



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
 Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học

website: sj.ctu.edu.vn

DOI: 10.22144/ctu.jvn.2018.176

**TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH NHÂN MẬT SỐ BÀO TỬ XẠ KHUẨN
Streptomyces albaduncus BẰNG MA TRẬN PLACKETT-BURMAN VÀ PHƯƠNG PHÁP
 ĐÁP ỨNG BỀ MẶT (RSM) - PHƯƠNG ÁN CẤU TRÚC CÓ TÂM (CCD)**

Nguyễn Quang Tiến¹, Nguyễn Thị Phi Oanh² và Nguyễn Đắc Khoa^{1*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

* Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Đắc Khoa (email: ndkhoa@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 03/07/2018

Ngày duyệt đăng: 28/12/2018

Title:

Optimization of the *Streptomyces albaduncus* sporulation process using the Design of Plackett-Burman Matrix and the Response Surface Methodology (RSM) - Central Composite Design (CCD)

Từ khóa:

Allium cepa var. *ascalonicum*, ma trận Plackett-Burman, phương án cấu trúc có tâm (CCD), phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM), *Streptomyces albaduncus*, thối để củ hành

Keywords:

Allium cepa var. *ascalonicum*, Central Composite Designs (CCD), *Fusarium basal rot*, Plackett-Burman matrix, Response Surface Methodology (RSM), *Streptomyces albaduncus*

ABSTRACT

Streptomyces albaduncus was shown capable of reducing the *Fusarium* basal rot of shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) caused by *Fusarium oxysporum*. This study aims at identifying the optimal values of different chemical and physical factors directly influencing the sporulation process of the actinomycete, which serves as a basis to produce a bio-fungicide to control the disease. The optimum multifactorial experiments were designed using the Plackett-Burman matrix. Results showed that the initial moisture content, culture duration and CaCO₃ content had the strongest influences on the sporulation process. These three factors were subsequently optimized using the Response Surface Methodology (RSM) combined with the Central Composite Design (CCD). Optimal values of the initial moisture content, culture duration and CaCO₃ were 54%v/w, 3.6 days and 3 g, respectively. These values formed a model which was tested in a bio-assay. An amount of 4.8x10⁹ spores/g was obtained in that assay. The Plackett-Burman matrix combined with the RSM-CCD is therefore a useful tool to identify optimal values of different factors influencing microbial sporulation processes.

TÓM TẮT

Xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus* có khả năng giúp giảm bệnh thối để củ hành tím (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) do nấm *Fusarium oxysporum* gây ra. Mục tiêu của nghiên cứu này tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến quá trình nhân mật số bào tử xạ khuẩn, làm tiền đề tạo chế phẩm ứng dụng vào thực tế sản xuất. Thí nghiệm đa yếu tố theo ma trận Plackett-Burman được thực hiện để sàng lọc các yếu tố vật lý và hóa học tác động đến sự hình thành bào tử xạ khuẩn. Kết quả cho thấy 3 yếu tố gồm độ ẩm ban đầu, thời gian nuôi cấy và hàm lượng CaCO₃ có tác động mạnh nhất. Khi thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - phương án cấu trúc có tâm (CCD), giá trị tối ưu của yếu tố độ ẩm ban đầu được xác định là 54%v/w, thời gian nuôi cấy là 3,6 ngày và hàm lượng CaCO₃ là 3 g. Mô hình này đã được kiểm định thông qua thí nghiệm thực tế, kết quả đạt 4,8 x 10⁹ bào tử/g chất khô. Ma trận Plackett-Burman kết hợp với RSM-CCD được đánh giá là công cụ phù hợp để tối ưu hóa giá trị của các yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình nhân mật số vi sinh vật.

Trích dẫn: Nguyễn Quang Tiến, Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Đắc Khoa, 2018. Tối ưu hóa quá trình nhân mật số bào tử xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus* bằng ma trận Plackett-Burman và phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - phương án cấu trúc có tâm (CCD). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(9B): 15-22.

1 GIỚI THIỆU

Sử dụng biện pháp sinh học để phòng trừ bệnh hại cây trồng đang được quan tâm do đây là biện pháp thân thiện với môi trường, không ảnh hưởng đến sức khỏe con người, vật nuôi và có tính bền vững (Agrios, 1988). Dịch trích thực vật hay vi sinh vật đối kháng có thể được sử dụng để phòng trị bệnh hại trên các loại cây trồng khác nhau như lúa (Phạm Văn Kim và Twng Wah Mew, 2003; Nguyễn Đăng Ngọc Giàu, 2014; Khoa *et al.*, 2016; Khoa *et al.*, 2017), hành tím (Nguyễn Văn Vinh, 2016; Quyen *et al.*, 2017) và khoai lang tím (Trần Thị Bích Thảo, 2017). Các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng tốt với mầm bệnh tiếp tục được nghiên cứu để tạo chế phẩm sinh học (Nguyễn Đắc Khoa và *ctv.*, 2010; Đặng Hoài An và *ctv.*, 2017).

