón hữu cơ-vi sinh.

Việc sử dụng bón bổ sung phân hữu cơ vi sinh cho rau cải trắng cũng có hiệu quả rõ rệt ở 2 vụ xuân và hè thu. Kết quả được trình bày ở bảng 7,8.

Bảng 7

Ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh tới năng suất của rau cải trắng

Thời vụ	Vụ xuân		Vụ hè thu	
	Bón chế phẩm	% tăng so với đối chứng	Bón chế phẩm	% tăng so với đối chứng
Chỉ tiêu theo dõi(chậu)				
Số lá trên cây (lá)	10,40	12,05	8,80	10,80
Cao cây (cm)	27,93	3,39	25,60	2,90
Trọng lượng tươi thân lá (g)	182,50	16,98	213,30	11,21
Trọng lượng chất khô (%)	7,36	11,20	9,97	12,30

Bảng 8

Ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh tới chất lượng rau cải trắng

Thời vụ	Công thức	Đường tổng số (%)	VitaminC (mg/100g cơ chất)	NO ₃ (mg/kg cơ chất)
Xuân	Đối chứng: Nền	0,88	70,64	3,873
	Nền + phân mùn	1,02	70,64	2,724
	Nền + chế phẩm HCVS	1,27	70,85	1,985
Hè -thu	Đối chứng: Nền	1,51	70,17	1,245
	Nền + phân mùn	1,59	70,94	1,164
	Nền + chế phẩm HCVS	1,74	83,58	1,164

Qua bảng 8 thấy rằng công thức bón phân hữu cơ-vi sinh cho hiệu quả cao về năng suất cũng như chất lượng rau hơn công thức chỉ nhiễm phân mùn, còn công thức đối chứng chỉ bón nền không bón bổ sung phân hữu cơ-vi sinh cho kết quả kém nhất.

IV. KẾT LUẬN

- Có thể tận dụng nguồn phân mùn rác thải sau khi đã được xử lý sinh học dùng để làm chất mang phối trộn với vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân có hoạt tính sinh học cao chế biến phân hữu cơ vi sinh

- pH 6,5-7,0 của chất mang phân mùn phù hợp cho sự phát triển và tồn tại của các chủng vi khuẩn RA.18, AT.19, B.14 và K01 trong thời gian 2-3 tháng

- Độ ẩm khác nhau trong chế phẩm ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng sống sót của vi khuẩn.

Độ ẩm tốt nhất là 60%, số lượng tế bào vi khuẩn đạt từ 10^7 CFU/g - 10^{10} CFU/g trong thời gian 2-3 tháng.

- Đối với vi khuẩn ở dạng tiềm sinh (AT19, B14) chúng có thể tồn tại trong điều kiện khô, độ ẩm 35% đạt 10^6 - 10^9 CFU/g so với vi khuẩn ở dạng sinh dưỡng chỉ đạt 10^3 - 10^4 CFU/g trong thời gian 2 tháng.

- Khi bón bổ sung phân hữu cơ -vi sinh trong thí nghiệm chậu vại cho lạc đã làm tăng năng suất sinh học 12,6% so với đối chứng không bón phân hữu cơ-vi sinh. Bón bổ sung cho rau cải trắng đã làm tăng năng suất rau từ 11,2-12,3% (ở 2 vụ xuân và hè thu), cải thiện đáng kể chất lượng rau: hàm lượng nitrat giảm, đường tổng số và vitaminC tăng so với công thức đối chứng.

TÓM TẮT

Tận dụng nguồn phân mùn thu được sau quá trình xử lý rác thải để làm chất mang, kết hợp với các chủng vi sinh vật cố định nitơ (*RA18*, *AT19*), phân giải lân (*B14*) có hoạt tính sinh học cao để chế biến phân hữu cơ-vi sinh và đánh giá hiệu quả của chúng trên cây lạc và rau cải trắng.

Kết quả cho thấy trong quá trình phối trộn vi sinh vật với chất mang là phân mùn trong thời gian 3 tháng: độ ẩm 60% là thích hợp nhất cho sự tồn tại của vi sinh vật đạt 10^8 CFU/g chế phẩm. Đối với chất mang không khử trùng, vi sinh vật ở dạng tiềm sinh (*AT19*, *B14*) có thể tồn tại ở độ ẩm 35, 40 và 45% đạt 10^9 CFU/g chế phẩm so với vi sinh vật ở dạng sinh dưỡng khi tồn tại ở độ ẩm 45 và 60% chỉ đạt 10^4 CFU/g chế phẩm.

Đánh giá hiệu quả của phân hữu cơ-vi sinh trên cây lạc cho thấy đã làm tăng năng suất sinh học 12,6% so với đối chứng không bón phân hữu cơ- vi sinh. Cũng cho kết quả tương tự khi bón phân hữu cơ vi sinh đã ảnh hưởng rõ rệt tới tăng năng suất cũng như chất lượng rau so với đối chứng. Bón bổ sung cho rau cải trắng đã làm tăng năng suất rau từ 11,2-12,3% (ở 2 vụ xuân và hè thu), cải thiện đáng kể chất lượng rau: hàm lượng nitrat giảm, đường tổng số và vitaminC tăng so với công thức đối chứng.

SUMMARY

USING NITROGEN-FIXING , PHOSPHATE SOLUBILIZING , BACTERIA FOR PRODUCTION WASTE-BIOFERTILIZER FROM THE WASTE COMPOSTING AND PRICING EFFICIENCY ON PLANTS

TRAN TU THUY, VU THUY NGA, PHAM VAN TOAN, NGUYEN NGOC QUYEN¹

LE VAN NHUONG, NGUYEN LAN HUONG2

The nitrogen-fixing bacteria (*RA18*, *AT19*) and phosphate solubilizing bacteria (*B14*) have been added to waste compost, The densities of these strains in the perforates are about 10^8 CFU/gerg after 3 month with moisture 60%.

On the non-sterilized waste-composted, these strains in the anabiotic (*AT19*, *B14*) are about 10^9 CFU/g with moisture 35-45%. While these strains in the vegetation being 10^4 CFU/g with moisture 45% after 2 months.

Under pot experimnet conditions the biomass and yield, quality of peanut and mustard green inoculated with waste-Biofertilizer were increased.

NGHIÊN CỨU SINH TỔNG HỢP PROTEIN VÀ TẠO CHẾ PHẨM DIỆT
ẤU TRÙNG MUỖI TỪ CÁC CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS*
THURINGIENSIS VÀ *BACILLUS SPHAERICUS*

NGUYỄN THỊ HOÀI TRÂM, PHẠM THU TRANG, NGUYỄN HỒNG
NHUNG, ĐỖ THỊ THANH HUYỀN, NGUYỄN NGÂN MINH, VŨ THỊ
THẢO, CHU THẮNG, MAI THU HIÊN, NGÔ ĐÌNH QUANG BÌNH*,
NGUYỄN VĂN THƯỜNG*.

Viện Công nghiệp Thực phẩm.

** Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN & CN Quốc gia.*

I. MỞ ĐẦU

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*) và *Bacillus sphaericus* (*Bs*) là hai loài vi khuẩn hiện đang được sử dụng để sản xuất các chế phẩm diệt ấu trùng côn trùng bộ hai cánh (Dipteran larvae). Độc tố của các vi khuẩn này được tạo thành trong giai đoạn tạo bào tử, có bản chất protein và kết tinh thành dạng tinh thể.

Tinh thể độc tố của *Bti* gồm 4 polypeptid có trọng lượng phân tử khoảng 125, 135, 68 và 28 kDa được mã hoá tổng hợp bởi các gen độc tố (*cry* gene): *cry* 4A, *cry* 4B, *cry* 4D và *cyt* 1A. Độc tố của *Bs* là 2 protein 42 và 51 kDa, hai protein này tác dụng như một độc tố độc lập nên chúng được gọi là độc tố kép (Binary toxin).

Trong 20 năm gần đây, sản phẩm của *Bti* và *Bs* được sử dụng ở nhiều nước để diệt ấu trùng các loài muỗi truyền bệnh như *Aedes*, *Anopheles* và *Culex*. Phổ diệt côn trùng của hai loài vi khuẩn này khác nhau. Ấu trùng muỗi *Culex* và *Anopheles* mẫn cảm hơn với độc tố của *Bs*, trong khi ấu trùng muỗi *Aedes* lại mẫn cảm với *Bti*. Tuy nhiên, *Bs* lại có ưu điểm hơn *Bti* là thời gian tồn lưu hoạt tính ở môi trường nước nhiễm bẩn cao (6). Vì vậy, việc sưu tầm, phân lập và nghiên cứu các chủng *Bt*, *Bs* mới luôn được quan tâm ở khắp nơi trên thế giới.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày những kết quả bước đầu trong nghiên cứu một số chủng *Bt*, *Bs* để tạo các chế phẩm diệt ấu trùng muỗi ứng dụng ở Việt Nam.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Trong nghiên cứu sử dụng chủng *Bs* 2362 nhận từ khoa Công nghệ Sinh học, Trường đại học Tổng hợp New South Wales, Úc; chủng *Bs* lab 59 từ phòng thí nghiệm Lên men, Viện Vi rút học Wuhan, Trung Quốc; chủng *Bt* VTP 29 phân lập ở Việt Nam trong Bộ sưu tập giống của Bộ môn Enzim và ứng dụng, Viện Công nghiệp Thực phẩm; chủng *Bt entomocidus* INA 288 từ phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử Côn trùng, Trường Đại học Tổng hợp Hokkaido, Nhật Bản và chủng *Bt israelensis* H14 phân lập từ chế phẩm thương mại VectoBac CG của Công ty Abbott, Mỹ.

- Trong phòng thí nghiệm *Bt*, *Bs* được nuôi cấy trong bình tam giác trên máy lắc tròn 200 vòng/phút và trong thiết bị lên men dung tích 6,7 L Bioflo III (New Brunswick).

- Quan sát, đếm tế bào, bào tử, tinh thể các chủng *Bt*, *Bs* bằng kính hiển vi Nikon E600.

- Thu nhận và tinh sạch protein tinh thể theo phương pháp của Yamamoto (1990).
- Xác định thành phần protein tinh thể theo phương pháp điện di trên gel polyacrylamid (Laemmli, 1970), định lượng protein theo phương pháp Lowry (1951).
- Tách chiết DNA, xác định gen độc tố diệt muỗi bằng kỹ thuật PCR, sử dụng các môi đặc hiệu *cry1* và *cry4* (Asano, 1996).
- Dịch nuôi cấy sau khi kết thúc lên men được li tâm để thu lại 1/10 thể tích. Bổ xung chất bảo quản, chất kết dính, chất mang. Khuấy trộn, sấy khô có quạt gió ở 45°C đến độ ẩm 8%.
- Dịch lên men và chế phẩm khô được đem thử trên ấu trùng các loài muỗi *Aedes aegypti*, *Anopheles minimus* và *Culex quinquefasciatus* tuổi 2-3. Tỷ lệ chết được đọc sau 24 h đối với các chế phẩm *Bt* và 48 giờ đối với các chế phẩm *Bs*.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. So sánh các đặc điểm phân loại về hình thái, protein tinh thể diệt côn trùng và các lớp gen độc tố của các chủng *Bt*, *Bs*.

Các kết quả nghiên cứu so sánh đặc điểm phân loại về hình thái, protein tinh thể và các lớp gen độc tố mã hoá tổng hợp protein diệt côn trùng của các chủng *Bt*, *Bs* nghiên cứu được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. So sánh các đặc điểm phân loại, hình dạng của các chủng *Bt*, *Bs* nghiên cứu

Tên chủng	H-serotype	Hình dạng, vị trí bào tử trong tế bào	Hình dạng tinh thể	Protein (kDa)	Lớp gen độc tố
<i>Bti</i> VBac (<i>Bti</i> H14)	H14	Hình trứng, nằm giữa tế bào	Hình cầu, bán cầu rất nhỏ	130, 68, 28	Cry 4A, cry 4B, cry 4D
<i>Bte</i> INA 288	II7	Hình trứng, nằm giữa tế bào	Hình khối lập phương khá lớn	70	Không có sản phẩm PCR
<i>Bt</i> VTP 29	Không phân loại được	Hình trụ, nằm giữa tế bào	Hình khối rất nhỏ	72	Không có sản phẩm PCR
<i>Bs</i> 2362	H5a,5b	Hình tròn, phình, nằm ở đầu tế bào	Không quan sát được	51, 42	-
<i>Bs</i> lab 59	H6	Hình tròn, phình, nằm ở đầu tế bào	Không quan sát được	51,42	-

Từ các số liệu thu được ta thấy rằng, protein độc tố 70 và 72 kDa của hai chủng *Bte* INA 288 và *Bt* VTP 29 không được mã hoá tổng hợp bằng các gen độc tố *cry1* và *cry4* đã biết, như vậy chúng có thể được mã hóa bằng các gen độc tố mới khác cần được nghiên cứu tiếp.

2. Nghiên cứu sự phát triển, tạo và tách bào tử, tinh thể độc tố của các chủng *Bt*, *Bs* trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy môi trường CYS tỏ ra thích hợp với các chủng *Bti* VBac, *Bt* VTP 29 về tất cả các thông số: mật độ tế bào cực đại, tỷ lệ tách bào tử, tinh thể tự do và hàm lượng protein tổng số. Còn chủng *Bte* INA-288 thích hợp với môi trường chuẩn HP hơn.

Môi trường sử dụng bột đậu tương, bột ngô thay thế pepton và gluco phù hợp với tất cả ba giống *Bt*, như vậy có thể sử dụng môi trường này trong sản xuất công nghiệp.

Đối với *Bs* 2362, kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các kết luận đã được công bố (5). *Bs* 2362 sử dụng cơ chất chính là axetat natri (môi trường B1). Hàm lượng axetat natri trong môi trường được tiêu thụ hết sau thời gian tổng tế bào đạt cực đại (16-18 h nuôi cấy). Trên môi trường B1, *Bs* lab 59 tạo, tách bào tử tự do thấp hơn so với môi trường HP. Môi trường sử dụng các nguyên liệu thay thế (HPT) đối với *Bs* lab 59 cũng tốt hơn so với *Bs* 2362.

Bảng 2. Tỷ lệ tách bào tử, tinh thể protein của các chủng Bt, Bs trên các môi trường lên men

Tên chủng	Môi trường lên men	pH (ở thời điểm kết thúc lên men)	Tổng tế bào/ml (x10 ⁸)	Tỷ lệ tách bào tử, tinh thể tự do (%)	Protein tổng số (µg/ml)
<i>Bti</i> VBac	CYS	8,5 (72h)	9,85	94	730
	HP	7,5 (72h)	10,2	96	595
	HPT	8,0 (72h)	12,45	91	605
<i>Bte</i> INA288	CYS	8,5 (72h)	7,15	97	775
	HP	7,5 (72h)	9,2	97	925
	HPT	8,3 (54h)	11,1	94	1270
<i>Bt</i> VTP 29	CYS	8,5 (72h)	10,15	95	835
	HP	7,8 (72h)	9,6	91	685
	HPT	7,8 (54h)	11,4	94	770
<i>Bs</i> 2362	B1	10 (48h)	14,75	83	640
	HP	9,5 (32h)	11,97	72	580
	HPT	9,5 (32)	7,55	80	590
<i>Bs</i> lab 59	B1	10 (48h)	9,9	58	540
	HP	9,5 (32h)	10,4	81	650
	HPT	9,5 (32)	7,4	90	600

Ghi chú: CYS: Môi trường chứa gluco, cao nấm men, pepton và các muối khoáng gốc Cl (1).

