

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH BÀO TỬ CỦA CHỦNG NẤM KÍ SINH CÔN TRÙNG *LECANICILLUM LECANII* LE85 VÀ *L. LECANII* L439 TRONG GIAI ĐOẠN LÊN MEN LỎNG

STYDY ON SPORE PRODUCTION ABILITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI STRAINS *LECANICILLUM LECANII* LE85 AND *L. LECANII* L439 IN LIQUID FERMENTATION STAGE

Vũ Văn Hạnh¹, Hồ Tuấn Anh², Đỗ Thị Lý¹, Nguyễn Thị Nguyệt¹, Nguyễn Quỳnh Mai¹

¹*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

²*Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp*

Đến Tòa soạn ngày 19/06/2020, chấp nhận đăng ngày 06/08/2020

Tóm tắt: Các yếu tố được nghiên cứu bao gồm nguồn dinh dưỡng cacbon, dinh dưỡng nitơ, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy để xác định điều kiện thích hợp cho khả năng sinh bào tử cao nhất của hai chủng nấm *Lecanicillum lecanii* Le85 và *L. lecanii* L439 khi lên men lỏng quy mô 100 L/mẻ. Môi trường lên men chứa 4% thành phần rỉ đường kích thích khả năng sinh bào tử của cả hai chủng Le85 và L439, với mật độ lần lượt đạt $(5,02 \pm 0,26) \times 10^9$ và $(6,75 \pm 0,26) \times 10^9$ bào tử/mL. Urea được lựa chọn là nguồn nitrogen phù hợp cho việc sản xuất bào tử của cả hai chủng. Nồng độ ure (0,6%) phù hợp đối với chủng Le85 và 0,3% đối với chủng L439 với mật độ bào tử trong môi trường lên men lỏng đạt $(5,37 \pm 0,15) \times 10^9$ và $(7,19 \pm 0,023) \times 10^9$ bào tử/mL. Sau thời gian lên men lỏng 8 ngày và tại nhiệt độ 28°C các chủng Le85 và L439 đạt mật độ $(7,88 \pm 0,026) \times 10^9$ và $(8,92 \pm 0,02) \times 10^9$ bào tử/mL. Nghiên cứu đã xác định được điều kiện lên men lỏng cho việc sinh bào tử của các chủng nấm ký sinh côn trùng *L. lecanii* Le85 và L439 có vai trò quan trọng trong cải thiện hiệu quả sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học phòng trừ rệp muội *Aphidoidae*.

Từ khóa: *Lecanicillum ssp*, lên men lỏng, nấm ký sinh côn trùng, rệp muội *Aphidoidae*, thuốc trừ sâu sinh học.

Abstract: Several factors included carbon nutrition, nitrogen nutrition, temperature and cultured time were studied to determine the suitable condition for the highest sporulation of the two strains of *Lecanicillum lecanii* Le85 and *L. lecanii* L439 in liquid fermentation at scale of 100 L/batch. The medium contained 4% molasses stimulates spore production of both strains with the density of $(5.02 \pm 0.26) \times 10^9$ and $(6.75 \pm 0.26) \times 10^9$ spores/mL, respectively. Besides, urea was selected as the most suitable nitrogen source for sporulation. The urea concentration at 0.6% gave the highest spore production of Le85 strain with the density of spore reached to $(5.37 \pm 0.15) \times 10^9$ spore/mL. In liquid fermentation of L439 strain, 0.3% urea concentration showed the maximum sporulation with the obtained number of $(7.12 \pm 0.023) \times 10^9$ spores/mL. Spore number of both trains Le85 and L439 produced to the highest density after 8 cultured days, at 28°C with $(7,88 \pm 0,026) \times 10^9$ and $(8,92 \pm 0,02) \times 10^9$ spores/mL, respectively. The study identified the optimal conditions for sporulation of entomopathogenic fungi strains Le85 and L439, which plays an important role in improving production efficiency of biological insecticide from *Lecanicillum ssp*.