Xạ khuẩn *Streptomyces* có thể tiết kháng sinh và enzyme tiêu diệt mầm bệnh nên được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như nông nghiệp, môi trường... (Srividya *et al.*, 2012). Để tạo chế phẩm sinh học hay thu nhận các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn ở quy mô lớn, cần tối ưu hóa quá trình nuôi cấy xạ khuẩn trong thời gian ngắn và tiết kiệm chi phí. Bất cứ một quy trình nuôi cấy vi sinh vật nào cũng bị ảnh hưởng bởi các yếu tố vật lý, hóa học và sinh học khác nhau. Bước đầu tiên để tối ưu hóa là sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng nhất đến việc hình thành bào tử của xạ khuẩn. Đã có rất nhiều nghiên cứu được thực hiện nhằm tối ưu từng yếu tố trong khi các yếu tố khác được giữ nguyên, đây cũng là cách tối ưu đơn giản nhất. Cách này tuy thuận tiện nhưng tốn thời gian vì số lượng yếu tố càng nhiều thì số lượng thí nghiệm càng tăng và không xác định được sự ảnh hưởng lẫn nhau của các yếu tố (Bùi Hồng Quân và Nguyễn Đức Lượng, 2009).

Thiết kế thí nghiệm tối ưu đa yếu tố theo ma trận Plackett-Burman (Plackett and Burman, 1946) là phương pháp giúp tiết kiệm thời gian nghiên cứu và số lượng thí nghiệm cần thực hiện (Kai and Peisheng, 2016), do nó có khả năng phát hiện các yếu tố quan trọng trong các thành phần được khảo sát (Borges *et al.*, 2016). Sau bước sàng lọc ban đầu, thí nghiệm theo phương pháp RSM-CCD được thực hiện để tối ưu hóa giá trị các yếu tố đang được nghiên cứu. Đây là phương pháp quy hoạch thực nghiệm nhiều yếu tố dựa trên cơ sở mô hình hình hóa toán học. Nguyên tắc cơ bản của phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) là làm thực nghiệm tại một số điểm của các yếu tố để mô tả kết quả bằng một phương trình hồi quy dạng đa thức bậc 2. Phương trình đó giúp vẽ trên hệ trục tọa độ một đồ thị dạng mặt – gọi là bề mặt đáp ứng, điểm tối ưu là điểm cực trị của đồ thị đó (Myers *et al.*, 1989).

Phương pháp tối ưu hóa này đã được thực hiện nhiều trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Chae *et al.* (2009) đã thiết kế thí nghiệm theo ma trận Plackett – Burman để sàng lọc các yếu tố môi trường và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy *Streptomyces kasugaensis*. Vastrad và Neelagund (2014) đã sử dụng ma trận Plackett – Burman và RSM-CCD để tối ưu hóa điều kiện lên men rắn của xạ khuẩn *Streptomyces aureofaciens* NCIM 2417. El-Naggar *et al.* (2015) kết hợp sử dụng ma trận Plackett – Burman và RSM-CCD để tối ưu hóa sản lượng enzyme L-asparaginase do *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 tạo ra. Năm 2017, Chen và Li đã tối ưu hóa quá trình nuôi cấy các dòng xạ khuẩn *Streptomyces*. Ở Việt Nam, Ngô Xuân Mạnh và Nguyễn Thị Phương Nhung (2009) đã nghiên cứu điều kiện nuôi cấy tối ưu để *Streptomyces griseus*. Năm 2011, Ngô Thị Tường Châu và Nguyễn Đoàn Linh An đã nghiên cứu tối ưu hóa quá trình nuôi cấy *Streptomyces* sp. A1 theo phương pháp bề mặt đáp ứng.

Quyen *et al.* (2017) đã phân lập, tuyển chọn vi khuẩn đối kháng có khả năng phòng trị bệnh thối củ hành tím và xác định được xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus* có hiệu quả giảm bệnh tốt nhất. Trong nghiên cứu này, các yếu tố lý hóa trong quá trình nuôi cấy xạ khuẩn *S. albaduncus* được sàng lọc theo ma trận Plackett-Burman và tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - phương án cấu trúc có tâm (CCD) với mục tiêu tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến quá trình nhân mật số bào tử xạ khuẩn, làm tiền đề tạo chế phẩm ứng dụng vào thực tế sản xuất.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Chuẩn bị bào tử xạ khuẩn và xác định mật số bào tử

Xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus* được phân lập từ đất trồng hành tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng (Quyen *et al.*, 2017) và được lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Xạ khuẩn *S. albaduncus* được nuôi trong các túi gạo theo phương pháp của Soares *et al.* (2007), ở nhiệt độ phòng ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) cho đến khi hình thành bào tử. Mật số bào tử xạ khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm hồng cầu (Neubauer-Improved, Bright-line), dưới kính hiển vi quang học.