HP: Môi trường chứa gluco, pepton và các muối khoáng gốc SO₄(2).

B1: Môi trường cho *Bs* chứa axetat natri, cao nấm men và các muối khoáng gốc Cl (5).

HPT: Môi trường dùng các muối khoáng và nguyên liệu thay thế: bột ngô, bột đậu tương (2).

Từ các kết quả thu được, chúng tôi chọn chủng *Bt* VTP 29, *Bs* 2362 và *Bs* lab 59 để khảo sát thêm sự tiêu thụ đường trong quá trình nuôi cấy. Môi trường được chọn là HP, sự tiêu thụ đường (tính theo gluco) trong môi trường được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Sự tiêu thụ đường gluco trong quá trình nuôi cấy *Bt* VTP 29, *Bs* 2362 và *Bs* lab 59

Thời gian nuôi cấy (h)	<i>Bt</i> VTP 29		<i>Bs</i> 2362		<i>Bs</i> lab 59	
	(g/l)	(%) tiêu thụ	(g/l)	(%) tiêu thụ	(g/l)	(%) tiêu thụ
0	8,47	0	8,74	0	8,83	0
4	7,35	13	7,94	9	8,28	7
8	6,16	27	7,84	10	,05	10
12	4,03	52	7,84	10	7,44	17
16	2,20	74	7,67	12	8,08	10
20	1,72	80	7,49	14	8,06	10
24	1,50	82	8,18	6	8,03	10
28	1,24	85	-	-	-	-
32	1,14	87	8,12	7	8,09	10
72	0,02					

Kết quả cho thấy, đối với chủng *Bt* VTP 29, gluco trong môi trường được tiêu thụ mạnh trong giai đoạn phát triển logarit. Tại thời điểm tế bào đạt cực đại (20 giờ), gluco đã sử dụng hết 80%. Ở giai đoạn hình thành, tách bào tử tinh thể tự do, lượng gluco còn lại được tiêu thụ chậm dần. Khi kết thúc lên men 72 giờ, gluco trong môi trường hầu như đã được sử dụng hết.

Khác với *Bt* VTP 29, các chủng *Bs* tiêu thụ gluco rất ít trong giai đoạn phát triển logarit. Đến 20 giờ nuôi cấy, *Bs* 2362 mới tiêu thụ 16% gluco, còn *Bs* lab 59 chỉ tiêu thụ 17% gluco đến 12 giờ, sau đó gluco trong môi trường nuôi cấy các chủng *Bs* lại tăng lên và dao động không đáng kể cho đến khi kết thúc lên men ở 32 giờ, khi tỷ lệ tách bào tử tự do đạt 72% với *Bs* 2362 và 81% với *Bs* lab 59.

3. Hiệu lực sinh học của các chủng *Bt*, *Bs* đối với ấu trùng các loài muỗi truyền bệnh

Dịch nuôi cấy vi khuẩn khi kết thúc lên men được đem xác định hiệu lực sinh học trên ấu trùng các loài muỗi *Aedes aegypti*, *Anopheles minimus* và *Culex quinquefasciatus* tuổi 2-3. Tỷ lệ ấu trùng chết ở các nồng độ bào tử, tinh thể khác nhau được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ chết của ấu trùng muỗi ở các nồng độ bào tử, tinh thể *Bt*, *Bs* khác nhau

Tên chủng	Môi trường	<i>A. aegypti</i>			<i>An. minimus</i>			<i>C. quinquefasciatus</i>		
		Nồng độ bào tử/ml			Nồng độ bào tử/ml			Nồng độ bào tử/ml		
		10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ³	10 ²	10 ¹
<i>Bti</i> VBac	CYS		100	30	55				100	40
	HP		100	25	80				100	35
	HPT		100	75	60				100	40
<i>Bte</i> INA 288	CYS		40		40			100	80	
	HP		85		50			96	70	
	HPT		65		40			100	80	
<i>Bt</i> VTP 29	CYS			100		100	60		100	80
	HP			100		100	70		100	80
	HPT			100		100	60		100	80
<i>Bs</i> 2362	B1	40				50		95	70	
	HP	75				60		95	70	
	HPT	60				60		100	100	55
<i>Bs</i> lab59	B1	30				40		60		
	HP	60				50		70		
	HPT	45				70		100	50	

Kết quả cho thấy trong ba chủng *Bt*, dịch lên men chủng *Bt* VTP 29 có hiệu lực diệt ấu trùng các loài muỗi cao nhất. Với ấu trùng *Aedes aegypti* và *Culex quinquefasciatus*, hiệu lực diệt của *Bt* VTP 29 cao hơn hẳn so với chủng chuẩn *Bti* VBac và *Bs* 2362. Khả năng diệt ấu trùng muỗi *Anopheles minimus* khá cao của *Bt* VTP 29 được chúng tôi đặc biệt quan tâm khi cả *Bti* VBac, *Bs* 2362 và *Bs* lab 59 tỏ ra có hiệu quả không cao.

4. Nghiên cứu tạo chế phẩm diệt ấu trùng muỗi từ các chủng *Bt* VTP 29 và *Bs* 2362

Để phát huy các đặc tính ưu việt của *Bti* và *Bs*, đã có một vài nghiên cứu nuôi chung hai chủng này để thu được chế phẩm có hoạt lực cao diệt được tất cả ấu trùng các loài muỗi truyền bệnh, có khả năng tồn lưu cao ở các nguồn nước nhiễm bẩn (8). Trong nghiên cứu về vấn đề này, chúng tôi đã chọn *Bt* VTP 29 và *Bs* 2362 để tiến hành các thí nghiệm nuôi chung. Sử dụng môi trường nuôi cấy HP và HPT. Chúng tôi đã rút ra các kết luận sau:

- Trên môi trường lên men HP, hai chủng *Bs* 2362 và *Bt* VTP 29 phát triển, đạt mật độ tế bào cực đại và tách bào tử, tinh thể tự do bình thường. Tuy nhiên, so với nuôi riêng, mật độ tế bào của *Bs* 2362 thấp hơn và thời gian nuôi cấy cũng bị kéo dài theo *Bt* VTP 29. Khi kết thúc lên men sau 52 giờ, tỷ lệ tách bào tử (BT), tinh thể của *Bt* VTP 29 đạt 91% ($9,5 \times 10^8$ BT/ml), và *Bs* 2362 đạt 83% ($7,5 \times 10^8$ BT/ml). Kết quả lên men trên thiết bị lên men dung tích 6.7 lít Bioflo III cũng khẳng định kết luận trên của chúng tôi.

- Trên môi trường sử dụng nguyên liệu thay thế HPT, sự phát triển của *Bs* 2362 lại tỏ ra chiếm ưu thế hơn nhiều so với *Bt* VTP 29. Sau 52 giờ nuôi cấy, tỷ lệ tách bào tử tự do của *Bs* 2362 đạt 90% ($7,1 \times 10^8$ bào tử tự do/ml), còn số bào tử tự do của *Bt* VTP 29 chỉ đạt $4,2 \times 10^8$ /ml (tỷ lệ tách đạt 61%).

Hiệu lực sinh học của các chế phẩm *Bt* và *Bs* dạng nổi được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Hiệu lực sinh học của các chế phẩm *Bt*, *Bs* với ấu trùng các loài muỗi

Tên chế phẩm (số BT $\times 10^9$ /g)	<i>A. aegypti</i>		<i>An. minimus</i>		<i>C. quinquefasciatus</i>	
	Nồng độ (BT/ml)	Tỷ lệ chết (%)	Nồng độ (BT/ml)	Tỷ lệ chết (%)	Nồng độ (BT/ml)	Tỷ lệ chết (%)
<i>Bt</i> VTP 29 ($1,6 \times 10^9$ /g)	$1,6 \times 10^2$	100	$1,6 \times 10^4$	80	$1,6 \times 10^2$	100
<i>Bs</i> 2362 ($1,7 \times 10^9$ /g)	$1,7 \times 10^6$	90	$1,7 \times 10^4$	50	$1,7 \times 10^3$	90
<i>Bt</i> VTP 29, <i>Bs</i> 2362 nuôi chung ($1,3 \times 10^9$ /g)	$1,3 \times 10^2$	100	$1,3 \times 10^2$	90	$1,3 \times 10^2$	100

Kết quả cho thấy rằng có thể sử dụng chế phẩm hỗn hợp từ hai chủng *Bt* VTP 29 và *Bs* 2362 để diệt ấu trùng các loài muỗi truyền bệnh. Việc sử dụng chế phẩm hỗn hợp sẽ nâng cao hiệu lực sinh học và có thể sẽ khắc phục được những nhược điểm riêng của từng chủng giống.

IV. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu chúng tôi rút ra kết luận sau:

Chủng *Bt* VTP 29 phân lập ở Việt Nam có các đặc tính rất ưu việt: có hoạt lực sinh học diệt ấu trùng các loài muỗi *Aedes*, *Anopheles* và *Culex* rất cao; có khả năng sinh trưởng, tạo và tách bào tử cao trên môi trường sử dụng các nguyên liệu thay thế rẻ tiền, dễ kiếm ở Việt Nam; có khả năng nuôi chung với chủng *Bs* 2362 để tạo được chế phẩm sinh học hỗn hợp mang đầy đủ các đặc tính ưu việt của từng chủng giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Asano, S. 1996. Identification of *cry* gene from *Bacillus thuringiensis* by PCR and isolation of unique insecticidal bacteria. *Memories Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 19: 529-563.
2. Giang D.T., Tram N.T.H., Trang P.T. 1996. Study on Experimental Production and Application of Bioinsecticide *Bt* to control pests in Vietnam. In *Proceedings of the Second Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Impact to the Environment*. Nov. 4-8. 1996. Chiang Mai, Thailand: 265-283.
3. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.
4. Lowry, O.H., Rosebrough, A.L. and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

5. Nguyễn Thị Hoài Trâm, Đỗ Thị Giang, Phạm Thu Trang, Vũ Thị Thảo, Nguyễn Ngân Minh, Chu Thắng, Mai Thu Hiền. 2000. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm diệt bọ gây muỗi từ chủng *Bacillus sphaericus* 2362. Trong *Các công trình nghiên cứu ứng dụng Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm giai đoạn 1996-2000*. Viện Công nghiệp Thực phẩm, Nhà Xuất bản KH và KT: 97-101.
6. Tram T.H. Nguyen, Tianyun Su and Mir S. Mulla. 1999. Mosquito Control and Bacteria Flora in water Enriched with Organic Matter and Treatment with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* Formulations. *Journal of Vector Ecology*. December, Vol.24, No 2:138-153.
7. Yamamoto, T. 1990. Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. *ACS Symp. Ser.* 432: 46-60.
8. Yu Ziniu, Sunming and Liu Ziduo. 1999. The Research and Application of *Bacillus thuringiensis* Biotechnology in China. In *Proceedings of the Third Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bacillus thuringiensis*. Oct. 5-9. Wuhan, China: 6-14.

SUMMARY

STUDY ON BIOSYNTHESIS AND FORMULATION OF MOSQUITOLARVICIDAL PROTEIN FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* AND *BACILLUS SPHAERICUS* STRAINS

NGUYEN THI HOAI TRAM, PHAM THU TRANG, NGUYEN HONG NIHUNG, DO THI THANH HUYEN, NGUYEN NGAN MINH, VU THI THAO, CHU THANG, MAI THU HIEN, NGO DINH QUANG BINH*, NGUYEN VAN THUONG*.

Food Industries Research Institute (FIRI)

** Institute of Biotechnology, (N.C.S.T.)*

Some mosquitolarvicidal strains of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) and *Bacillus sphaericus* (*Bs*) were investigated on insecticidal crystal protein, *cry* gene and the growth, sporulation rate and toxin formation in different cultural media. The medium containing gluco, peptone, mineral salts (HP) and medium based on local materials such as corn meal, soybean meal (HPT) gave high growth, sporulation rate and total protein content for the all studied *Bt* and *Bs* strains.

Strains *Bt* FIRI 29, which isolated from Vietnam produce small cuboidal crystal protein of 72 kDa. This protein not encode by *cry4* gene and should be encode by new *cry* gene. Larvicidal potency of *Bt* FIRI 29 was very high on larvae of *Aedes aegypti*, *Anopheles minimus* and *Culex quinquefasciatus*. Specially, crystal protein of *Bt* FIRI 29 have toxicity to larvae of *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* higher than proteins of standard strains *Bt* H14 and *Bs* 2362, respectively. Two strains *Bt* FIRI 29 and *Bs* 2362 should be used for fixed fermentation in the HP medium and mosquitolarvicidal preparation which was made from the bacteria showed the advantages of the two strains.

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG NẤM MEN
SACCHAROMYCES. SP PHÙ HỢP VỚI YÊU CẦU
SẢN XUẤT RƯỢU VANG TỪ DỊCH QUẢ NHO**

NGUYỄN THẾ TRANG, NGUYỄN VĂN HIẾU, LƯƠNG ĐỨC PHẮM

TRẦN ĐÌNH MẮN, NGUYỄN THỊ DIỄM

Viện Công nghệ Sinh học - Trung tâm khtn và cnqg

Phòng Công nghệ Lên men, Viện Công nghệ Sinh học đã tuyển chọn được 5 chủng nấm men thuộc *Saccharomyces. sp* được ký hiệu D1, D2, D3, D4 và D5 từ dịch quả nho. Chúng tôi đã nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng lên men như: độ đường, nhiệt độ, độ cồn, pH, nồng độ sunfit cũng như khả năng kết lắng của 5 chủng nghiên cứu.

Kết quả cho thấy từ 5 chủng nấm men nói trên đã chọn được 2 chủng D3 và D4 thích hợp để lên men trong các điều kiện như sau: đường 16°Bx, nhiệt độ 20-40°C, đặc biệt có thể cho lên men ở dưới 20°C, pH 3-4, nồng độ sunfit: có thể chịu được là 150 mg/l. Hai chủng này có khả năng kết lắng tốt (>28 mm).

I. MỞ ĐẦU

Tuyển chọn các chủng nấm men phù hợp với yêu cầu sản xuất vang là một trong những yêu cầu cần thiết cho các cơ sở sản xuất vang, đặc biệt các chủng có nguồn gốc từ chính những nguyên liệu để sản xuất chúng.