Keywords: *Lecanicillum spp*, liquid fermentation, entomopathogenic fungi, aphids *Aphidoidae*, biological insecticide.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, sử dụng thuốc trừ sâu sinh học thay cho thuốc trừ sâu hóa học đã và đang nhận được nhiều quan tâm trong vấn đề kiểm soát các sinh vật gây hại cho cây trồng. *Lecanicillium ssp.* là chi nấm kí sinh côn trùng có tiềm năng sinh học cao được tìm thấy trong đa dạng vật chủ bao gồm các họ *Orthoptera* (Johnson, Huang, & Harper, 1988); (Khachatourians, 1992), *Homoptera* (Hall & Burges, 1979); (Milner & Lutton, 1986) và *Lepidoptera* (Gopalakrishnan, 1989). Cơ chế tiêu diệt côn trùng của *Lecanicillium ssp.* gồm các giai đoạn: tiếp xúc trực tiếp của bào tử với côn trùng; sau khi bám vào cơ thể côn trùng các bào tử nảy mầm và tạo thành sợi nấm đâm sâu vào trong khoang cơ thể; tại đây thể sợi của chúng sinh trưởng, phát triển và phá hủy mô cơ quan của vật chủ. Tiếp đến, sợi nấm sẽ phát triển xuyên qua các lớp biểu bì của côn trùng, trong điều kiện thuận lợi như nhiệt độ, độ ẩm, bào tử được tạo thành bên trong nội mô và bên ngoài cơ thể côn trùng; bào tử được truyền từ côn trùng nhiễm bệnh sang cho côn trùng khác (Moazami, 2002).

Trong thực tế sự vận hành quá trình lên men công nghiệp có một số đặc điểm khác biệt so với các quá trình lên men ở phòng thí nghiệm. Quá trình lên men với dung tích lớn hơn có sự thay đổi trong quá trình chuyển dịch nhiệt lên men, chuyển dịch nguyên liệu và sinh khối, chuyển dịch vật chất sau lên men, sự khác biệt về áp suất giữa bề mặt và đáy thiết bị lên men.

Sự hình thành bào tử của *Lecanicillium ssp.* trong môi trường lên men lỏng chịu ảnh hưởng chủ yếu của một số yếu tố như nguồn cacbon và nitơ bổ sung, chất khoáng, nhiệt độ, thời gian và oxy. Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh bào tử của chủng *Lecanicillium ssp.* Le85 và L439 trong lên men lỏng quy mô sản xuất 100 lít/mẻ.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chủng giống

Chủng nấm kí sinh côn trùng *L. lecanii* Le85 và L439 được lấy từ bộ sưu tập chủng của Phòng Các chất chức năng sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các chủng nấm được bảo quản trong dung dịch nước muối sinh lí chứa glycerol 30% ở nhiệt độ -80°C trong ống nghiệm vô trùng.

Hóa chất và môi trường

Các hóa chất được sử dụng trong thí nghiệm ở dạng tinh khiết có nguồn gốc từ các hãng uy tín của Mỹ, Ấn Độ, Đức, Nhật Bản. Một số nguyên liệu dùng thay thế nguồn cacbon như rỉ đường, môi trường PDA (20% khoai tây, 2% glucose, 2% agar) được pha chế trong phòng thí nghiệm. Tất cả các môi trường và dung dịch được khử trùng ở 121°C trong 20 phút trước khi dùng để nuôi cấy và thao tác với vi sinh vật.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị bào tử nấm:

Chuẩn bị giống nấm cấp 1: Chủng Le85 được nuôi trên đĩa thạch chứa môi trường PDA tại 28°C trong vòng 7 ngày. Lấy 15 mL dung dịch 0,02% tween 80 (v/v) tiệt trùng được đổ vào đĩa nấm, cạo nhẹ bề mặt của đĩa nấm bằng que cấy thủy tinh vô trùng. Bào tử được thu, đếm và pha loãng bởi dung dịch 0,02% tween 80 để đạt nồng độ 10^7 bào tử/mL.

Xác định *mật độ bào tử*: Số lượng bào tử được đếm dưới buồng đếm hồng cầu (Neubauer, CHLB Đức), soi dưới kính hiển vi quang học (Nikkon, Nhật Bản) với độ phóng đại 400 lần. Một mL dung dịch bào tử (10^7 bào tử/mL) được cấy vào 100 mL môi trường nhân giống cấp 1 Potatose Dextrose

Broth (PDB: 20% dịch khoai tây nghiền, 2% glucose) trong bình tam giác 250 mL, nuôi lắc ở 28°C, 200 vòng/phút trong 4 ngày để thu nhận giống cấp 1.