2.2 Thiết kế Plackett-Burman và phương pháp RSM-CCD

Để xác định được các yếu tố và mức ảnh hưởng của chúng đến mật số bào tử của xạ khuẩn nghiên cứu, 7 yếu tố được chọn là khối lượng gạo (g), pH

ban đầu, độ ẩm ban đầu (%v/w), mật số bào tử sử dụng (bào tử/mL), thời gian ủ (ngày), nhiệt độ ủ (°C) và hàm lượng CaCO₃ (g). Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman (Plackett and Burman, 1946) với 7 yếu tố và 12 nghiệm thức để sàng lọc yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến mật số

bào tử (bào tử/g chất khô). Mức thấp (-1) và cao (+1) của 7 yếu tố được liệt kê trong Bảng 2 (mục 3.1). Ba yếu tố có ảnh hưởng nhất đến kết quả khảo sát được chọn để tiến hành thí nghiệm theo RSM-CCD để xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 5 mức trong CCD 20 thí nghiệm (Bảng 1) (Castillo, 2007).

Bảng 1: Giá trị độ ẩm ban đầu, thời gian ủ và CaCO₃ dùng trong phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) – phương án cấu trúc có tâm (CCD)

Tên yếu tố	Phạm vi nghiên cứu	Mức				
		-α	-1	0	+1	+α
Độ ẩm ban đầu (%v/w)	33,2 – 66,8	33,2	40,0	50,0	60,0	66,8
Thời gian ủ (ngày)	1,5 – 8,5	1,5	3,0	5,0	7,0	8,5
CaCO ₃ (g)	0,3 – 3,7	0,3	1,0	2,0	3,0	3,7

Hàm đáp ứng được chọn là mật số bào tử (Y bào tử/g chất khô). Mô hình tối ưu hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3$$

Trong đó: - b₁, b₂, b₃ là các hệ số bậc 1

- b₁₁, b₂₂, b₃₃ là các hệ số bậc 2

- b₁₂, b₂₃, b₁₃ là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố

- x₁, x₂, x₃ là các biến độc lập

2.3 Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Dựa vào kết quả thực nghiệm thu được từ thí nghiệm theo RSM-CCD, phần mềm Design-Expert 10.0.1.0® đã phân tích và đề xuất các giải pháp để thu được mật số bào tử xạ khuẩn cao nhất dựa trên ba yếu tố khảo sát. Sau đó thí nghiệm kiểm định mô hình được thực hiện với 3 lần lặp lại.

2.4 Xử lý số liệu

Phần mềm Design-Expert (phiên bản 10.0.1.0, Copyright©2016, Stat-Ease Inc., USA) được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng nhất đến sự hình thành bào tử của xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus*

Kết quả mật số bào tử xạ khuẩn thu được sau thí nghiệm nằm trong khoảng từ 1,0 x 10⁷ đến 3,0 x 10⁹ bào tử/g gạo nuôi cấy (Bảng 3). Điều này cho thấy các yếu tố thí nghiệm có tác động mạnh đến sự hình thành bào tử xạ khuẩn. Hệ số ảnh hưởng của từng yếu tố được tính toán bằng phần mềm Design-Expert 10.0.1.0® (Bảng 2). Nếu hệ số ảnh hưởng của một yếu tố là số dương, có nghĩa là yếu tố đó ảnh hưởng nhiều hơn ở mức cao, và ngược lại, giá trị ảnh hưởng là số âm thì yếu tố đó ảnh hưởng nhiều hơn ở mức thấp đến kết quả khảo sát (El-Naggar *et al.*, 2015). Căn cứ vào hệ số ảnh hưởng (chọn các hệ số có giá trị tuyệt đối lớn hơn), xác định được ba yếu tố có tác động mạnh nhất đến sự hình thành bào tử xạ khuẩn với độ tin cậy trên 95% (p < 0,05) là độ ẩm ban đầu (-0,88), thời gian ủ (0,85) và CaCO₃ (1,01). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Viccini *et al.* (2007), Mah *et al.* (2008) và Vastrad và Neelagund (2014), cả ba yếu tố này có ảnh hưởng mạnh đến sự hình thành bào tử trên cả xạ khuẩn và nấm. Do đó, ba yếu tố độ ẩm ban đầu, thời gian ủ và CaCO₃ được chọn cho thiết kế thí nghiệm RSM-CCD.