Trong bài báo này sẽ trình bày việc phân lập và tuyển chọn từ dịch quả nho những chủng nấm men *Saccharomyces. sp* có các yêu cầu phù hợp đối với sản xuất vang ở trong nước.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Nho mua ở chợ Bưởi - Hà Nội, có nguồn gốc từ Ninh Thuận
- Môi trường: thạch malt, Hansen - cao men, dịch lên men từ nước quả nho.

2. Phương pháp nghiên cứu [1-7]

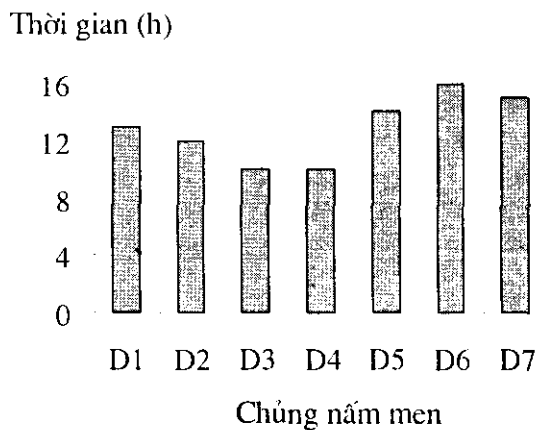
- Xác định hoạt lực lên men theo phương pháp sử dụng bình Egol.
- Xác định khả năng lên men ở các hàm lượng đường khác nhau và khả năng chịu cồn theo phương pháp cân bình lên men.
- Xác định khả năng chịu nhiệt độ, chịu pH và chịu nồng độ sunfit khác nhau của các chủng nấm men theo phương pháp xác định khả năng tạo thành CO₂
- Xác định khả năng kết lắng của các chủng nấm men theo phương pháp dùng muối NaCl 0,85%.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sơ tuyển các chủng nấm men từ dịch quả nho

Dịch quả nho pha loãng và được cấy trên đĩa Petri chứa môi trường thạch-malt, nuôi ở 28°C, thời gian 36 giờ, tách được 7 chủng nấm men *Saccharomyces. sp* được ký hiệu như

sau: D1, D2, D3, D4, D5, D6 và D7. Trên mỗi bình Egol có chứa môi trường Hansen-caomên, bổ sung mỗi bình 10% giống mỗi chủng, nuôi ở 28°C. Xác định hoạt lực lên men của các chủng nghiên cứu bằng thời gian để đạt được 5ml CO₂ tạo thành. Kết quả được trình bày ở hình 1:



Hình 1. Hoạt lực lên men của 7 chủng nấm men nghiên cứu

Từ hình 1 cho thấy hai chủng D3 và D4 có hoạt lực lên men mạnh nhất, sau 10 giờ đạt 5ml CO₂. Tiếp đến là các chủng D2, D1 và D5, còn 2 chủng D7 và D6 có hoạt lực lên men yếu hơn, sau 15 - 16 giờ mới đạt 5ml CO₂. Như vậy, chủng D1, D2, D3, D4 và D5 được chọn để nghiên cứu tiếp.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu.

Tiếp 5% giống vào môi trường lên men có chứa các lượng đường sacaroza khác nhau: 120, 160 và 200 g/l, nuôi ở 28°C. Theo dõi quá trình lên men bằng phương pháp cân bình, sau 24, 48 và 72 giờ. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu

Nồng độ đường (g/l)	Ký hiệu chủng	Lượng CO ₂ giải phóng (g/50ml)			
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	Tổng
120	D1	1.02	2.75	3.25	7.02
	D2	1.25	2.79	2.87	6.91
	D3	1.65	3.65	3.95	9.25
	D4	1.75	4.01	4.25	10.01
	D5	1.60	3.16	3.50	8.26
160	D1	1.14	2.85	3.50	7.49
	D2	1.30	2.80	2.90	7.00
	D3	1.75	3.70	3.95	9.40
	D4	1.85	4.25	4.50	10.60
	D5	1.70	3.26	3.65	8.61
200	D1	0.75	1.50	2.75	5.00
	D2	1.00	1.25	2.49	4.74
	D3	1.50	2.05	3.25	6.80
	D4	1.55	2.75	3.75	8.05
	D5	1.25	1.50	2.65	5.40

Từ bảng 1 cho thấy, lượng CO₂ giải phóng/50 ml môi trường lên men ở các nồng độ đường sacaroza là 120 và 160 g/l gần như tương đương nhau, còn nồng độ đường trong dịch lên men là 200 g/l thì lượng CO₂ giải phóng ra đã giảm đáng kể, chứng tỏ khi nồng độ đường từ 200 g/l trở lên sẽ làm khả năng lên men của các chủng. Do vậy, nồng độ đường thích hợp cho lên men các chủng nghiên cứu là 160 g/l.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu

Tiếp 5% giống vào môi trường lên men có chứa các hàm lượng đường là 160 g/l, nuôi ở các thang nhiệt độ khác nhau: 10, 20, 30, 35, 40 và 45⁰C. Theo dõi lên men của các chủng nghiên cứu bằng cách quan sát sự tạo thành các bọt khí CO₂ thoát ra. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu

Ký hiệu chủng	Khả năng lên men ở các nhiệt độ khác nhau (°C)					
	10	20	30	35	40	45
D1	-	-	+	+	+	-
D2	-	-	+	+	+	-
D3	-	+	+	+	+	-
D4	-	+	+	+	+	-
D5	-	-	+	+	+	-

Ghi chú: +: Có lên men; -: Không lên men

Từ bảng 2 cho thấy hai chủng D3 và D4 lên men tốt ở nhiệt độ từ 20-40⁰C, chủng D5 lên men tốt ở 30-40⁰C, hai chủng D1 và D2 lên men ở nhiệt độ 30-40⁰C, ở dưới 10⁰C và trên 45⁰C tất cả các chủng nấm men không lên men được.

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu

Môi trường lên men chứa cồn có nồng độ 8, 10 và 12 %V, được bổ sung 50ml vào các bình tam giác 250ml, tiếp 5% giống, nuôi ở 28⁰C. Xác định ảnh hưởng của nồng độ cồn ban đầu trong môi trường đến khả năng lên men của 5 chủng nấm men nghiên cứu. Kết quả được trình bày ở bảng 3. Từ bảng 3 cho thấy nồng độ cồn 8%V có ảnh hưởng ít hơn cả đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu, ở 12%V có ảnh hưởng nhiều nhất đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu.

3.5. Ảnh hưởng của pH đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu

pH của môi trường có ảnh hưởng đến khả năng lên men của các chủng nấm men và khả năng tạp nhiễm của các vi sinh vật trong quá trình lên men, chọn pH thích hợp sẽ làm tăng hiệu suất lên men. Thí nghiệm lên men được tiến hành ở các môi trường có pH là 2, 3 và 4. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 3

Ảnh hưởng của hàm lượng cồn đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu

Hàm lượng cồn (%V)	Ký hiệu chủng	Lượng CO ₂ giải phóng (g/50ml)			
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	Tổng
8	D1	0.25	2.31	2.42	4.98
	D2	0.27	2.15	2.39	4.81
	D3	0.76	3.15	3.68	7.59
	D4	0.92	3.21	3.95	8.08
	D5	0.34	1.97	2.25	4.56
10	D1	0.20	0.62	1.41	2.23
	D2	0.17	0.55	1.35	2.07
	D3	0.50	0.71	1.69	2.90
	D4	0.50	0.95	1.70	3.15
	D5	0.24	0.35	1.39	1.98
12	D1	0.25	0.30	0.35	0.90
	D2	0.15	0.20	0.25	0.60
	D3	0.28	0.37	0.42	1.07
	D4	0.30	0.35	0.45	1.10
	D5	0.10	0.17	0.28	0.55

Bảng 4

Ảnh hưởng của pH đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu

Ký hiệu chủng	Khả năng lên men ở các pH khác nhau		
	2	3	4
D1	-	-	+
D2	-	+	+
D3	-	+	++
D4	-	+	++
D5	-	-	+

Ghi chú: ++: Lên men mạnh; +: Có lên men; -: Không lên men

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy với pH=2 tất cả các chủng không lên men, ở pH=3 chủng D1 và D5 không lên men, ở pH=4 thấy cả 5 chủng đều lên men, riêng chủng D3 và D4 thấy xuất hiện bọt khí CO₂ rất mạnh. Từ đây, có thể kết luận pH = 4 là thích hợp cho quá trình lên men của các chủng nấm men nghiên cứu.

3.6. Ảnh hưởng của nồng độ sunfit đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu

Môi trường lên men có tiếp 5% giống, nuôi ở 28°C, thời gian 24 giờ. Hàm lượng sunfit sử dụng là 50, 100 và 150 mg SO₂/l. Xác định cường độ lên men của 5 chủng nghiên cứu bằng khả năng tạo thành CO₂. Kết quả được trình bày ở bảng 5. Từ bảng 5 cho thấy chủng D1 và D5 không lên men trong môi trường có 50 mg/l sunfit, chủng D2 không lên men trong môi trường có 150 mg/l sunfit, hai chủng D3 và D4 có khả năng chịu được sunfit cao: trong môi trường có nồng độ sunfit tới 150 mg/l chủng D3 và D4 vẫn lên men.

Bảng 5

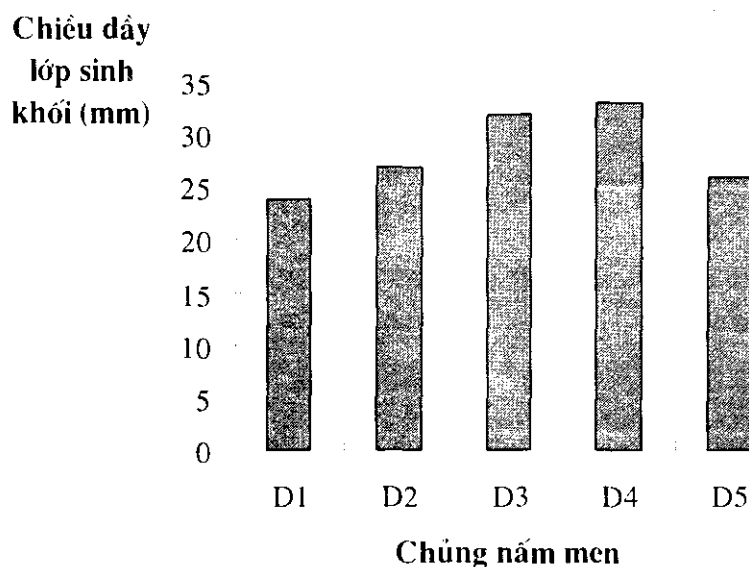
Ảnh hưởng của nồng độ sunfit đến khả năng lên men của 5 chủng nghiên cứu

Ký hiệu chủng	Khả năng lên men trên môi trường có nồng độ sunfit (mg/l) khác nhau		
	50	100	150
D1	-	-	-
D2	+	+	-
D3	+	+	+
D4	++	+	+
D5	-	-	-

Ghi chú: +: *Lên men trung bình*; ++: *Lên men mạnh*; -: *Không lên men*

3.7. Khả năng kết lắng của 5 chủng nghiên cứu

Khả năng kết lắng của 5 chủng nấm men được thể hiện ở hình 2. Từ kết quả ở hình 2 cho thấy khả năng kết lắng của chủng nấm men D1 là thấp nhất chỉ đạt 24 mm, khả năng kết lắng của chủng D3 là 32 mm và của chủng D4 đạt 33 mm.



Hình 2. Khả năng kết lắng của 5 chủng nấm men nghiên cứu

III. KẾT LUẬN

Từ 5 chủng nấm men *Saccharomyces. sp* nghiên cứu là D1, D2, D3, D4 và D5 đã chọn được 2 chủng D3 và D4 thích hợp để lên men trong các điều kiện: đường: 16"Bx, nhiệt độ: 20-40°C, đặc biệt có thể cho lên men ở dưới 20°C, pH: 3-4, nồng độ sunfit: có thể chịu được là 150 mg/l. Hai chủng này có khả năng kết lắng tốt (>28 mm).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty, 1972. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. Tập 1. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đăng Đức, Đặng Hồng Miên, Nguyễn Vĩnh Phước, Nguyễn Đình Quyến, Nguyễn Phùng Tiến, Phạm Văn Ty, 1976. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. Tập 2. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Vũ Công Hậu, 1982. Chế biến trái cây trong gia đình. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Lương Đức Phẩm, 1998, Công nghệ vi sinh vật. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Ayres J. C. et al, 1980. Microbiology of food, W. H. Freeman and Company, San Francisco.
6. Burian M. A., Chiyrina L. V, 1980. Mikrobiologiya vinodeliya, Moskva.
7. Loder J. 1971. The Yeasts, A Taxonomic Study - North Holland, Pnbl - co Amsterdam, London.

ABSTRACT

ISOLATION AND SELECTION OF YEAST STRAINS

SACCHAROMYCES. SP FOR PRODUCING WINE FROM THE GRAPE JUICE

NGUYEN THE TRANG, NGUYEN VAN HIEU, LUONG SUC PHAM

TRAN SINH MAN, NGUYEN THI DIEN

INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY

Five yeast strains of *Saccharomyces. sp*: D1, D2, D3, D4 and D5 have been isolated from grape juice and tested for brewing the wine capacity.

The effects of fermentation conditions, such as sugar, alcohol and sulfide concentrations, pH and settling capacity, were investigated for all five isolates. Among them, isolates D3 and D4 proved to be the most suitable for brewing, having rapid settling capacity of higher than 28 mm. The applied conditions were: sugar, 16^o Bx; temperature, 20^oC (or even lower) - 40^oC; pH 3 -4 and sulfide concentration 150 mg/l.

DEVELOPMENT OF STERILIZATION TECHNIQUES ON FLOWER- STALK OF ORCHID (*Dendrobium sp.*)

MINH TRI NGUYEN AND CHALERMPOL KIRDMANEE

Plant Cell Technology Laboratory

National Center and Technology Development Agency

73/1 Rama VI Road, Rajdhevee, Bangkok 10400, Thailand

I. INTRODUCTION

Dendrobium sp., usually grown for the decoration of many luxurious hotels, restaurants, Vilas, temples, pagodas, parks and house, is one of the most popular species of orchid in Thailand, especially in Bangkok. *Dendrobium sp.* can grow well in the pot or on the bottom of big woody plant with rotten bark or body of woody plant. *Dendrobium sp.* produces high cutting flower around year. Its flowers have a bright violet, delicate aroma and can keep their beauty for a long time after cutting and therefore are considered one of the most beautiful flowers (Fig.1). They are in large demands on domestic as well as foreign markets.

In this study, sterilization techniques on flower-stalk of orchid (*Dendrobium sp.*) by using node and internode should be showed with main purpose solved contamination for initiating tissue cultures.