Chuẩn bị giống nấm cấp 2: Giống cấp 1 được cấy chuyển sang trong các bình tam giác chứa 1 L môi trường nhân giống cấp 2 (PDB: 20% dịch khoai tây nghiền, 2% glucose) với tỉ lệ 10% giống, nuôi lắc ở 28°C, 200 vòng/phút trong 4 ngày.

Lựa chọn nguồn cacbon cho khả năng sản xuất bào tử của chủng Le85 và L439

Ba nguồn cơ chất có vai trò là nguồn cung cấp cacbon chủ yếu trong lên men lỏng quy mô 100 L được sử dụng bao gồm: rỉ đường, đường glucose và đường sucrose. Giống cấp 2 của hai chủng Le85 và L439 được chuyển tiếp vào bình lên men chứa 100 L môi trường cơ bản gồm 0,05% NaNO₃; 0,05% MgSO₄ và 0,05% KH₂PO₄ cùng với một nguồn cacbon (rỉ đường 2%, hoặc glucose 2% hoặc sucrose 2%), tỉ lệ giống 10%, khuấy 200 vòng/phút, lên men trong 8 ngày, ở 28°C.

Ảnh hưởng của nồng độ rỉ đường đến sản xuất bào tử của chủng nấm Le85 và L439

Các nồng độ khác nhau của rỉ đường: 2%; 4%; 6% và 8% lên men trong 100 L môi trường chứa 0,05% NaNO₃; 0,05% MgSO₄ và 0,05% KH₂PO₄, khuấy 200 vòng/phút, lên men trong 8 ngày ở 28°C để xác định nồng độ rỉ đường thích hợp nhất cho quá trình sinh bào tử nấm.

Lựa chọn nguồn nitơ cho khả năng sản xuất bào tử của chủng Le85 và L439

Ảnh hưởng của năm nguồn nitơ khác nhau lên sự sinh bào tử của chủng Le85 đã được khảo sát: NaNO₃; ure; NH₄NO₃; (NH₄)₂SO₄; (NH₄)₂HPO₄. Các nguồn trên được bổ sung với hàm lượng nitơ là 0,6%, lên men trong 100 L môi trường chứa (4% rỉ đường, 0,05% MgSO₄ và 0,05% KH₂PO₄), khuấy 200 vòng/phút, lên men trong 8 ngày ở 28°C.

Ảnh hưởng của nồng độ urea lên khả năng sản xuất bào tử của chủng Le85 và L439

Để đánh giá ảnh hưởng của urea ở các nồng độ khác nhau lên sự sinh bào tử của chủng nấm, năm nồng độ ure là 0,12; 0,3; 0,6; 1,2 và 3% được thử nghiệm để chọn nồng độ thích hợp.

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sản xuất bào tử của chủng Le85 và L439

Điều kiện lên men lỏng 100 L được khảo sát tại các nhiệt độ 25, 28, 30, 32 và 35°C, môi trường gồm 4% rỉ đường, 0,6% ure, 0,05% MgSO₄ và 0,05% KH₂PO₄, khuấy 200 vòng/phút, lên men trong 8 ngày.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sản xuất bào tử của chủng Le85 và L439

Chủng nấm được lên men trong môi trường đã chọn lọc gồm 4% rỉ đường, 0,6% urea, 0,05% MgSO₄ và 0,05% KH₂PO₄, ở 28°C. Bào tử được thu tại các thời điểm 4; 6; 8; 10 và 12 ngày để xác định thời gian lên men cho mật độ bào tử lớn nhất.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lựa chọn nguồn cacbon cho khả năng sản xuất bào tử của chủng Le85 và L439

Kết quả các nghiên cứu lựa chọn nguồn dinh dưỡng cacbon đối với khả năng sản xuất bào tử của các chủng nấm Le85 và L439 được trình bày trên hình 1 và bảng 1.