Bảng 2: Các biến trong ma trận Plackett-Burman và hệ số ảnh hưởng của chúng

Ký hiệu	Yếu tố	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
		Thấp (-1)	Cao (+1)	Hệ số ảnh hưởng	Prob > F
x ₁	Khối lượng gạo (g)	25,0	50,0	-0,58*	0,0285
x ₂	pH ban đầu	6,0	8,0	0,32	0,1423
x ₃	Độ ẩm ban đầu (%v/w)	40,0	60,0	-0,88*	0,0072
x ₄	Mật số bào tử sử dụng (bào tử/mL)	10 ³	10 ⁶	0,65*	0,0202
x ₅	Thời gian ủ (ngày)	14,0	21,0	0,85*	0,0083
x ₆	Nhiệt độ ủ (°C)	28,0	35,0	0,68*	0,0175
x ₇	CaCO ₃ (g)	1,0	3,0	1,01*	0,0044

*Có ý nghĩa ở độ tin cậy α = 0,05

Bảng 3: Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman

Thí nghiệm	Các biến							Mật số (bào tử/g chất khô)	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	Thực nghiệm	Mô hình
1	50,0	8,0	40,0	10 ⁶	21,0	35,0	1,0	2,3 x 10 ⁹	2,1 x 10 ⁹
2	25,0	8,0	60,0	10 ³	21,0	35,0	3,0	2,0 x 10 ⁹	2,1 x 10 ⁹
3	50,0	6,0	60,0	10 ⁶	14,0	35,0	3,0	1,0 x 10 ⁹	1,0 x 10 ⁹
4	25,0	8,0	40,0	10 ⁶	21,0	28,0	3,0	3,0 x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹
5	25,0	6,0	60,0	10 ³	21,0	35,0	1,0	9,0 x 10 ⁸	8,0 x 10 ⁸
6	25,0	6,0	40,0	10 ⁶	14,0	35,0	3,0	2,5 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁹
7	50,0	6,0	40,0	10 ³	21,0	28,0	3,0	1,2 x 10 ⁹	1,4 x 10 ⁹
8	50,0	8,0	40,0	10 ³	14,0	35,0	1,0	3,0 x 10 ⁸	5,5 x 10 ⁸
9	50,0	8,0	60,0	10 ³	14,0	28,0	3,0	3,0 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁶
10	25,0	8,0	60,0	10 ⁶	14,0	28,0	1,0	1,0 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁸
11	50,0	6,0	60,0	10 ⁶	21,0	28,0	1,0	1,0 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁸
12	25,0	6,0	40,0	10 ³	14,0	28,0	1,0	3,0 x 10 ⁸	1,4 x 10 ⁸

3.2 Tối ưu hóa các yếu tố cho mật số bào tử xạ khuẩn đạt cực đại

Dựa trên kết quả thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman, thí nghiệm RSM-CCD được tiến hành để xác định giá trị tối ưu của chúng và số liệu được xử lý bằng phần mềm Design-Expert 10.0.1.0[®]. Kết quả mật số bào tử xạ khuẩn thu nhận được từ thực nghiệm và giá trị được tiên đoán theo mô hình được trình bày ở Bảng 4.

Sau khi phân tích phương sai ANOVA, phương

trình đa thức bậc hai được dùng như một mô hình để tiên đoán mật số bào tử xạ khuẩn:

$$Y = 4,06 + 0,12x_3 - 0,33x_5 + 0,29x_7 - 0,34x_3^2 - 0,31x_5^2 + 0,063x_7^2 - 0,14x_3x_5 - 0,037x_5x_7 + 0,038x_3x_7$$

Trong đó, Y là mật số bào tử xạ khuẩn (bào tử/g chất khô); x₃, x₅, x₇ lần lượt là độ ẩm ban đầu (%v/w), thời gian ủ (ngày) và CaCO₃ (g).