II. MATERIAL AND METHODS

1. Material

Commercial flowers of *Dendrobium sp.* were used as the source material.

2. Method

Procedure sterilizes *Dendrobium sp.*

Flower-stalks of *Dendrobium sp.* were cleaned by removing of any dead or superfluous tissue, then washed material under running tap water for an hour. The next, explants were soaked by commercial soap solution for 15 min, then using soft silk material to clean carefully on the surface of explants. Each flower-stalks of *Dendrobium sp.* were cut by sterilize knife to smaller secessions, each secession 3 cm length and separate note secessions and internode secessions. After cutting explants were immersed in 70% ethanol for 30 sec then immersed commercial Clorox[®] solution 2% for 8 hours.

The final step, node and internode were sterilized by commercial Clorox[®] solution 30% for 30 min. Treatment 1 were sterilized by Sheaker. Treatment 2 were sterilized by Water bath. Treatment 3 were sterilized by Sheaker. Treatment 4 were sterilized by vaccum pump. After 30 min took it out of the solutions and rinsed three times in distilled sterilize water (the time between each rinsing in distilled sterilize water 30 min; 15 min; 5 min). All of node and internode of *Dendrobium sp.* were cultured on full strength MS medium (Murashige & Skoog 1962) supplemented with 30 g l⁻¹ sucrose and 7 g l⁻¹ agar. The rate of contamination of explants was obtained on day 8.

III. RESULTS AND DISCUSSION

Table 1. effected of sterilization techniques on survival percentage of node and internode of orchid (*Dendrobium sp.*)

Method	Survival of note (%)	Survival of internode (%)
Shaker (T1)	53.12c	64.69b
Water bath (T2)	33.12d	42.13c
Sonicator(T3)	81.25a	89.06a
Vaccum pump (T4)	64.06b	71.88b

Means followed by the letter in each column are significantly different at $P \leq 0.01$ level by Duncan's multiple range test.

The result in the table showed that all treatments were great significant by using different sterilization equipment.

The result conducted that survival percentage of internode of *Dendrobium* sp. was higher than survival percentage of node in every treatments. The maximum survival percent of node of *Dendrobium* sp. was 81.25% and internode was 89.06% at T3 (treatment 3, using Sonicator)

The minimum survival percentage of node was 33.12% and internode was 42.13% at T2. (Using water bate). At the treatment three using Vaccum pump sterilized explants survival percentage of node was 64.06% and internode was 71.88% at T2.

To obtain good result, we are not need have good material, worked well but also need suitable equipment to sterilize.

Sonicator was one of the most sterile equipment making strong separate fungus and bacteria out of explants so that it gave desire result.

IV. CONCLUSION

In this study, flower-stalks of *Dendrobium* sp. were sterilized by commercial Clorox® with techniques double sterilization, the result drew out better than expect. At T3 using Sonicator to sterilize the flower-stalks of *Dendrobium* sp. gave the maximum survival percent as 81.25% and 89.06% for node and internote, respectively. The minimum survival percentage of T4 as 33.12% and 42.12% for node and internode by using Water bath. This research gave the good result and developed wider many types of material of *Dendrobium* sp. using *in vitro* micropropagation. Further research on sterilization of these and other species of orchid should be conducted.

Fig 1. Flower-stalk of *Dendrobium* sp.



ACKNOWLEDGEMENTS

The author is thankful to:

The UNESCO committee, who have provided with all expenditures for the successful training course.

The leader of National Science and Biotechnology Development Agency (NSTDA), who has created best conditions for the finishment of the training course.

Dr. Kirdmanee, C. for the person who has been good-hearted helping the course

All colleagues who are working in the Laboratory of Plant cell tissues culture of National Science and Biotechnology Development Agency (NSTDA).

REFERENCE

Edwin F. George, Handbook and directionary of commercial laboratories

1994, chapter 1, page 3 to page 6.

P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp, Y.P.S. Bajaj 1986, handbook of plant cell

tissue culture, 1995, volume 5, paper 568 to paper 638.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF STERILIZATION TECHNIQUES ON FLOWER- STALK OF ORCHID (*Dendrobium sp.*)

MINH TRI NGUYEN AND CHALERMPOL KIRDMANEE

Plant Cell Technology Laboratory

National Center and Technology Devepment Agency

73/1 Rama VI Road, Rajdhevee, Bangkok 10400, Thailand

Flower-stalk of *Dendrobium sp.* used as an explant was sterilized for two times; firstly, by commercial Clorox™ 2% for 8 hrs and secondly by Clorox™ 30% for 30 min with different four sterilize equipments (1. Sheaker with condition at 25°C temperate (t°C), relative humility (RH) 75% and 60 rpm; 2. Water bath with condition at 30°C temperate, and 30 rpm; 3. Sonicator with condition at 25°C temperate (t°C 0); 4. Vacuum pump with condition at 25°C temperate). Explants were cultured on MS medium supplemented with 30 g l⁻¹ sucrose and 7 g l⁻¹ agar. All treatments were measured the survival percentage on day 8.

Result showed that treatment using Sonicator to sterilize the flower-stalks of *Dendrobium sp.* gave the maximum survival percent as 81.25% and 89.06% for node and internode, respectively. The minimum survival percentage as 33.12% and 42.12% for node and internode by using Water bath.

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ LÁ NGẢI CỨU TRONG CHỮA BỆNH Ở VIỆT NAM

LE TRINH
Bệnh viện Hữu nghị Hà Nội

ĐỖ TẤT LỢI

I - CÂY NGẢI CỨU

Cây Ngải cứu còn gọi là cây thuốc cứu, ngải diệp

Tên khoa học artemisia Vulgais L.

Thuộc họ Cúc Asteraceae (Conpositae)

Ta dùng lá có lẫn ít cành non - Folium Artémisiae - phơi hay sấy khô của cây ngải cứu. Vị thuốc còn mang tên ngải diệp (lá ngải)

Ngải cứu là một vị thuốc thông dụng cả trong Đông y và Tây y.

1.1. Mô tả cây:

Ngải cứu là một loại cỏ sống lâu năm cao 50cm - 60cm, thân to có rãnh dọc mọc sọc le, rộng, không có cuống (nhưng là phía dưới thường có cuống, xẻ thùy lông chim, màu là ở hai mặt rất khác nhau. Mặt trên nhẵn màu lục sẫm, mặt dưới màu trắng tro do có nhiều lông nhỏ trắng. Hoa mọc thành chùy kép gồm rất nhiều cụm hoa hình đầu.

1.2. Phân bố thu hái và chế biến.

Ngải cứu mọc hoang ở nhiều nơi trong nước ta còn thấy mọc ở nhiều nước khác ở Châu á, Châu Âu nữa. ở nước ta một số gia đình trồng ngải cứu có tính chất qui mô nhỏ quanh nhà. Chưa thấy trồng qui mô lớn.

Thường hái cành và lá vào tháng 6 (gần tương ứng với tết 5 tháng 5 âm lịch) phơi khô trong đám mát. Có khi hái về phơi khô tán nhỏ rây lấy phần lông trắng và tôi gọi là ngải nhung thường dùng làm mồi cứu.

1.2. Thành phần hoá học.

Hiện nay hoạt chất của ngải cứu chưa được xác định, mặc dầu ngải cứu được dùng cả trong Đông y và Tây y chỉ mới biết trong ngải cứu có tinh dầu, ít tanin. Thành phần chủ yếu của tinh dầu ngải cứu là Xineal và α - thuyon. Ngoài ra còn một ít adenin, cholin.

1.4. Tác dụng dược lý:

Tinh dầu ngải cứu thuộc các tinh dầu có tính chất làm kích thích cho say.

α - Thuyon có tác dụng hưng phấn, nhưng dùng nhiều quá có thể gây hại. Nói chung tác dụng dược lý của ngải cứu ít thấy tài liệu nghiên cứu mặc dù ngải cứu được đưa vào Dược điển của nhiều nước trên thế giới.

II. ÁP DỤNG NGẢI CỨU TRONG CHỮA BỆNH.

2.1 Trong phương pháp chữa bệnh bằng châm cứu

Người ta có thể kích thích các huyết hoặc bằng kim châm sâu vào da thịt, hoặc bằng cách đặt lên những huyết một miếng gừng tươi mỏng có châm vài lỗ để tránh cho da thịt khỏi bị cháy bỏng nhưng hơi nóng vẫn ngấm tới da thịt rồi về một nắm ngải nhưng bằng một mồi thuốc lòn đặt

lên miếng gừng mà đốt, sức nóng kích thích huyết (gọi là cứu). Sở dĩ người ta dùng lòng ngải cứu vì nó có nhiều tinh dầu, cháy lâu không tắt. (Theo tài liệu của GS. Đỗ Tất Lợi).

2.2 Chữa đau cột sống bằng hơi lá ngải cứu:

- Cách 1:

Lấy 300g lá ngải cứu đem rửa sạch để róc nước, bỏ vào nồi xào nóng cho hơi bốc lên khoảng 50 °C, bắc xuống trải ngải cứu vào một tấm chăn nilông trong có.

Để bệnh nhân nằm nghiêng, trải ngải cứu dọc theo sống lưng xong bó lại cho kín hơi. Chú ý không để lá áp vào lưng. Độ 5 phút lại cho tay vào trộn ngải cứu để hơi tiếp tục bốc nóng. Khi ngải cứu nguội dần bảo bệnh nhân nằm ngửa, đặt trực tiếp lưng đau lên ngải cứu.

Thời gian tất cả khoảng 30 phút. sau đó lấy ngải cứu ra, lau sạch lưng bệnh nhân. Dùng dầu khuynh diệp xoa bóp, có thể bấm huyết thêm.

- Cách 2:

Ngải cứu khô cuộn rất chặt thành thoi như thoi nển, dài khoảng 15cm đường kính 10-15cm đốt cháy đầu ngải cứu.

Một tay cầm khoan ngải cứu hơ vào các huyết.

(Chú ý: Đùng để bỏng bệnh nhân)

Như thường xuyên gạt tàn ngải cứu vào trong gạt tàn. Ngón tay cái của bàn tay kia ấn day vào huyết với dầu khuynh diệp. Mỗi huyết làm độ 3-4 lần trong vài giây.

- Cách 3:

Phương pháp này cũng chữa đau cột sống nhưng xông hơi là ngải cứu toàn thân.

Dụng cụ: Một túi to bằng vải nhựa rộng 80cm dài 100cm. Đầu trên hở để đầu bệnh nhân ra ngoài.

- Một ghế gỗ cao độ 50cm để bệnh nhân ngồi, lấy hơi ngải cứu qua một nồi xông cho vào túi nilông. Khi đã đủ hơi nóng cho bệnh nhân vào ngồi trên ghế. Trên mặt ghế lót một khăn bông. Trên cổ bệnh nhân cuốn một khăn bông. Đầu bệnh nhân đội mũ vải chữa mặt.

Nhiệt độ khi xông hơi lá ngải cứu khoảng 40 °C -50 °C tùy theo bệnh nhân chịu được. Bệnh nhân cởi hết quần áo khi xông. Đưa bệnh nhân một khăn bông để lau mồ hôi. Thời gian từ 15' - 20' với mức độ bệnh nhân chịu được.

- Khi xông xong cho bệnh nhân ra ngoài lau sạch mồ hôi nằm nghỉ 10'. Buồng phải kín gió, xông xoa bóp vùng cột sống với dầu khuynh diệp 10' có thể kết hợp bấm huyết.

SOME STUDIES ON THE ARTEMISIA VULGARIS IN THE TREATMENT OF ARTHRITES IN VIETNAM

LE TRINH

Hospital of Friendship, Hanoi

Do Tat Loi

I- ARTEMISIA VULGARIS, LINNAEUS.

In Vietnamese: Ngải cứu, cay thuốc cứu, cay thuốc cao.

In French: armoise, aurone

In English: Artemisia, worm-wood, mug-wort.

This is an aromatic plant, represented by several species, of the family of Asteraceae, among which the worm-wood, the absinth plant, the Alpine mug-wort, the yarrow... The Absinth-plant grow in uncultivated lands. It produces a bitter and toxic essence, used in the preparation of an alcoholic liqueur, called "absinth", now prohibited in France.

The Alpine mug-wort (genepi in French) is too an aromatic plant growing in the Alps and the pyrenees (namely in Savoy) in France. The liqueur prepared from this plant called in French "genepi", the yarrow is a common herb, having a strong smell and taste, finely divided leaves and clusters of small pink or white flowers. We grow it in kitchen-gardens as, as a good seasoning or relish for food. We use mug-worts under the form of leaves and young branches, raw or dried in the sun as well as in desiccating apparatuses. Mug-worts are also commonly used as medicinal herbs, both in oriental and occidental medicine.

1.1 Description of the plant:

The mug-wort is a herbaceous plant. It can live long years and grow to the height of 50-60cm. Its stem is robust, with longitudinal grooves. Its leaves are alternate, large, without petiole (lower leaves excepted). Each leaf reminds of a bird feather. The colour of the leaf depends on the leaf face. The upper face is smooth dark-green. The lower one is covered by long white hairs and seems ash-gray. Flowers resemble clubs with terminal inflorescence.

1.2 Distribution: Collect and preparation:

The mug-wort is a wild plant, growing nearly everywhere in our country, as well as in other countries in Asia and even in Europe. In Vietnam, mug-worts are grown in many kitchen and medicinal gardens, but only at a modest scale. The plants blossom on October-November. The collection of leaves and young branches takes place toward June, on the fifty days of the fifth lunar month. The whole stock is left to dry in the open, in places sheltered from the sun, where the air is fresh. Sometimes, dried leaves are ground and sifted to collect the white non-sticking hairs, called; 'ngai nhung' (velvet-like mug-wort), usually used as an "oakum", "slow-burning material".

In acupuncture practice, the "active spots" (huyet) are activated by needles, driven deeply into the flesh or by burning mug-wort oakum. A little slice of raw ginger, with numerous holes to let heat pass, is put on the "huyet". A pinch of mug-wort minces leaves or hair is deposited on the ginger slice then set on fire. The mug-wort pinches, burns slowly and stirs up or activates the "huyet". Mug-wort hairs are preferred to leaves, because they contain more oil and burn longer.

1.3 Chemical composition:

Till now, no one has yet discovered the "active element" of the mug-wort, though it is widely used in both oriental and occidental medicine. We know only that it contains some oil and tannin.

The mug-wort is one of the 16 plants, the growing of which is encouraged in villages. We grow a mug-wort by driving into the soil short segments of its stem. The flower part of the stem is preferred, especially if it has developed young roots.

II- TREATMENT FOR THE BACHACHE WITH ABSINTH

2.1. Absinth binding: Absinth has the scientific name of *Artemisia Vulgaris* as recorded in medicine dictionaries of many countries. The absinth leaf is very popular in the Eastern and Western medicine. It contains the essential oil anaphatyon (thuyone) which is one of the essential oils belonging to the group which can stimulate and relieve the pain instantly. In Oriental medicine, the effect of absinth leaf in softening the muscle and relieving the pain is very often mentioned.