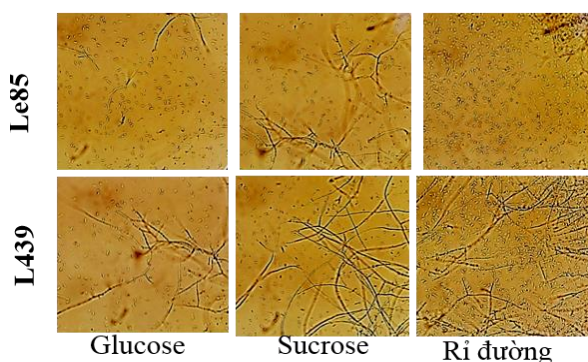
Đối với chủng L439, bào tử trên môi trường có chứa rỉ đường đạt mật độ cao nhất $(6,75 \pm 0,26) \times 10^9$ bào tử/mL, cao hơn 10 lần so với mật độ bào tử trên hai loại môi trường có chứa sucrose hoặc glucose lần lượt là $(5,8 \pm 0,9) \times 10^8$ và $(4,3 \pm 0,81) \times 10^8$ bào tử/mL.

Kết quả cho thấy, môi trường chứa rỉ đường thích hợp cho lên men sản xuất bào tử và cho

năng suất bào tử cao hơn so với sucrose hoặc glucose đối với cả 2 chủng nấm.

Bảng 1. Khả năng sản xuất bào tử của hai chủng Le85 và L439 trên môi trường bổ sung các nguồn cacbon khác nhau

Nguồn cacbon (%)	Mật độ (bào tử/mL)	
	Le85	L439
Glucose	$(4,44 \pm 0,76) \times 10^8$	$(4,30 \pm 0,81) \times 10^8$
Sucrose	$(3,87 \pm 0,71) \times 10^8$	$(5,80 \pm 0,90) \times 10^8$
Mật ri	$(5,02 \pm 0,26) \times 10^8$	$(6,75 \pm 0,26) \times 10^8$



Hình 1. Bào tử sản xuất từ hai chủng Le85 và L439 sau 8 ngày lên men trong các môi trường chứa glucose, sucrose và ri đường

Các nồng độ ri đường khác nhau 2; 4; 6 và 8% được khảo sát để xác định nồng độ phù hợp cho sản xuất bào tử nấm Le85 và L439. Chủng Le85 cho khả năng sinh bào tử cao nhất với mật độ $(5,02 \pm 0,26) \times 10^9$ bào tử/mL ở môi trường chứa 4% ri đường. Mật độ bào tử giảm dần ở các môi trường chứa 6% và 8% ri đường lần lượt là $(4,63 \pm 0,15) \times 10^9$ và $(3,22 \pm 0,62) \times 10^9$ bào tử/mL. Chủng L439 cho khả năng sinh bào tử cao nhất ở môi trường chứa 4% ri đường với mật độ đạt $(6,75 \pm 0,26) \times 10^9$ bào tử/mL (bảng 2).

Trong lên men công nghiệp, môi trường nuôi cấy tốt nhất là môi trường cho hiệu suất thu hồi sản phẩm cao nhất, trong thời gian ngắn nhất với giá thành thấp nhất đối với mỗi chủng vi sinh vật. Với nghiên cứu này, ri đường tại nồng độ 4% được lựa chọn là nguồn dinh dưỡng cacbon thích hợp nhất cho

sự sinh bào tử của hai chủng nấm *L. lecanii* Le85 và L439 trong lên men lỏng quy mô 100 L/mẻ.

Bảng 2. Khả năng sinh bào tử của hai chủng Le85 và L439 trên môi trường chứa nồng độ ri đường khác nhau

Nồng độ ri đường (% w/w)	Mật độ ($\times 10^9$ bào tử/mL)	
	Le85	L439
2	$4,34 \pm 0,76$	$5,24 \pm 0,17$
4	$5,02 \pm 0,26$	$6,75 \pm 0,26$
6	$4,63 \pm 0,15$	$6,27 \pm 0,13$
8	$3,22 \pm 0,62$	$4,30 \pm 0,81$

Ri đường là một sản phẩm phụ trong công nghệ sản xuất đường từ cây mía và thường có giá thành rất rẻ so với các loại nguyên liệu chứa đường khác. Thành phần của ri đường chứa các loại đường có khả năng lên men, các chất hữu cơ và khoáng chất khác cung cấp chất dinh dưỡng cần thiết cho quá trình sinh trưởng của vi sinh vật.