Bảng 4: Kế hoạch thực nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) – phương án cấu trúc có tâm (CCD) để tối ưu hóa mật số bào tử xạ khuẩn

Thí nghiệm	Môi trường cơ bản			Mật số (bào tử/g chất khô)	
	Độ ẩm ban đầu (%v/w)	Thời gian ủ (ngày)	CaCO ₃ (g)	Thực nghiệm	Mô hình
1	40,0	3,0	1,0	3,3 x 10 ⁹	3,3 x 10 ⁹
2	60,0	3,0	1,0	3,8 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁹
3	40,0	7,0	1,0	3,1 x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹
4	60,0	7,0	1,0	2,9 x 10 ⁹	2,8 x 10 ⁹
5	40,0	3,0	3,0	3,9 x 10 ⁹	3,8 x 10 ⁹
6	60,0	3,0	3,0	4,4 x 10 ⁹	4,4 x 10 ⁹
7	40,0	7,0	3,0	3,4 x 10 ⁹	3,4 x 10 ⁹
8	60,0	7,0	3,0	3,5 x 10 ⁹	3,4 x 10 ⁹
9	33,2	5,0	2,0	2,8 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁹
10	66,8	5,0	2,0	3,2 x 10 ⁹	3,3 x 10 ⁹
11	50,0	1,5	2,0	3,7 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁹
12	50,0	8,5	2,0	2,5 x 10 ⁹	2,6 x 10 ⁹
13	50,0	5,0	0,3	3,6 x 10 ⁹	3,8 x 10 ⁹
14	50,0	5,0	3,7	4,7 x 10 ⁹	4,7 x 10 ⁹
15	50,0	5,0	2,0	4,1 x 10 ⁹	4,1 x 10 ⁹
16	50,0	5,0	2,0	4,0 x 10 ⁹	4,1 x 10 ⁹
17	50,0	5,0	2,0	4,2 x 10 ⁹	4,1 x 10 ⁹
18	50,0	5,0	2,0	4,0 x 10 ⁹	4,1 x 10 ⁹
19	50,0	5,0	2,0	4,1 x 10 ⁹	4,1 x 10 ⁹
20	50,0	5,0	2,0	4,0 x 10 ⁹	4,1 x 10 ⁹

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) được trình bày trong Bảng 5, với p-value của mô hình nhỏ

hơn 0,0001 (có ý nghĩa thống kê) và p-value của kiểm định sự không phù hợp (lack of fit) là 0,1021

(không có ý nghĩa thống kê) ở mức ý nghĩa 5%, điều đó cho thấy mô hình có độ phù hợp tốt như phân tích của Zabeti *et al.* (2009). Hệ số hồi quy (R^2) tính được là 0,9761, cho thấy có 97,61% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán theo mô hình. Giá trị R^2 tiên đoán (0,8495) phù hợp với R^2 điều chỉnh (0,9546) với độ lệch 0,1051 (nhỏ hơn 0,2). Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 24,408 lớn hơn 4

rất nhiều, điều đó chứng tỏ tín hiệu đã đầy đủ để sử dụng dự đoán mật số bào tử xạ khuẩn. Ngoài ra, hệ số biến thiên (%CV) còn cho biết mức độ chính xác của thí nghiệm. Các thí nghiệm có độ tin cậy thấp thường có giá trị %CV cao (Thakkar and Saraf, 2014). Trong thí nghiệm này, giá trị %CV là 3,31 cho thấy các thí nghiệm được thực hiện là đáng tin cậy.

Bảng 5: Phân tích thống kê ANOVA cho giá trị mật số bào tử xạ khuẩn

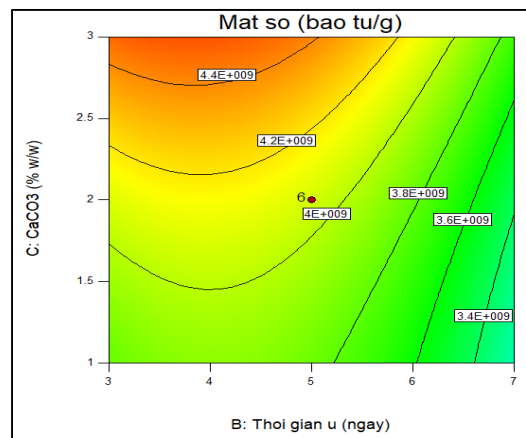
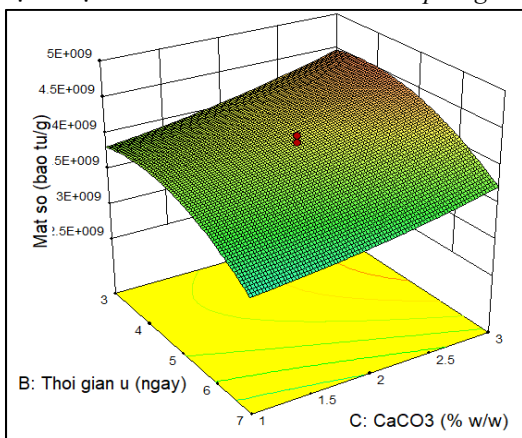
Nguồn	Tổng bình phương	df	Trung bình bình phương	Giá trị F	p-value	
Mô hình	6,00	9	0,67	45,35	<0,0001	Ý nghĩa
x_3 – Độ ẩm ban đầu	0,18	1	0,18	12,32	0,0056*	
x_5 – Thời gian ủ	1,49	1	1,49	101,66	<0,0001*	
x_7 – $CaCO_3$	1,14	1	1,14	77,70	<0,0001*	
x_3x_5	0,15	1	0,15	10,29	0,0094*	
x_3x_7	0,011	1	0,011	0,77	0,4023	
x_5x_7	2,011	1	0,011	0,77	0,4023	
x_3^2	1,70	1	1,70	115,51	<0,0001*	
x_5^2	1,37	1	1,37	92,95	<0,0001*	
x_7^2	0,058	1	0,058	3,92	0,0757	
Sự không phù hợp (Lack of fit)	0,151	5	0,023	3,41	0,1021	Không ý nghĩa