We clean, dry up and then boil absinth leaves in a jacketed saucepan to soften them. The saucepan is tightly covered to keep the air and the essential oil secreted. When the absinth leaves get hot and evaporate, we leave them inside a piece of nylon and make them a layer about 7 or 8 cm thick.

The patient lies with the back on the absinth leaves layer. The heat depends on each patient and his bearability. We then roll up the piece of nylon tightly to keep the air hot. After 30 minutes when the absinth cools off, we take it off the pain area and do some massage for the patient.

In addition to a double boiler, we can heat absinth leaves up to the temperature about 40 °C - 50 °C. After pouring some vinegar or white-wine or alcohol 90 °C over them, we stir them up and

make them a layer about 7-8 cm thick wrapped in a piece of nylon. Then we bind it over the pain area for 30-40 minutes.

In order to keep the heat longer, we can cover the absinth leaves with a layer of paraffin once a day. Such a kind of absinth treatment should be done five-ten times:

2.2. Absinth leaf exhalation:

The quantity of absinth leaf in exhalation must be about 2-3kg or double that in the case of absinth leaf binding. We clean, put it inside the cooker, and cook in until it evaporates, and then stir it up. The patient lies dideward with a piece of nylon under his back. We leave a layer of hot absinth leaves beside his back, from the thoracic section to the waist section. We should tie it up quickly to keep the heat. We should- n't leave the absinth leaves touching the back skin to avoid burning the skin. We wrap the whole back of the patient in nylon and cover it fully with a blanket. Every 5 minutes, the operator must stir the absinth leaves with his backhands touching the patients' back. The operator makes it twice or three times. Twenty minutes later, we take out the absinth leaves, wash and dry the patient's back. This method is beter than a single layer of absinth binding because it contains much anphathyon essential oil.

2.3. Applying salt and absinth over the seat of pain:

We put hot salt inside a towel or inside a sheet of paper about 3 cm thick. We put a layer of absinth over the salt and then the patient places his back over the absinth layer.

QUELQUES RESULTATS DE RECHERCHE OUR L'ARMOISE DANS LE TRAITEMENT DES MAUX ARTICULAIRES AU VIETNAM

LE TRINH
Hopital de l'Amite', Hanoi
DOTAT LOI

I. ABSENTHES ARMOISES

Un grand nombre d' especes du genre *Artemisia* recoivent des applications multiples en dronguerie et en distilleric; a cause de leurs essences don't quel-ques-unes ont necessite' l'elaboration de lois pour de'fendre la sante' publique mnace'e par la consommation exagere'e de liqueurs renfermant notamment de l'essence d' *Artemisia Absinthium* don't le constituant principal, la thuyone, est un poison dangereux. C'est e'galement ce genre qui fournit a la therapeutique un des vermifuges les plus employe's, malgre's ses inconve'nients, la santantine, et beaucoup d' espe'ces jouissent d'une certaine re'putation anthelminthique a cause de leurs essences don't l'activite' est certaine, mais a des degre's divers.

1.1 Absinthe officinale ou grande absinthe

Artemisia Absinthium L.

On emploie les parties ae'riennes ou sommite's fleuries cueillies un peu avant la floraison

La Grande Absinthe est une plante bisannuelle vivace a tige souterraine ligneuse, dure, a tiges floriferes herbase'es, tres feuillues, pouvant atteindre 50-60 centimetres et meme plus; elle croit spontanement en grosses touffees dans les endroits incultes autour des haibitations, sur les talus des routes, les bords des chemins, dans une grande partie de la Frances, en Afrique du Nord et dans toute l'Europe centrale et meridionale.

La partie aerienne est une touffe rameuse, feuillue, a tiges cylindriques, sillonnees et se terminant par de nombreuses panicules de petits capitules; les feuilles, soyeuses, sont gris blanchatre a la face inferieure, verdatre en dessus, longuement petiolees chez les inferieures qui sont tripennatisequees; celles de la partie superieure, presque sessiles, sont divisees en lobes assez larges ou lineaires et obtus. Les capitules globuleux se composent de fleurons jaunatres femelles a la circonference, hermaphrodites au centre, entremeles de longs poils receptaculaires et entourees d'un involucre a ecailles vert blanchatre (Pl. med. Fr, no 100)

1.2 Histologie.- De nombreux poils teclers en navette, a pied pluricellulaire uniserie existent a la surface de la feuille qui porte aussi des poils secreteurs capites biseries, enfonces, avec essence

s'accumulant sous la cuticule; une seule assise différenciée de cellules palissadiques à chlorophylle (4,5, Pl. 123)

1.3 Composition Chimique.- On a isolé des feuilles: 1^o un principe amer, l' anabsinthine (absinthine de Singer et Bourcet), découvert par Duquesnel en 1886, obtenu à l'état pur par Adrian et Trillat en 1899; 2^o un autre principe cristallisé, non amer et de couleur jaune paille; 3^o une essence existant dans la proportion de 2 à 5 p.1000 de drèche sèche.

1.4 Essence.- De densité 0,925 à 0,950, elle renferme de l' alcool thuyilique plus ou moins étherifié par les acides acélique, isovalérianique et palmitique, des terpènes (phellandrene, cadinène...) et une substance huileuse non définie, mais le constituant principal est une cétone, la thuyone, accompagnée de l'alcool correspondant; elle est lévogyre, C₁₀H₁₆O, qu'on retrouve dans l'essence de Sauge, de Thuya, d' Armoise; la tanacétone de la Tanaisie est son isomère dextrogyre qui existe à côté de la thuyone dans ces mêmes espèces. L'essence d'Absinthe doit être soluble dans 2 à 4 volumes d'alcool à 90^o; elle est toujours de couleur vert bleuâtre puis, par oxydation, s'épaissit à l' air, devenant vert sombre.

La teneur dans la plante en thuyone est très variable, avec l'origine et surtout le moment de la récolte; au début de la floraison, elle est riche en thuyol et pauvre en thuyone; mais au fur et à mesure que se développe la floraison, la proportion de la cétone augmente et peut atteindre 50 p.100, le thuyol à l'état libre représentant environ 10 p.100 (Charabot et Laloue); les terpènes n'existent qu'à l'état de traces.

1.5 Pharmacodynamie et toxicité. - Douée de propriétés convulsivantes, elle est classée parmi les essences épileptisantes; elle agit sur l'appareil neuromusculaire et produit des convulsions tétaniques, des troubles sensitivo-sensoriels et psychiques avec hallucinations en rendant agressif l'animal intoxiqué. On admet, toutefois, qu'elle est deux fois moins toxique que l' essence de Sauge et deux fois plus toxique que celle d'Anis.

L'absinthisme chronique est un danger social qu'il a fallu combattre devant les manifestations d'ivresse dues aux boissons absinthiques; d'abord toutes d'un titre alcoolique élevé, de 65 à 80^o, chargées en essences de Badiane, d'Anis, à côté d'essences d'Armoise, d'Absinthe, d' Hysope, ce qui en faisait un poison complexe dans lequel il est téméraire d'affirmer que l'action nocive est due à la minime quantité d' essence d'Absinthe qu'elles renferment; en réalité, elle ne fait sans doute qu'ajouter son action à celle des autres plantes dites dangereuses, mais c'est l'essence d' Anis qui joue le rôle principal, sans oublier celui du haut titre alcoolique. Aussi a-t-on pensé qu'en abaissant sensiblement le degré alcoolique de 70^o à 35^o, la proportion d' essences dissoutes deviendrait assez faible pour que la nocivité apéritive et favorise la sécrétion du suc gastrique. La réputation de la plante comme abortif est très exagérée, car il en faudrait absorber des doses toxiques pour la même.

1.6 Armoise commune

Espèce extrêmement répandue dans les décombres, aux bords des chemins, de l' Europe entière jusqu' à la Sibérie; on utilise la feuille, renommée comme remède populaire emménagogue

Grande plante robuste, pubescente, mœuse atteignant jusqu'à 1 m. 20 et même 1 m.50, portant des feuilles simplement lobées ou bilobées, auriculées à la base. Les divisions oblongues-lancéolées glabres en dessus et vert brunâtre, sont blanches et tomenteuses en dessous. Les capitules presque sessiles sont groupés en panicule feuillée. Tous les rameaux se terminent par des grappes de petits capitules de fleurs jaunâtres murissant en juin-juillet; le fruit est un akène glabre. Une espèce de plus en plus abondante sur les voies de chemins de fer, l' *A. Verlotorum* Lamotte, se substitue peu à peu à l' Armoise vulgaire; elle se distingue par sa souche émettant des rejets et par ses feuilles à lobes presque égaux et ses fleurs rougeâtres.

On récolte l'Armoise pour l'herboristerie qui en consomme de grosses quantités, la plante étant un remède populaire tonique et antispasmodique comme aussi emménagogue.

II. EMPLOI DES FEUILLES D'ARMOISE DANS LE TRAITEMENT DES DOULEURS

LOMBAIRES

2.1 Compresse de feuilles d' Armoise

Le nom scientifique d' l' armoise est *Artemisia vulgaris*, cite dans le Codex de nombreux pays. Les feuilles d'armoise sont communement employees dans la medecine occidentale. Elles contiennent une essence appelee alpha-thyone. Cette essence a en meme temps un effet stimulant local et un effet sedatif egaleme local. La medecine orientale parle beaucoup de son double effet: ramollir les muscles et reduire la douleur.

Prendre des feuilles d'armoise; les laver avec de l'eau; les laisser s's egoutter; les mettre dans une marmite et les laisser dans ce bain-marie pour qu'elles se ramollissent; bien couvrir la marmite pour ne pas laisser s'envoler la vapeux et l'essence. Quand les feuilles d'armoise sont suffisamment chaudes et imbibees d'essence, les mettre sur une piece de nylon, en un tas d'epaisseur de 7 a 8 cm. Le patient reste dans la position couchee sur le dos, avec son dos applique' a la couche de feuvite' soit reduite et l'experience a montre' la justesse du raisonnement.

L' usage des liqueurs dites "similaires d' Absinthe" est regi par la loi du 16 mars 1915, modifiee par la loi du 17 juillet 1922 qui definit ainsi les liqueurs incriminees:

" Tous le spiritueux don't la saveur et l' odeur dominantes sont celles de l'anis et qui donnent par addition de 4 vol. De'eau distillee a+15° un trouble ne disparaissant pas par une nouvelle addition de 3 vol. D'eau distillee a+ 15°"

Sont egaleme considerees comme similaires d'absinthe, les spiritueux anises repondant aux exigences ci-dessus, mais renfermant une essence ce'tonique qui peut provenir des especes vegetales suivantes. Grande Absinthe, Tanaisie, Carivi, Sauge, Fenouil, Hysope et la circulaire du 15 decembre 1922 fixe les reactions qui permettent de reconnaitre la presence d'essences contenant des cetones: reaction d Legal = Coloration rouge sang par addition de soude et de nitroprussiate de sodium, puis d'un peu d' acide acetique.

Il est toutefois bon d'ajouter que l' infusion de feuilles d' Absinthe est douee de proprietes ameres lles d'armoise, portee a la temperature la plus elevee que le patient peut supporter. Envelopper le patient et son tas de feuilles d'armoise dans la piece de nylon pour conserver la chaleur le plus longtemps possible.

Hormis la methode du bain-maire, on peut terreferier tres modereement les feuilles d'armoise de 40-50°C seulement; ensuite, verse sur le tas un peu de vinaigre, d'alcool 90° ou de vin blanc. Bien melanger le tout. Etaler les feuilles en une couche de 7 a 8cm d'epaisseur sur une piece de nylon avec laquelle on enveloppe le torse douloureux du patient durant 30a 40 minutes.

2.2 Compresses de sel et d.armoise

Le sel torrefie et encore chaud est etendu en une couche de 3 cm d'epaisseur sur une serviette ou une feuille de papier. Ettendre une couche de feuilles d'armoise sur la couche de sel. Le patient se couche sur le dos sur la couche double de sel et de feuilles d'armoise.

2.3 Compresse de vapeur d'armoise

Le nombre de feuilles d'armoise employees doit etre le double de celles utilisees pour les compresses (environ 2 a 3 kg de feuilles). Bien laver les feuilles. Les mettre dans une marmite et les laisser mijoter jusqu' a ce que la vapeur s'echappe abondamment. Le patient est couche sur le cote, sur d'armoise chauffes tout pres du dos (du dos a la region lombaire); envelopper rapidement le tout dans la piece de nylon, pour ne pas laisser a la chaleur le temps de se dissiper. Eviter de mettre le dos en contact direct avec les feuilles pour préserver le dos des brulures. Ettendre la partie restante de la piece de nylon sur le dos (recouvrir le dos avec le dos du patient par une couverture epaisse. Toutes les 5 minutes, glisser la main dans la couverture, avec le dos le la main touchant la peau du dos du patient et remuer doucement le tas de feuilles pour faire echapper de nouvelles bouffees de chaleur. Repeter 2 a 3 fois. Enlever l' armoise et essuyer la dos avec une serviette propre puis, le laisser secher. Cette methode est plus efficace que celle des compresses parce que les vapeurs des feuilles d'armoise sont saturees d' essence d'alpha-thyone.

2.4 Brain de vapeur d' Armoise

Le maledé se met. Sur un peeht Labouret-II est bien entoure d'un grand morceau de nglon, hermitiquemat ferme fair une fermetime on y fait venir un courant de vafeur d' Armoise themperature environ 25-30°- Apres 15-20 minutes le malates ont en pleine transfunatin, on fait soetir le malade-Bien enuyer et affectuer un masage pour lui.

SỬ DỤNG KỸ THUẬT IN - VITRO ĐỂ NHÂN NHANH CÂY ACTISÔ

KHUẤT HỮU TRUNG, NGUYỄN PHƯƠNG ĐOÀI, DƯƠNG LAN OANH,
NGUYỄN HUỖNH MINH QUYÊN, NGUYỄN HỮU ĐỒNG
Viện Di truyền Nông nghiệp

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Actisô (*Cynara scolymus* L.) thuộc họ Cúc (*Asteraceae*) là một loại cây dược liệu quý có chứa nhiều axit amin, muối hữu cơ của các kim loại K, Ca, Mg, Na..., các chất bổ dưỡng cho gan và rất giàu vitamin C. Actisô là vị thuốc chữa gan mật lâu đời tại nhiều nước, có tác dụng lợi mật, tăng thải trừ các chất thải của mật, giảm cholesterol trong máu, giảm ure-máu, giảm lipit - máu, giúp bảo vệ gan nhất là trong ngộ độc rượu. Actisô có thể dùng để uống hàng ngày giúp thông mật, nhuận tràng, lợi tiểu, tẩy rửa các chất cặn bã trong gan, làm giảm stress.