3.2. Lựa chọn nguồn nitơ cho khả năng sản xuất bào tử của chủng Le85 và L439

Năm nguồn dinh dưỡng nitơ vô cơ NaNO_3 , ure, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng đến sự sinh bào tử của các chủng nấm Le85 và L439 (bảng 3).

Các kết quả đạt được cho thấy, so với các nguồn dinh dưỡng nitơ khác, urea là nguồn nitơ thích hợp nhất cho môi trường lên men lỏng sinh bào tử của cả hai chủng với mật độ đạt lần lượt là $(5,37 \pm 0,15) \times 10^9$ bào tử/mL và $(6,81 \pm 0,43) \times 10^9$ bào tử/mL. Hai chủng Le85 và L49 cùng sản xuất bào tử thấp nhất khi bổ sung NaNO_3 .

Bảng 3. Khả năng sinh bào tử của hai chủng Le85 và L439 trên môi trường bổ sung các nguồn nitơ khác nhau

Nguồn nitơ	Mật độ ($\times 10^9$ bào tử/mL)	
	Le85	L439
NaNO_3	$5,02 \pm 0,26$	$6,75 \pm 0,26$

Nguồn nitơ	Mật độ ($\times 10^9$ bào tử/mL)	
	Le85	L439
Urea	$5,37 \pm 0,15$	$6,81 \pm 0,43$
NH_4NO_3	$5,16 \pm 0,31$	$6,02 \pm 0,32$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$5,17 \pm 0,24$	$6,15 \pm 0,56$
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$5,12 \pm 0,51$	$5,57 \pm 0,63$

Trong môi trường lên men lỏng, urea được lựa chọn là nguồn cung cấp nitơ phù hợp cho sản xuất bào tử của hai chủng Le85 và L439. Các nồng độ urea là 0,12; 0,3; 0,6; 1,2 và 3% được bổ sung vào môi trường để xác định nồng độ ure cho khả năng sinh bào tử của các chủng nấm nghiên cứu, kết quả được trình bày trên bảng 4.

Bảng 4. Khả năng sinh bào tử của hai chủng Le85 và L439 trên môi trường bổ sung các nồng độ urea khác nhau

Ure (%)	Mật độ ($\times 10^9$ bào tử/mL)	
	Le85	L439
0,12	$4,92 \pm 0,29$	$6,75 \pm 0,26$
0,3	$5,17 \pm 0,015$	$7,19 \pm 0,023$
0,6	$5,37 \pm 0,15$	$6,81 \pm 0,43$
1,2	$5,08 \pm 0,024$	$6,15 \pm 0,56$
3	$4,89 \pm 0,11$	$5,57 \pm 0,63$

Kết quả đạt được trên bảng 4 cho thấy nồng độ 0,6% urea kích thích sự sinh bào tử của chủng Le85 cao nhất ($5,37 \pm 0,15$) $\times 10^9$ bào tử/mL. Chủng L439 sinh bào tử cao nhất tại nồng độ 0,3% urea, bào tử đạt ($7,19 \pm 0,023$) $\times 10^9$ bào tử/mL. Các nồng độ urea này được sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sản xuất bào tử của chủng Le85 và L439

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến khả năng tạo bào tử của các chủng nấm nghiên cứu được trình bày trên bảng 5.

Trong các thí nghiệm đã được tiến hành, khả năng sinh bào tử của chủng Le85 ở 25°C và

28°C không có sự khác biệt, lần lượt đạt ($5,40 \pm 0,29$) $\times 10^9$ và ($5,37 \pm 0,15$) $\times 10^9$ bào tử/mL, trong khi ở 35°C, mật độ bào tử của nấm là thấp nhất, đạt ($2,63 \pm 0,32$) $\times 10^9$ bào tử/mL.