*Có ý nghĩa ở độ tin cậy $\alpha = 0,05$

Các yếu tố trong thí nghiệm có sự tương tác với nhau theo từng cặp yếu tố và được thể hiện trong biểu đồ đáp ứng bề mặt (Hình 1). Giá trị $CaCO_3$ càng tăng thì mật số bào tử xạ khuẩn càng tăng; trái lại, thời gian ủ càng lâu thì mật số càng giảm. Trong đó, $CaCO_3$ (hệ số ảnh hưởng là 1,01 trong thí nghiệm theo Plackett-Burman) là yếu tố ảnh hưởng nhất đến mật số bào tử xạ khuẩn. Điều này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Mah *et al.* (2008), $CaCO_3$ là thành phần không những có hiệu quả nhất trong việc thúc đẩy sự hình thành bào tử mà còn tăng khả năng chịu nhiệt của bào tử của *Clostridium sporogenes*.

$CaCO_3$ còn cung cấp cation Ca^{2+} cho quá trình hình thành bào tử. Ion này được tích tụ ở bên ngoài vỏ bào tử và được giải phóng trong suốt quá trình nảy mầm của xạ khuẩn chi *Streptomyces* (Eaton and Ensign, 1980; Salas *et al.*, 1983), tuy nhiên cơ chế tác động của nó vẫn chưa được biết rõ (Yagüe *et al.*, 2013).

Như vậy, kết quả thực nghiệm rất phù hợp với kết quả của mô hình, các kết quả này đáng tin cậy và tìm ra $CaCO_3$ là yếu tố ảnh hưởng nhất đến quá trình hình thành bào tử xạ khuẩn.



Hình 1: Bề mặt đáp ứng của mật số bào tử xạ khuẩn theo thời gian ủ và $CaCO_3$

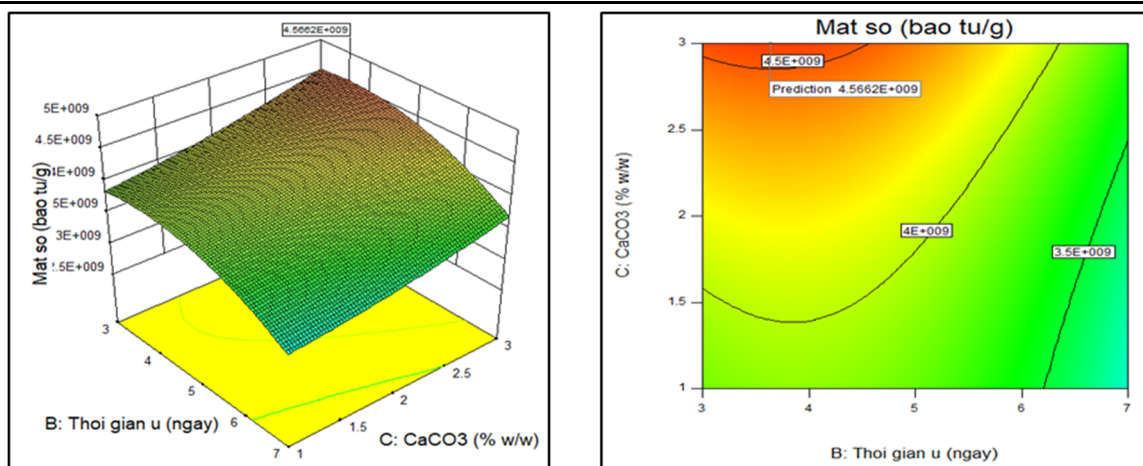
3.3 Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Theo mô hình dự đoán do phần mềm Design-Expert 10.0.1® đề xuất, giá trị tối ưu của từng yếu tố làm hàm đáp ứng đạt cực đại được xác định. Mô hình đã đưa ra dự đoán mật số bào tử xạ khuẩn đạt mức cao nhất ($4,6 \times 10^9$ bào tử/g chất khô) ở với giá trị các yếu tố lần lượt là độ ẩm ban đầu 54%v/w, thời gian ủ 3,6 ngày, CaCO_3 3,0 g (Hình 2). Để kiểm chứng mô hình, thí nghiệm kiểm định được thực