Actisô có thể được chế biến thành chè uống, được chiết xuất rồi đóng thành viên hay được dùng dưới dạng thuốc tiêm .v.v.

Trên thế giới, cây Actisô rất phổ biến và được trồng ở các vùng ôn đới như Địa Trung Hải, Bắc Trung Quốc và Nhật Bản. Ở Việt Nam, cây Actisô đã được di thực khoảng trên 100 năm, trồng tại các vùng cao, mát như Tam Đảo (Vĩnh Phúc), Đà Lạt (Lâm Đồng), Sapa (Lào Cai). ở những vùng này, cây Actisô tỏ ra khá thích hợp với những điều kiện khí hậu và đất đai. Cây sinh trưởng và phát triển tốt, cho năng suất cao, có thể đạt hàng năm 1kg củ và 5-7 kg lá tươi/cây. Hiện nay, Actisô đã được chế biến và sử dụng rộng rãi với nhu cầu trong nước và xuất khẩu ngày càng tăng.

Do vậy, nhu cầu sản xuất cây Actisô hiện nay là rất lớn. Tuy nhiên, nếu chỉ dùng những phương pháp nhân giống cổ truyền (bằng hạt và nhân vô tính) thì không đủ đáp ứng cây con giống. Khả năng kết hạt của cây Actisô rất thấp do có cụm hoa hình đầu ở ngọn các nhánh gặp điều kiện thời tiết ẩm, mưa nhiều rất khó kết hạt. Mặt khác, nhân giống vô tính bằng cách tách chồi con cũng rất chậm vì trong tự nhiên cây Actisô ít đẻ nhánh.

Với những lý do nêu trên, chúng tôi chọn đề tài: "*Sử dụng kỹ thuật in-vitro để nhân nhanh cây Actisô*" nhằm đáp ứng nhu cầu cây con giống phục vụ sản xuất trên qui mô lớn, đại trà.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Mẫu nuôi cấy là chồi đỉnh của cây con (đã có từ 5-7 lá, cao 20 - 30 cm).

- Môi trường nuôi cấy in - vitro:

+ Môi trường tái sinh chồi và nhân nhanh: Môi trường MS (Murashige & Skoog) cải tiến, pH \approx 6,0 có bổ sung các vitamin, 10% nước dừa; 6,5 g/l agar, 3% đường và chất điều hoà sinh trưởng (BAP, Kinetin) với các nồng độ khác nhau.

+ Môi trường tạo rễ: Môi trường có thành phần khoáng MS/2, pH ≈ 6,0 có bổ sung các vitamin; 6,5 g/l agar, 2% đường, than hoạt tính và các nồng độ NAA khác nhau.

2. Phương pháp nghiên cứu

Cây con được rửa sạch bằng xà phòng, cắt bỏ lá, sau đó rửa nhiều lần bằng nước cất và khử trùng bằng cồn 70% trong 30 giây. Tiếp tục xử lý mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 5 phút rồi rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Các đỉnh sinh trưởng có kích thước khoảng 2-3 mm được tách ra rồi cấy vào môi trường tái sinh để tạo chồi.

Các mẫu được cấy vào bình tam giác 250ml, dung tích môi trường là 50-60ml/bình và nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ phòng 22-25°C, chiếu sáng 1500-2000 Lux với thời gian 10h/ngày. Sau vài ngày nuôi cấy, các chồi non bắt đầu xuất hiện. Các chồi non được tách ra và cấy chuyển sang môi trường tương tự để nhân nhanh.

Sau vài lần cấy chuyển, các cây đủ tiêu chuẩn được tách ra và cấy vào môi trường để tạo rễ.

Cây con đủ tiêu chuẩn (cao 5-7 cm, lá màu xanh đậm, bộ rễ khỏe) được đưa ra cát để chăm sóc và huấn luyện trước khi trồng.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

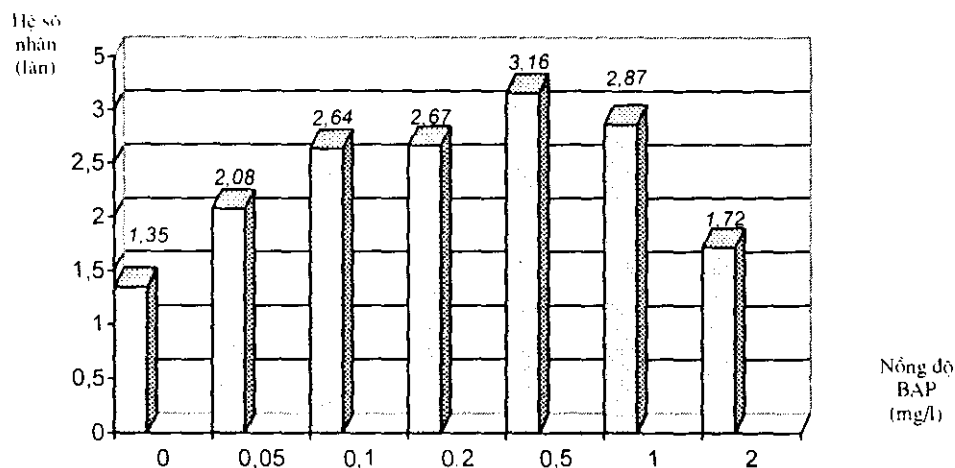
Chúng tôi đã tiến hành thăm dò và nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp cấy và một số chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tạo chồi, đặc điểm hình thái chồi và khả năng tạo rễ của cây Actisô.

1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến hệ số nhân chồi sau 2 tuần nuôi cấy

Khả năng nhân chồi của cây Actisô trong điều kiện nuôi cấy in-vitro là rất lớn, sau 2 tuần nuôi có thể tách để nhân cụm chồi. Hệ số nhân chồi khác nhau rõ rệt ở các nồng độ BAP khác nhau (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của các nồng độ BAP khác nhau đến hệ số nhân và đặc điểm hình thái chồi Actisô

Công thức MT	Nồng độ BAP(mg/l)	Số chồi cây	Số chồi tạo thành	Hệ số nhân (lần)	Đặc điểm chồi
C ₁	0	100	135	1,35	Cao, gầy, xanh đậm
C ₂	0,05	200	415	2,08	Cao, gầy, xanh đậm
C ₃	0,1	200	528	2,64	Thấp, khoẻ, xanh đậm
C ₄	0,2	200	533	2,67	Thấp, khoẻ, xanh đậm
C ₅	0,5	200	632	3,16	Thấp, khoẻ, xanh nhạt
C ₆	1	100	287	2,87	Xanh nhạt, mọng nước
C ₇	2	100	172	1,72	Vàng nhạt, mọng nước, chồi bị biến dạng



Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến hệ số nhân chồi Actisô

Qua bảng 1 cho thấy:

- Ở công thức môi trường C₁, không có BAP, hệ số nhân chồi rất thấp, sau vài lần cấy chuyển chồi gần như không đẻ, chiều cao tăng nhanh.
- Hệ số nhân chồi tăng khi nồng độ BAP tăng, khi nồng độ BAP cao hơn 1mg/l thì hệ số nhân chồi giảm. Nếu tiếp tục tăng nồng độ BAP lên thì hệ số nhân chồi giảm mạnh, chồi mọc nước và bị biến dạng, lá rất giòn và dễ gãy.
- Hệ số nhân chồi sau 2 tuần nuôi cấy đạt giá trị cao nhất là 3.16 ở môi trường C₅ với nồng độ BAP 0.5 mg/l.

2. Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến hệ số nhân chồi sau 2 tuần nuôi cấy

Bảng 2: Ảnh hưởng của các nồng độ Kinetin khác nhau đến hệ số nhân và đặc điểm hình thái chồi Actisô.

Công thức MT	Nồng độ Kinetin (mg/l)	Số chồi cây	Số chồi tạo thành	Hệ số nhân (lần)	Đặc điểm chồi
C ₈	0	200	262	1,31	Cao, gầy, thân thẳng xanh đậm
C ₉	0,05	200	303	1,52	Cao, gầy, thân thẳng xanh đậm
C ₁₀	0,1	200	484	2,42	Cao, khoẻ, thân thẳng xanh đậm
C ₁₁	0,2	200	491	2,46	Cao, khoẻ, thân thẳng xanh đậm
C ₁₂	0,5	200	575	2,87	Cao, khoẻ, xanh đậm
C ₁₃	1	200	594	2,97	Thấp, khoẻ, xanh nhạt
C ₁₄	2	100	192	1,92	Xanh nhạt, mọc nước, héo ở đầu lá

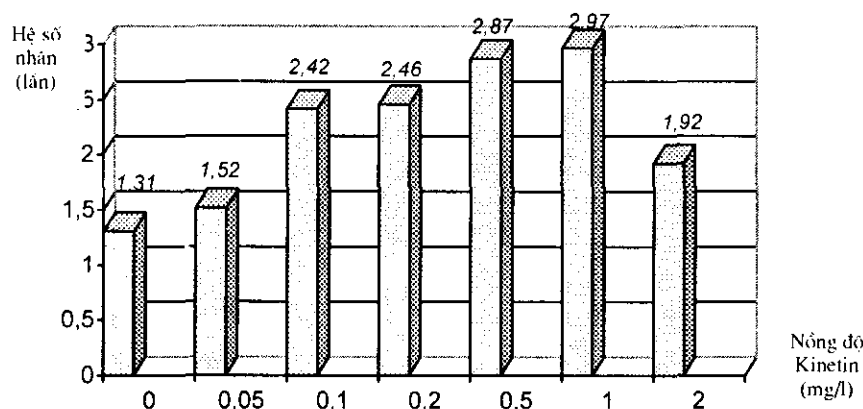
Hệ số nhân chồi của cây Actisô rất cao trong môi trường có nồng độ BAP thấp (0,05 đến 0,5mg/L). Sau 2 tuần nuôi cấy hệ số nhân có thể đạt hơn 3 lần nhưng chồi Actisô phản ứng rất nhạy cảm với môi trường nuôi cấy, chồi rất hay bị mọng nước chuyển màu và biến dạng. Trong môi trường sử dụng Kinetin thì hệ số nhân thấp hơn so với môi trường bổ sung BAP có cùng nồng độ nhưng tỉ lệ mọng nước giảm hẳn, kết quả chỉ ra ở bảng 2.

Qua bảng 2 cho thấy:

- Trong môi trường bổ sung Kinetin hệ số nhân chồi tăng khi nồng độ Kinetin tăng từ 0 đến 1mg/l.

- Đặc điểm hình thái: chồi cao, thân thẳng lá có màu xanh đậm, ít bị mọng nước và ít bị biến dạng hơn so với môi trường có bổ sung BAP.

- Hệ số nhân chồi sau 2 tuần nuôi cấy đạt giá trị cao nhất là 2,97 ở môi trường C₁₃ với nồng độ Kinetin 1mg/l nhưng chồi có màu xanh nhạt và bắt đầu có hiện tượng mọng nước. Trong môi trường có nồng độ Kinetin 0,5mg/l hệ số nhân chồi thấp hơn nhưng chồi cao, khoẻ, lá có màu xanh đậm.



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến hệ số nhân chồi Actisô.

3. So sánh 2 phương pháp cấy từng chồi riêng rẽ và cấy cụm chồi (3 - 4 chồi/cụm) đến hệ số nhân chồi Actisô.

Chúng tôi đã tiến hành so sánh hệ số nhân chồi giữa 2 phương pháp tách từng chồi riêng rẽ rồi cấy vào môi trường và cấy từng cụm 3-4 chồi/cụm, (bảng 3).

Bảng 3: Hệ số nhân chồi sau 2 tuần nuôi cấy của cây Actisô

Công thức MT	Cây 1 chồi			Cây cụm chồi		
	Số chồi cây	Số chồi tạo thành	Hệ số nhân (lần)	Số chồi cây	Số chồi tạo thành	Hệ số nhân (lần)
C ₁₅	100	115	1,15	200	415	2,08
C ₁₆	100	150	1,50	200	528	2,64
C ₁₇	100	156	1,56	200	533	2,67
C ₁₈	100	180	1,80	200	632	3,16
C ₁₉	100	182	1,82	100	287	2,87

Qua bảng 3 cho thấy: Có sự khác nhau rõ rệt về hệ số nhân chồi giữa hai phương pháp cấy từng chồi riêng rẽ và cấy cụm chồi. Hệ số nhân chồi ở phương pháp cấy cụm chồi cao hơn từ 2-3 lần so với phương pháp cấy từng chồi riêng rẽ. Khi cấy từng chồi riêng rẽ, ảnh hưởng của các nồng độ BAP khác nhau đến hệ số nhân là không rõ rệt, cây cao, gầy và yếu.

4. Ảnh hưởng của NAA và than hoạt tính đến khả năng tạo rễ của cây con

Những cây con tương đối đồng đều, cao 5-7 cm được cấy vào các môi trường tạo rễ có hoặc không có than hoạt tính với các nồng độ NAA khác nhau và để thăm dò khả năng tạo rễ. Kết quả chỉ ra ở bảng 4.

Qua bảng 4 cho thấy: Trong các môi trường có than hoạt tính không thấy xuất hiện rễ trụ, rễ có màu trắng, rất dài và yếu. Ở môi trường R_8 và R_{10} có trung bình số rễ/cây cao, có rễ trụ to, nhiều rễ nhánh. Trong môi trường R_8 rễ xuất hiện sớm và dài nhanh hơn các môi trường khác. Trong môi trường R_{11} và R_{12} rễ xuất hiện muộn và phát triển rất chậm. Rễ nhánh và rễ trụ đều to (MT R_{11}); hoặc không phân biệt được rễ trụ và rễ nhánh (MT R_{12}).