Bảng 5. Khả năng sinh bào tử của hai chủng nấm tại các nhiệt độ lên men khác nhau

Nhiệt độ (°C)	Mật độ ($\times 10^9$ bào tử/mL)	
	Le85	L439
25	$5,40 \pm 0,29$	$7,05 \pm 0,26$
28	$5,47 \pm 0,15$	$7,19 \pm 0,023$
30	$5,08 \pm 0,02$	$6,87 \pm 0,43$
32	$3,59 \pm 0,11$	$3,65 \pm 0,16$
35	$2,63 \pm 0,32$	$3,57 \pm 0,64$

Đối với chủng L439, mật độ bào tử cũng đạt được cao nhất ở 28°C, ($7,19 \pm 0,023$) $\times 10^9$ bào tử/mL. Tại 32°C và 35°C, khả năng sinh bào tử giảm đi đáng kể, lần lượt giảm còn ($3,65 \pm 0,16$) $\times 10^9$ và ($3,57 \pm 0,64$) $\times 10^9$ bào tử/mL.

Từ các kết quả đạt được cho thấy, 28°C là nhiệt độ phù hợp cho quá trình lên men lỏng sản xuất bào tử của hai chủng Le85 và L439 quy mô 100 L/mẻ.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Vu và cs. 2008 về điều kiện sinh trưởng của nấm *L. lecanii*, nhiệt độ thích hợp thường nằm trong khoảng 25-30°C.

Nấm *Lecanicillium* spp., trong nghiên cứu của Kope và cs. (2008) sinh trưởng tốt nhất ở 25°C (Kope et al., 2008). Chủng *L. lecanii* 41185 trong nghiên cứu của Vu và cs. (2008) sinh bào tử cao nhất ở 25°C (Vu et al., 2008). Nghiên cứu của Arevalo và cs. (2009) cho thấy, nấm *L. psalliotae* sinh trưởng tốt nhất ở 30°C (Arevalo et al., 2009).

3.4. Ảnh hưởng của thời gian lên men lên khả năng sinh bào tử của chủng Le85 và L439

Số lượng bào tử đạt được phụ thuộc nhiều vào thời gian lên men, trước khi sinh bào tử

nấm cần có thời gian để phát triển hệ sợi. Thời gian lên men để đạt được số lượng bào tử tối đa càng ngắn thì chi phí sản xuất càng thấp. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian lên men được trình bày trên bảng 6.

Bảng 6. Khả năng sinh bào tử của chủng Le85 và L439 tại thời gian lên men khác nhau

Thời gian (ngày)	Mật độ ($\times 10^9$ bào tử/mL)	
	Le85	L439
4	$6,82 \pm 0,29$	$7,75 \pm 0,26$
6	$6,95 \pm 0,18$	$7,90 \pm 0,06$
8	$7,88 \pm 0,026$	$8,92 \pm 0,02$
10	$7,90 \pm 0,039$	$8,76 \pm 0,043$
12	$7,82 \pm 0,021$	$8,97 \pm 0,03$

Theo các kết quả đạt được trên bảng 6, sau 8 ngày lên men, số lượng bào tử của hai chủng nấm Le85 và L439 đạt được tương ứng là $(7,88 \pm 0,026) \times 10^9$ và $(8,92 \pm 0,02) \times 10^9$ bào tử/mL. Tiếp tục kéo dài thời gian lên men đến 10 và 12 ngày, số lượng bào tử hầu như không thay đổi. Sau 6 ngày lên men, số lượng bào tử còn thấp, với chủng Le85 chỉ đạt $(6,95 \pm 0,18) \times 10^9$ bào tử/mL, bằng 88,2% số lượng bào tử tối đa sau 8 ngày lên men, chủng L439 cũng chỉ đạt được 88,6% so với lượng bào tử đạt được tại thời điểm 8 ngày. Kết quả tương tự cũng được chỉ ra ở một số nghiên cứu của Vũ và cs. (2014a), Vũ và cs.

(2014b), Nguyễn Thị Nguyệt và cs (2013).

Sản xuất bào tử nấm kí sinh côn trùng sử dụng kết hợp quá trình lên men hai giai đoạn gồm: men lỏng chuẩn bị giống và lên men xộp sản xuất bào tử. Việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh bào trong giai đoạn lên men lỏng đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao hiệu quả sản xuất giống phục vụ cho giai lên men xộp về sau nhằm tiết kiệm chi phí sản xuất thuốc trừ sâu sinh học quy mô công nghiệp.