hiện với 3 lần lặp lại với thành phần môi trường tối ưu như trên và kết quả được trình bày trong Bảng 6. Mật số bào tử xạ khuẩn sau 4 ngày nuôi cấy là $4,8 \times 10^9$ bào tử/g chất khô, tương thích với mật số bào tử mà mô hình đã dự đoán. Kết quả như trên cao hơn nhiều so với kết quả $1,6 \times 10^7$ bào tử/mL khi nuôi cấy *S. kasugaensis* sau 5 ngày của Chae et al. (2009) và tốt hơn so với nghiên cứu của Soares et al. (2007) với $1,47 \times 10^9$ bào tử/g chất khô sau 12 ngày nuôi cấy.

Bảng 6: Kết quả kiểm định mô hình thực tế

Lần lặp lại	1	2	3	Trung bình
Mật số (bào tử/g chất khô)	$4,8 \times 10^9$	$4,9 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$



Hình 2: Bề mặt đáp ứng của mật số bào tử xạ khuẩn theo đề xuất của phần mềm

4 KẾT LUẬN

Bảy yếu tố ban đầu đã được sàng lọc và chọn được 3 yếu tố có ảnh hưởng nhất đến sự hình thành bào tử của xạ khuẩn là độ ẩm ban đầu (54%v/w), thời gian ủ (3,6 ngày), CaCO_3 (3,0 g). Thực tế thí nghiệm thu được kết quả $4,8 \times 10^9$ bào tử/g chất khô sau 4 ngày nuôi cấy. Kết quả đáp ứng được mục tiêu nghiên cứu, xây dựng được quy trình nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus* tiết kiệm thời gian, chi phí và thu được lượng bào tử lớn.

Sử dụng phần mềm chuyên dụng Design-Expert 10.0.1.0® giúp làm giảm đáng kể số lượng thí nghiệm và thời gian thực hiện thí nghiệm; có thể lựa chọn được giải pháp tối ưu do phần mềm đề xuất. Ma trận Plackett-Burman kết hợp với RSM-CCD được đánh giá là công cụ phù hợp để tối ưu hóa giá trị của các yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình nhân mật số vi sinh vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agrios, G.N., 1988. Plant pathology, Third edition. Academic press, Inc., Massachusetts, 845 pages.

Borges, P.R.S., Tavares, E.G., Guimarães, I.C. et al., 2016. Obtaining a protocol for extraction of phenolics from açai fruit pulp through Plackett-Burman design and response surface methodology. Food Chemistry. 210:189-199.

Bùi Hồng Quân và Nguyễn Đức Lượng, 2009. Tối ưu hóa sinh tổng hợp lipase từ *Pichia anomala* VTCC y0787 sử dụng ma trận Plackett-Burman và phương pháp đáp ứng bề mặt - phương án cấu trúc có tâm. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 7(4):493-500.

Castillo, E.D., 2007. Process Optimization A Statistical Approach. Springer Science. New York, 462 pages.

Chae, W.B., Kim, Y.B., Choi, S.W., Lee, H.B. and Kim, E.K., 2009. Enhancing the sporulation of *Streptomyces kasugaensis* by culture optimization. Korean Journal of Chemical Engineering. 26(2): 438-443.

Chen, X. and Li, J., 2017. Optimization of growth medium for biocontrol *Streptomyces* strains. Journal of Biotechnology. 256: 102-103.

Đặng Hoài An, Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Đức Khoa, 2017. Tuyển chọn chất mang để tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilus* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh

- cháy bìa lá lúa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52b: 8-15.
- Eaton, D. and Ensign, J.C., 1980. *Streptomyces viridochromogenes* spore germination initiated by calcium ions. Journal of Bacteriology. 143(1): 377-382.
- El-Naggar, N.E.A., Moawad, H., El-Shweihy, N.M. and El-Ewasy, S.M., 2015. Optimization of culture conditions for production of the anti-leukemic glutaminase free L-asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology. BioMed Research International. 2015: 1-17.
- Kai, W. and Peisheng, Y., 2016. Optimization of Lipase production from a novel strain *Thalassospira permensis* M35-15 using Response Surface Methodology. Bioengineered. 7(5): 298-303.
- Khoa, N.Đ., Giau, N.Đ.N. and Tuan, T.Q., 2016. Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Biological Control. 103: 1-10.
- Khoa, N.Đ., Xa, T.V. and Hao, L.T., 2017. Disease-reducing effects of aqueous leaf extract of *Kalanchoe pinnata* on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* involve induced resistance. Physiological and Molecular Plant Pathology. 100: 57-66.
- Li, Y., Liu, Z., Cui, F., and Liu, Z., 2007. Application of Plackett-Burman experimental design and Doehlert design to evaluate nutritional requirements for xylanase production by *Alternaria mali* ND-16. Applied Microbiology and Biotechnology. 77(2): 285-291.
- Mah, J., Kang, D. and Tang, J., 2008. Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. International Journal of Food Microbiology. 128(2): 385-389.
- Myers, H.R., Khuri, A.I. and Carter, W.H., 1989. Response Surface Methodology: 1966-1988. Technometrics. 31: 137-157.
- Ngô Thị Tường Châu và Nguyễn Đoàn Linh An, 2011. Tối ưu hóa môi trường cho sinh trưởng và đối kháng với *Vibrio harveyi* V7 của *Streptomyces* sp. A1. Báo cáo Khoa học Hội nghị Quốc gia về Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Hà Nội, Việt Nam. 1417-1421.
- Ngô Xuân Mạnh và Nguyễn Thị Phương Nhung, 2009. Lựa chọn điều kiện tối ưu để sản xuất Chitosanase từ *Streptomyces griseus* (Chủng NN2). Tạp chí Khoa học và Phát triển. 7(6): 780-787.
- Nguyễn Đắc Khoa, Dương Minh, Phạm Văn Kim, 2010. Sản xuất các sản phẩm sinh học để quản lý bệnh hại lúa, cây ăn quả và rau màu theo hướng bền vững và không ô nhiễm môi trường. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 16b: 117-126.
- Nguyễn Đăng Ngọc Giàu, 2014. Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn trong đất ở thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang. Luận văn Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Nguyễn Văn Vinh, 2016. Tuyển chọn dịch trích thực vật có khả năng phòng trị bệnh thối củ hành tím tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Luận văn Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Phạm Văn Kim và Twng Wah Mew, 2003. Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn đối kháng *Burkholderia cepacia* TG17 để quản lý bệnh đốm vằn (khô vằn) hại lúa một cách bền vững tại Đồng bằng Sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, Chuyên ngành Bảo vệ Thực vật. 2003: 87-93.
- Plackett, R.L. and Burman, J.P., 1946. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. Biometrika. 33(4):305-325.
- Quyen, T.V., Tin, C.H.T. and Khoa, N.D., 2017. Disease-reducing effects of antagonistic soil bacteria on Fusarium basal rot of shallot caused by *Fusarium oxysporum* in Vĩnh Châu, Sóc Trăng. Can Tho University Journal of Science. 6 (2017): 31-37.
- Salas, J.A., Guijarro, J.A. and Hardisson, C., 1983. High calcium content in *Streptomyces* spores and its release as an early event during spore germination. Journal of Bacteriology, 155(3): 1316-1323.
- Soares, A.C.F., Sousa, C.S., Garrido, M.S. and Perez, J.O., 2007. Production of Streptomycete Inoculum in Sterile Rice. Scientia Agricola. 64(6): 641-644.
- Srividya, S., Thapa, A., Bhat, D.V., Golmei, K. and Dey, N., 2012. *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. European Journal of Experimental Biology. 2(1): 163-173.
- Thakkar, A. and Saraf, M., 2014. Application of Statistically Based Experimental Designs to Optimize Cellulase Production and Identification of Gene. Natural Products and Bioprospecting. 4(6): 341-351.
- Trần Thị Bích Thảo, 2017. Xác định mầm bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng trong đất để phòng trị bệnh. Luận văn Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Vastrad, B.M. and Neelagund, S.E., 2014. Optimizing the medium conditions for production of tetracycline by solid state fermentation of *Streptomyces aureofaciens* NCIM 2417 using statistical experimental methods. Bioscience & Engineering: An International Journal. 1(1): 29-44.
- Viccini, G., Mannich, M., Capalbo, D.M.F., Valdebenito-Sanhueza, R. and Mitchell, D.A., 2007. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a

- biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry*. 42(2): 275-278.
- Vũ Thị Thu Hằng, Vũ Thị Hà, Tạ Thị Thu Thủy và Jae Kyung Sohng, 2014. Xác định môi trường tối ưu nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. 126(12): 41-44.
- Yagüe, P., López-García, M.T., Rioseras, B., Sánchez, J. and Manteca, A., 2013. Pre-
sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiology Letters*. 342(2): 79-88.
- Zabeti, M., Daud, W.M.A.W. and Aroua, M.K., 2009. Optimization of the activity of CaO/Al₂O₃ catalyst for biodiesel production using response surface methodology. *Applied Catalysis A: General*. 366(1): 154-159