Bảng 4. Ảnh hưởng của các nồng độ NAA và than hoạt tính đến sự hình thành rễ sau 3 tuần nuôi cấy

Công thức MT	Số cây cấy	Tỷ lệ ra rễ (%)	Trung bình số rễ/cây	Độ dài rễ (cm)	Đặc điểm rễ
R_0	100	18	1	10-12	Nhỏ, trắng, ít nhánh
R_1	100	29	1	10-12	Nhỏ, trắng, ít nhánh
R_2	100	55	3	10-12	Nhỏ, trắng, ít nhánh
R_3	100	59	3	8-10	Nhỏ, trắng, ít nhánh
R_4	100	65	5	8-10	Nhỏ, trắng, ít nhánh,
R_5	100	72	6	8-10	Nhỏ, trắng, ít nhánh
R_6	100	37	6	8-10	Nhỏ, trắng, ít nhánh
R_7	100	55	3	3-5	Nhỏ, trắng đục, ít nhánh
R_8	100	92	7	3-5	Có rễ trụ to, trắng đục, nhiều nhánh
R_9	100	80	5	2-3	Có rễ trụ to, trắng đục, nhiều nhánh
R_{10}	100	91	7	2-3	Có rễ trụ rất to, trắng đục, nhiều nhánh
R_{11}	100	92	6	0,5-1	Có rễ trụ rất to, trắng đục, rễ nhánh to
R_{12}	100	83	6	0,5-1	Khó phân biệt rễ trụ và rễ nhánh

Ghi chú: Các công thức môi trường được sử dụng để nghiên cứu sự ra rễ của cây Actisô:

- R_0 : MS/2 + 2% Đường + 0,1% than hoạt tính
- R_1 : MS/2 + 2% Đường + 0,1% than hoạt tính + 0,1mg/l NAA
- R_2 : MS/2 + 2% Đường + 0,1% than hoạt tính + 0,5mg/l NAA
- R_3 : MS/2 + 2% Đường + 0,1% than hoạt tính + 1mg/l NAA
- R_4 : MS/2 + 2% Đường + 0,1% than hoạt tính + 2mg/l NAA
- R_5 : MS/2 + 2% Đường + 0,1% than hoạt tính + 3mg/l NAA
- R_6 : MS/2 + 2% Đường + 0,1% than hoạt tính + 4mg/l NAA
- R_7 : MS/2 + 2% Đường + 0,1mg/l NAA
- R_8 : MS/2 + 2% Đường + 0,5mg/l NAA
- R_9 : MS/2 + 2% Đường + 1mg/l NAA
- R_{10} : MS/2 + 2% Đường + 2mg/l NAA
- R_{11} : MS/2 + 2% Đường + 3mg/l NAA
- R_{12} : MS/2 + 2% Đường + 4mg/l NAA

VI. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được như trên chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Môi trường thích hợp để tạo cụm chồi và nhân nhanh là môi trường C₅ (có chứa 0,5mg/l BAP)
- Cây 3-4 chồi/cụm cho hệ số nhân cao hơn cây riêng rẽ từng chồi.
- Môi trường tạo rễ thích hợp nhất là môi trường R_x (có chứa 0,5mg/l NAA).
- Than hoạt tính kích thích sự hình thành và xuất hiện rễ sớm, rễ phát triển nhanh nhưng yếu.
- Trong môi trường ra rễ, tỷ lệ ra rễ và trung bình rễ/cây tăng khi nồng độ NAA tăng nhưng nồng độ NAA quá cao thì rễ xuất hiện muộn và phát triển rất chậm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1- Từ điển bách khoa dược học, nhà xuất bản Từ điển bách khoa, Hà nội 1999, Tr 15.
- 2- Tân Mai - Khả năng phát triển Actisô, Báo KH phục vụ sản xuất & đời sống.
- 3- Lê Khả Kế - Cây cỏ thường thấy ở Việt nam, Tập I, trang 270, nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật - 1969.
- 4- Lê Thị Ngọc Diệp - Kết quả nghiên cứu tác dụng của Actisô đối với viêm gan thực nghiệm trên chuột cống trắng. Khoa học kỹ thuật thú y, 1997. Tr 73-77.
- 5- Lê Thị Ngọc Diệp - Tác dụng kháng histamin của dược liệu Actisô. Khoa học kỹ thuật thú y, 1997. Tr 68-70.
- 6- Đỗ Tất Lợi - Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, 1997. Tr 238.

SUMMARY

USING IN-VITRO TECHNIQUE IN ARTICHOKE

(*CYNARA SCOLYMUS L.*) RAPID MULTIPLICATION

KHUAT HUU TRUNG, NGUYEN PHUONG DOAI, DUONG THI LAN OANH,

NGUYEN HUYNH MINH QUYEN, NGUYEN HUU DONG

Agricultural Genetics Institute

We are now trying to find out the optimum condition for Artichoke plant multiplication by in-vitro technique. The results showed that:

1. The suitable culture medium for shoot formation and multiplication of Artichoke plant is C₅ (MS medium supplemented with vitamins, 10% coconut milk, 3% sugar and 0.5 mg BAP/l).
2. The selected culture medium for formation of roots is R_x (MS medium supplemented with vitamins, 2% sugar and 0.5 mg NAA/l).
3. In in-vitro condition, a cluster of 3-4 shoots grew much better than one.
4. In culture medium contained active carbon (coal) root system stimulated early and lengthen rapidly but feebly.
5. In culture medium for root formation the root rate and roots/plant coefficient increasing when NAA concentration increasing parallel but with too high NAA concentration root system was lately formed and developed slowly.

MỤC LỤC

TT	TÊN TÁC GIẢ	TÊN BÀI	Trang
		Lời giới thiệu	3
1	Trần Thị Ngọc An	Nghiên cứu đặc điểm nhiễm độc các hoá chất trừ sâu lên một số chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá của cư dân các tỉnh duyên hải miền Trung Việt Nam	5
2	Tô Kim Anh	Cải tiến phương pháp bùn hoạt tính nhằm xử lý các hợp chất nitơ có trong nước thải	10
3	Đặng Hồng Ánh, GOTO NAMI	Nghiên cứu vai trò của Acetaldehyde dehydro — genase ADL2/3 acetyl coa hydrolase achi trong việc tổng hợp axit axetic do <i>saccharomyces cerevisiae</i> trong quá trình lên men cồn	17
4	Ngô Thuỳ Anh, Nguyễn Văn, Yokosawa	Tạo dòng tế bào nấm men	26
5	Nguyễn Anh, Trịnh Thị Kim Thoa	Nghiên cứu hoạt tính enzym huyết thanh ở một số giống dê lai F ₁ và so sánh với các giống dê nội, ngoại nuôi ở Việt Nam	31
6	Đỗ Hữu Ất, Thuỳ, TD Quý, Nguyễn Hữu Đống	Improving importid quality rice...	36
7	Nguyễn Liêu Ba, Lê Văn Nhung, Nguyễn Thị Dự	Nghiên cứu quá trình lên men tổng hợp proteaza kiềm của chủng <i>B.Brevis B₁</i> phân lập tại Hà Nội	39
8	Nguyễn Quốc Bình, Dominique Michaud	Les plantes trangéniques résistantes Aux insectes herbivores nuisibles	45
9	Nguyễn Việt Cường, Phan Thị Khánh Hoa, Lê Thanh Bình	Tương quan giữa pH và sinh tổng hợp nisin của <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .1	52
10	Phạm Thị Trân Châu, Phan Thị Hà, Mai Ngọc Toàn, Trịnh Hồng Thái, Nguyễn Quỳnh Uyển, Hoàng Thu Hà, Trần Quang Tấn, Hoàng Thị Việt, Trần Đình Phả, Phạm Anh Tuấn, Lương Thanh Cù	Tác dụng trừ sâu hại rau của chế phẩm Momosertatin tách từ hạt gác (<i>momordica cochinchinensis</i>)	57
11	Phan Văn Chi	Nghiên cứu tạo immunotoxin tái tổ hợp	
12	Nguyễn Thị Phương Chi, Lý Kim Bảng, Tăng Thị Chfnh, Lê Gia Hy, Phạm Thanh Hà, Hồ Kim Anh, Phan Tuyết Minh, Lê Thanh Xuân, Nguyễn Thị Quỳnh Mai	Sử dụng công nghệ vi sinh trong sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh	69
13	Tạ Kim Chính, Hà Thị Quyển, Hoa Thị Minh Tú	Lựa chọn môi trường nhân nuôi và tạo chế phẩm diệt mối từ <i>metarhizium anisopliae</i>	77

International Workshop on Biology. Hanoi - Vietnam 2-5 July 2001

14	Vũ Thị Chi, Mai Phú Quý, Phạm Thị Lai	Nghiên cứu nhân nuôi sâu đục thân ngô <i>Ostrinia nubilalis</i> Hubn (Lep. Pyralidae) bằng thức ăn nhân tạo	82
15	Đặng Thị Chín	Nghiên cứu đặc điểm nông sinh học của một số giống cà chua trồng trong vụ đông xuân và xuân hè tại Bình Định	86
16	CULIVE J. PEGG	Public acceptance of crop biotechnology	91
17	Trịnh Đình Đạt, Đỗ Quỳnh Hoa, Nguyễn Thị Minh Nguyệt	Nghiên cứu hệ izozym Esteraza liên quan đến tính kháng thuốc trừ sâu lân hữu cơ ở sâu tơ (<i>Plutella xylostella</i>)	95
18	Lê Thị Tuy Dương, Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Ngọc Dao	Nghiên cứu phương pháp tách chiết và cố định penicilin Acylase	100 *
19	Trình Ngọc Diệu, Nguyễn Nguyễn Hy, Lê Huy Ham, Hoàng Thuy Duong, Do Nang Vinh	Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường - dung dịch nuôi cấy, tưới bón nhiễm từ lên hiệu quả nuôi cấy bao phấn một số giống ngô trong hệ thống nuôi cấy in vitro và ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp	105
20	Nguyễn Hữu Đống, Đinh Xuân Linh, Ngô Xuân Nghiễn, Lê Hồng Vinh, Nguyễn Thị Sơn, Thân Đức Nhã, Nguyễn Thị Bích Thùy	Kết quả nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nấm ăn và nấm dược liệu trên bã mía	113
21	Lê Tiến Dũng, Nguyễn Kim Vũ, Vũ Văn Vụ	Một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình bảo quản rau cải canh và xà lách	120
22	Le Tien Dung, Tran Dinh Long	Results on Growth, Yield and seed quality of some peanut mutant varieties in central Vietnam	125
23	Nguyễn Lan Hương, Lê Văn Nhuong, Hoàng Đình Hoà	Những biến đổi trong quá trình ủ lá mía thành phân bón hữu cơ	134
24	Hồ Phú Hà, Hoàng Đình Hoà, Nguyễn Thị Hiền, Võ Thị Lý	Ảnh hưởng của nồng độ nấm men gieo cấy đến các đặc tính kỹ thuật của nấm men bia	139
25	Nguyễn Thu Hà, Nguyễn Ngọc Quyên, Vũ Thị Minh Đức	Phân lập, tuyển chọn chủng <i>Azotobacter</i> cho sản xuất phân bón vi sinh vật	144
26	Nguyễn Thu Hà, Nguyễn Thị Hiền Trương Thị Hoà, Nguyễn Mạnh Đạt, Trương Hương Lan, Phạm Anh Tuấn	Vai trò của oxy trong lên men bia nồng độ cao	149
27	Nguyễn Thanh Hằng, Phạm Thu Thủy	Nghiên cứu nâng cao chất lượng rượu vang nho việt nam	158
28	Nguyễn Thị Hiền, Lê Thanh Mai, Lê Quang Hoà	Nghiên cứu quá trình nảy mầm của thóc P4 để ứng dụng cho sản xuất bia	160
29	Vu Tuyen Hoang, Nguyen Tan Hinh, Nguyen Manh Son, Huynh Yen Nghia, Nguyen Thi Nga	USE OF ANTHER CULTURE IN RICE IMPROVEMENT	167

30	Lai Thuý Hiên, Đỗ Thu Phương, Phạm Thị Hằng, Vương Thị Nga, Nguyễn Văn Long, Kiều Quỳnh Hoa, Lê Phi Nga, Lê Như Tiêu, Nguyễn Thị Phúc, Nguyễn Văn An	Vi khuẩn khử sunphat siêu nhiệt và chịu áp, phân lập từ giếng khoan dầu khí mỏ Bạch Hổ, Vũng Tàu	168
31	Trương Thị Hòa, Trương Hương Lan, Nguyễn Thu Hà, Nguyễn Thị Thi, Lại Quốc Phong	Nghiên cứu trích ly các hoạt chất sinh học từ nấm linh chi	175
32	Le Thanh Hoa, David Blair, Donald P. McManus	A Eukaryotic Leucine Zipper Protein of Mitochondrial Origin	182
33	Le Thanh Hoa, David Blair, Donald P. McManus	Leucine Zipper-like motifs in nuoK protein of prokaryotes	189
34	Le Thanh Hoa, David Blair, Donald P. McManus	Mitochondrial genomics of parasitic platyhelminths	193
35	Trần Quỳnh Hoa, Lê Băng Sơn, Nguyễn Thị Lợi, Hoàng Tuấn Anh, Nguyễn Thị Nguyệt, Bùi Phương Thuận, Đặng Đức Trạch và Nguyễn Thị Hồng Hạnh	Sự đứt đoạn của hai nucleotit ở đầu 5' gen <i>cagA</i> của vi khuẩn <i>Helicobacter pylori</i> , chủng Việt nam.	198
36	Nguyễn Nguyên Hy	Đặc điểm topology yếu tố từ trường sinh thể và Khả năng nhận biết chúng qua dấu hiệu cấu trúc chức năng của thân kính	207
37	Nguyễn Như Khanh, Võ Minh Thứ	Sử dụng clorat kali(KClO ₃) để tăng năng suất và cải thiện phẩm chất lúa trồng trên đất nhiễm mặn và chua mặn	213
38	Phạm Đăng Khoa, Vũ Triệu An	xác định typ hla-dr bằng kỹ thuật pcr-ssp	221
39	Trần Văn Lại, Lê Thị Thủy, Phạm Ngọc Lý	Nghiên cứu công nghệ ghép trong sản xuất rau ăn quả và cây ăn quả	224
40	Trương Hương Lan, Trương Thị Hòa, Nguyễn Thu Hà, Lại Quốc Phong	<i>Nghiên cứu ảnh hưởng của nấm men đến hàm lượng Diacetyl trong quá trình lên men bia</i>	232
41	Tran Thi Le	Investigation on the significance of abscisic acid for somatic embryogenesis of some <i>Daucus</i> species inclusive transgenic strains	238
42	H.P. Lien, D.T. Thuy, N.A. Tuan, N.H. Hanh, N.K. Viet, L.X. Mai, N.D. Tien	Technology for Japanese encephalitis (je) vaccine production in Vietnam and quality evaluation	244
43	Nguyen Thi Loc, Huynh Van Nghiep, Nguyen Thi Nhan, Pham Quang Hung, Vu Tien Khang and Nguyen Van Luat	Biocontrol potential of some entomogenous fungi against insect pests of rice crop	248
44	Nguyen Thi Loc, Angharad M.R. Gatehouse, Paul Christou & John A. Gatehouse	USING "CLEAN" DNA TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF TRANSGENIC RICE PLANTS EXPRESSING AGRONOMICALLY IMPORTANT TRAITS.	256