4. KẾT LUẬN

Các điều kiện phù hợp cho quá trình lên men lỏng 100 L/mẻ để sản xuất bào tử cao sản của hai chủng nấm kí sinh côn trùng Le85 và L439 đã được xác định. Đối với chủng *L. lecanii* Le85 lên men trong môi trường lỏng chứa 4% rỉ đường, 0,6% ure, 0,05% $MgSO_4$ và 0,05% KH_2PO_4 , khuấy 200 vòng/phút, lên men 8 ngày, nhiệt độ $28^\circ C$, bào tử đạt $(7,88 \pm 0,026) \times 10^9$ bào tử/mL.

Đối với chủng *L. lecanii* L439 lên men trong môi trường chứa 4% rỉ đường, 0,3% ure, 0,05% $MgSO_4$ và 0,05% KH_2PO_4 , khuấy 200 vòng/phút, thời gian lên men 8 ngày, nhiệt độ $28^\circ C$, bào tử đạt $(8,92 \pm 0,02) \times 10^9$ bào tử/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Arevalo, J., Hidalgo-Díaz, L., Martins, I., Souza, J.F., Castro, J.M.C., Carneiro, R.M.D., & Tigano, M.S., Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 34(3), 158-163, (2009).
- [2] Gopalakrishnan, C., Susceptibility of cabbage diamondback moth *Plutella xylostella* L. to the entomofungal pathogen *Verticillium lecanii* (Zimmerm), *Viejas Current Science*, November 20, Vol.58, N.20, (1989).
- [3] Hall, R. e., & Burges, H., Control of aphids in glasshouses with the fungus, *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology*, 93(3), 235-246, (1979).
- [4] Johnson, D., Huang, H., & Harper, A., Mortality of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) inoculated with a Canadian isolate of the fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(2), 335-342, (1988).

- [5] Khachatourians, G., Virulence of five *Beauveria* strains, *Paecilomyces farinosus*, and *Verticillium lecanii* against the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59(2), 212-214, (1992).
- [6] Kope, H.H., Alfaro, R.I., & Lavallée, R. (2008). Effects of temperature and water activity on *Lecanicillium* spp. conidia germination and growth, and mycosis of *Pissodes strobi*. *BioControl*, 53(3), 489-500.
- [7] Milner, R., & Lutton, G., Dependence of *Verticillium lecanii* (Fungi: Hyphomycetes) on high humidities for infection and sporulation using *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) as host. *Environmental Entomology*, 15(2), 380-382, (1986).
- [8] Moazami, N., Biopesticide production. *Encyclopedia of life support systems*, 62002, 1-52, (2002).
- [9] Vu, V.H., Hong, S.I., & Kim, K., Production of aerial conidia of *Lecanicillium lecanii* 41185 by solid-state fermentation for use as a mycoinsecticide. *Mycobiology*, 36(3), 183-189, (2008).
- [10] Vũ Văn Hạnh và cs. 2014a. Báo cáo tổng kết đề tài: Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm từ nấm *Lecanicillium* spp. để diệt rệp muội gây hại trên cây trồng” cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, do TS. Vũ Văn Hạnh làm chủ nhiệm, thực hiện từ 1/2011 đến 12/2013. Thư viện Quốc gia.
- [11] Vũ Văn Hạnh, Nguyen Huu Quân. 2014b. Lựa chọn điều kiện tối ưu sinh bào tử nấm *Lecanicillum lecanii* 43H trong điều kiện lên men rắn. Kỷ yếu Hội nghị khoa học Thanh niên lần thứ 8 - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. NXB KHTN và CN. 191-198.
- [12] Nguyễn Thị Nguyệt, Chu Hồng Quảng, Vũ Văn Hạnh, Quyền Đình Thi. 2013. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm bào tử nấm kí sinh côn trùng *L. lecanii* L439. *Proceedings, Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2013*. Quyển 2. 425-425.

Thông tin liên hệ:

Vũ Văn Hạnh

Điện thoại: 02437917948; 0395794701 - Email: vvhanh2003@gmail.com

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