45	Tran Dinh Long and A Ramakrishna	Sustaining Agricultural Productivity in the Rainfed Sloping Lands of Northern Vietnam	262
46	Phạm Đình Long	Mối quan hệ giữa thể trọng, tuổi thành thực sinh dục đến chất lượng sinh sản của ba ba (Pelodiscus sinensis)	272
47	Phạm Đình Long	Một số chỉ tiêu huyết học của Baba trơn (Pelodiscus sinensis, Wiegman 1834)	275
48	Nguyễn Tài Lương, Nguyễn thị Vinh, Đoàn Việt Bình, Nguyễn Huy Nam, Nguyễn Kim Dung Dương nghiệp Chí, Nguyễn Ngọc Cừ, Lê Quý Phương	ứng dụng công nghệ sinh học và kinh nghiệm y học dân tộc tạo chế phẩm thực phẩm -thuốc cho vận động viên.	279
49	Lê Thanh Mai, Nguyễn Kim Vũ & Phạm Văn Điền	Nghiên cứu quá trình nảy mầm của gạo lứt	285
50	Trần Đình Mẫn, Lương Đức Phẩm Lê Văn Nhung	Tách sạch α - amylaza chịu nhiệt từ chủng vi khuẩn 3BT2 và Bs168M[pHV33BLAmy.Bspr]	291
50	Margarita Escaler	The Global Status of Crop Biotechnology Acceptance	297
51	Tran Dinh Man, Luong Duc Pham, Le Van Nhung	Purification of thermostable α -amylase from wild strain 3BT2 and recombinant	300
52	Nguyễn Tuyết Nga, Nguyễn Thu Vân, Hoàng Thuỷ Nguyên Jihong Meng, Michael A. Purdy, Yury E.Khudyakov, Howard A. Fields	Một phần chuỗi arn và kết quả phân tít của chủng vi rút viêm gan E (HEV) phân lập được ở Việt Nam	308
53	Lê Việt Nga, Ngô Tiến Hiến, Trần Thị Châu, Nguyễn Thuý Hương, Erko Stackebrandt ³ , Peter Hoffmann ² , Ina Kramer ³ , Cathrin Spocrer ³ , Guenter Stoschek ² , Nguyễn Thị Hiền ⁴	Phân loại và định tên một số chủng nấm men trong sản xuất nước quả có độ rượu thấp	315
54	Nguyễn Duy Minh	Nghiên cứu hiệu lực của Sulfit natri (Na ₂ SO ₃), chất kìm hãm quá trình quang hô hấp ở ớt ngọt (capsicum annuml)	323
55	Thái Duy Ninh	Effects of chitin and its derivatives on the growth, crop yield and the total- nitrogen of rice	327
56	Thais Duy Ninh	Ảnh hưởng của việc bón ZnSO ₄ .7H ₂ O đến các quá trình sinh lý, sinh hoá, năng suất và phẩm chất hạt thóc CR.203 ở hai mức nitơ N ₉₀ và N ₁₈₀ lúc trồng ở trên đất Từ Liêm, Hà Nội	330

International Workshop on Biology. Hanoi - Vietnam 2-5 July 2001

57	Thân Trọng Ninh	Một chương trình thực nghiệm xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học ở Việt Nam	336
58	Paul S. Teng	Biotechnology as applied biology: Integration into IPM systems, social and economic benefits and research needs	337
59	PETER KLEINWACHTER, UDO LUHMANN, BRIGITTE SCHLEGEL, STEFAN HEINZE, ALBERT HARTL, UDO GRAFE TRINH TAM KIET	New Fasciculol-type sterol compounds from <i>hypholoma fasciculare</i>	338
60	NGUYEN DINH PHUC, DAI DUY BAN, TRUONG NAM HAI	GENETIC ENGINEERING IN THE DIAGNOSIS OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA	342
61	Nguyễn Ngọc Quyên, Nguyễn Thu Hà, Trần Tú Thủy	Lưu giữ chủng vi khuẩn trong nơơ lỏng	345
62	Mai Phú Quý	kết quả nghiên cứu sử dụng ong mắt đỏ <i>Trichogramma</i> spp. (hym., Trichogrammatidae) phòng trừ sâu tơ <i>Plutella xylostella</i> L. (Lep., Yponomeutidae) ở chương dương và Liên Phường, thường tín, Hà Tây	350
63	Phạm Bình Quyên, Nguyễn Minh Tuyên	Phòng trừ sâu xanh hại bông bằng các chế phẩm sinh học	358 <i>LI</i>
64	Robert T. Raab, W. Wyn Ellis	Developing Capacity in applied biology : The role and application of modern information, communication and educational technologies	361
65	Nguyễn Thị Xuân Sâm, Tô Kim Anh, Đặng Thị Thu	Nghiên cứu xử lý nước thải nhà máy thuộc da bằng tháp lọc sinh học	369
66	Chu Kỳ Sơn, Raphaelle Tourdot-Maréchal	Obtention et caractérisation de mutants spontanés H ⁺ -ATPase-déficients isolés chez <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	375
67	Stephan Heinze, Albert Hartl and Udo Grafe Hans-Knoll Trinh Tam Kiet	Occurrence of triterpenoid structures in a Vietnamese species of <i>Wolfiporia cocos</i>	383
68	NGUYEN BA SUU	Strengthening of the Sericulture Development in Traditional regions. (SERICULTURE FOR RURAL DEVELOPMENT PROGRAM, PROJECT BY CITB AND VITRANET)	386
69	Vũ Nguyễn Thành, Nguyễn Hương Giang, Đinh Mỹ Hằng, Heinrich Linsdorf, Peter Golyshin	Virus ARN mạch kép trong nấm men sinh kháng sinh <i>TORULASPORA DELBRUECKII</i>	388

70	Nguyen Quang Thach, Nguyen Thi Nhan Nguyen Khac Thai Son, Dinh Truong Son	IMPROVING MICROPROPAGATION TECHNOLOGY ON PINEAPPLE (CAYENNE) BY USING THIN CELL LAYERS, APICAL DOMINANCE BREAKING AND HYDROPONIC METHOD	392
71	Vũ Hồng Thắng, CIRILO NOLASCO-HIPOLITO, AYAAKI ISHIZAKI	Thiết lập hệ thống lên men liên tục axit lactic sử dụng tế bào tuần hoàn có kiểm soát mật độ tế bào	396
72	Nguyễn Quang Thảo	Chọn chủng nấm men phù hợp để sản xuất nước giải khát có độ cồn thấp từ trái cây	403
73	Võ Thị Thứ, Nguyễn Thị Hoa, Vũ Thị Bích Hương	Nghiên cứu tách dòng gen cry IV từ chủng phân lập <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> P ₁	407
74	Đỗ Văn Thu, Trịnh Thị Kim Thoa, Nguyễn Anh	Một số yếu tố ảnh hưởng lên chất lượng tinh dẻ đông lạnh và kết quả thụ tinh nhân tạo bằng tinh đông lạnh	413
75	Đặng Thị Thu, Đỗ Thu Hà, Lê sỹ Hồng Lam, Lê ngọc Tú, Lâm Xuân Thanh	Nghiên cứu proteaza axit từ <i>Aspergillus niger</i> — 92 và ứng dụng trong sản xuất phomat	420
76	Võ Minh Thứ, Nguyễn Như Khanh	Ảnh hưởng của NaCl và KClO ₃ đến một số chỉ tiêu Sinh lý, sinh hóa của 4 giống lúa chịu mặn khác nhau	428
77	Phạm Thị Thuỳ, Ngô Tự Thành, Nguyễn Văn Đình	Hiệu quả diệt sâu hại cây nông - lâm nghiệp của bào tử nấm <i>Beauveria bassiana</i>	436
78	Lê Thị Thanh Thuý, Phạm Văn Toán	Bước đầu nghiên cứu khả năng sử dụng vi sinh vật phân giải cellulose trong chuyển hoá nhanh rơm rạ làm phân bón	443
79	Phạm Thị Thuỳ, Đông Thị Thanh, Trần Thị Tuyết, Phạm Văn Nhạ	Kết quả nghiên cứu cải tiến công nghệ sản xuất và ứng dụng chế phẩm <i>Metarhizium anisopliae</i> (M.a) để phòng trừ bọ hại dừa ở Bến tre năm 2000.	449
80	Phùng Thị Thuý, Lê Văn Nhung, Hoàng Đình Hoà	Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân giải lá mía bằng vi sinh vật	459
81	Trần Tú Thuý, Vũ Thuý Nga, Phạm Văn Toán, Nguyễn Ngọc Quyền, Lê Văn Nhung, Nguyễn Lan Hương	Sử dụng vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân để sản xuất phân hữu cơ- vi sinh từ phân mùn, rác và đánh giá hiệu quả trên cây trồng	464
82	Nguyễn Thị Hoài Trâm, Phạm Thu Trang, Nguyễn Hồng Nhung, Đỗ Thị Thanh Huyền, Nguyễn Ngân Minh, Vũ Thị Thảo, Chu Thắng, Mai Thu Hiền, Ngô Đình Quang Bính*, Nguyễn Văn Thường	Nghiên cứu sinh tổng hợp protein và tạo chế phẩm diệt ấu trùng muỗi từ các chủng vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> và <i>Bacillus sphaericus</i>	470

83	Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Văn Hiếu, Lương Đức Phẩm, Trần Đình Mấn, Nguyễn Thị Diên	Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm men <i>Saccharomyces. sp</i> phù hợp với yêu cầu sản xuất rượu vang từ dịch quả nho	476
84	Minh Tri Nguyen and Chalernpol Kirdmanee	DEVELOPMENT OF STERILIZATION TECHNIQUES ON FLOWER- STALK OF ORCHID (<i>Dendrobium sp.</i>)	482
85	Lê Trình, Đỗ Tất Lợi	Một số kết quả nghiên cứu về lá Ngải cứu trong chữa bệnh ở Việt Nam	485
86	Khuất Hữu Trung, Nguyễn Phương Đoài, Dương Lan Oanh, Nguyễn Huỳnh Minh Quyên, Nguyễn Hữu Đống	Sử dụng kỹ thuật in - vitro để nhân nhanh cây Actisô	491

BAN TỔ CHỨC

<i>GS. Viện sỹ Vũ Tuyên Hoàng</i>	<i>Chủ tịch</i>
<i>PGS. TS. Hồ Uy Liêm</i>	<i>Phó Chủ tịch</i>
<i>CN. Nguyễn Lâm Hùng</i>	<i>Phó Chủ tịch</i>
<i>GS. Lê Quang Long</i>	<i>Phó Chủ tịch thường trực</i>
<i>TS. Nguyễn Mạnh Đôn</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>TS. Nguyễn Ngọc Khanh</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>CN. Lê Đức Nhuận</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>PGS. TS. Mai Phú Quý</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>KS. Nguyễn Bá Sửu</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>Nguyễn Thanh Vinh</i>	<i>Ủy viên</i>

ĐỒNG CHỦ TỊCH BAN TỔ CHỨC

<i>TS. Paul S. Teng</i>	<i>Công ty Monsanto</i>
<i>TS. Marke Wong</i>	<i>Chuyên viên cao cấp Môi trường - Canada</i>
<i>GS. Doel Soejarto</i>	<i>Trường Đại học Tổng hợp Illinois at Chicago, Chicago, USA</i>

BAN KHOA HỌC

<i>GS. Lê Quang Long</i>	<i>Trưởng Ban</i>
--------------------------	-------------------

Tiểu ban Môi trường và Con người

<i>GS. Võ Quý</i>	<i>Trưởng Tiểu ban</i>
<i>GS. TSKH. Phan Nguyên Hồng</i>	<i>Đồng Trưởng Tiểu ban</i>
<i>GS. TSKH. Đặng Huy Huỳnh</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>GS. TSKH. Vũ Quang Côn</i>	<i>Ủy viên</i>

Tiểu ban Sinh học Thực nghiệm và Ứng dụng

<i>GS. TSKH. Lê Văn Nhung</i>	<i>Trưởng Tiểu ban</i>
<i>Viện sỹ Trần Đình Long</i>	<i>Đồng Trưởng Tiểu ban</i>
<i>GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>GS. TSKH. Nguyễn Tài Lương</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>GS. TSKH. Trần Mai Thiên</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>GS. TSKH. Lê Doãn Diên</i>	<i>Ủy viên</i>

Tiểu ban Giảng dạy Sinh học

<i>GS. Nguyễn Bá</i>	<i>Trưởng Tiểu ban</i>
<i>PGS. TS. Đinh Quang Báo</i>	<i>Đồng Trưởng Tiểu ban</i>

BAN THƯ KÝ

<i>PGS. TS. Mai Phú Quý</i>	<i>Trưởng Ban</i>
<i>KS. Nguyễn Bá Sửu</i>	<i>Ủy viên</i>
<i>Nguyễn Thanh Vinh</i>	<i>Ủy viên</i>



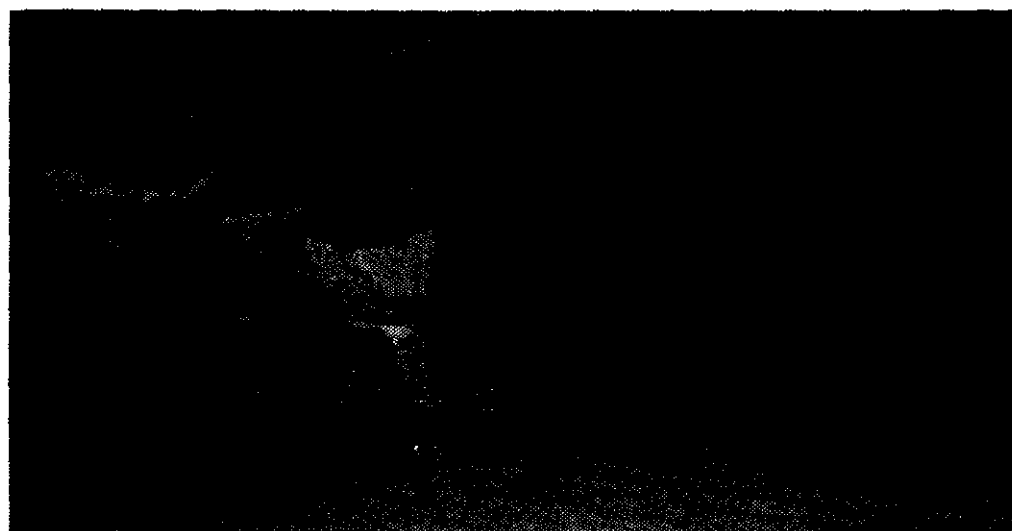
CÔNG TY CỔ PHẦN HỮU HẠN VEDAN VIỆT NAM VEDAN VIETNAM ENTERPRISE CORP.LTD

- **Do Tập đoàn Vedan Đài Loan đầu tư**

Là cơ sở công nghiệp sinh học đầu tiên và lớn nhất trong cả nước

- **Sản phẩm chính:**

Bột ngọt (MSG)	Monosodium glutamate
Axít glutamic	Glutamic acid
Lysin	Lysine, Feed grade
Dung dịch bột ngọt	MSG liquid solution
Tinh bột	Starch
Tinh bột biến đổi	Modified starch
Xút	Caustic soda
Axít clohydric	Hydrochloric acid
Thức ăn chăn nuôi Vedafeed	Vedafeed, Feed additives (CMS)
Phân bón hữu cơ Vedagro	Vedagro, Organic fertilizer



- **Địa chỉ:**

Xã Phước Thái, huyện Long Thành, tỉnh Đồng Nai

Tel: 061. 825111 Fax: 061. 825138

E-mail: vedan1@hcm.vnn.vn