



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0031545

(51)⁷ C12N 1/206

(13) B

(21) 1-2017-00906

(22) 21/07/2015

(86) PCT/IN2015/000294 21/07/2015

(87) WO2016/027279 25/02/2016

(30) 2331/DEL/2014 16/08/2014 IN

(45) 25/04/2022 409

(43) 26/06/2017 351A

(73) DCM SHRIRAM LTD. (IN)

Division: Bioseed Research India, 2nd Floor, (West Wing), Worldmark 1, Aerocity, New Delhi 110037, India

(72) DODDA, Santosh Kumar (IN); PARIHAR, Dwarkesh Singh (IN); VERMA, Paresh Kumar (IN).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) VI KHUẨN THUỘC LOÀI BACILLUS, DỊCH CHIẾT VÀ DỊCH NUÔI CÂY THUẦN CHỦNG CỦA NÓ, CHẾ PHẨM CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn thuộc họ *Bacillus* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật. Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập nó và nhận dạng dịch chiết của vi khuẩn thể hiện các hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm, kích thích sinh trưởng thực vật, phân giải protein, phân giải tinh bột. Cụ thể, sáng chế đề xuất vi khuẩn *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập MTCC-5674. Vi khuẩn này được nuôi cấy trong môi trường để sản xuất tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật với lượng lớn từ vi khuẩn này và trong môi trường nuôi cấy. Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm chứa vi khuẩn hoặc dịch chiết của vi khuẩn mà hữu hiệu trong nông nghiệp và dược phẩm. Vi khuẩn theo sáng chế được sử dụng trong điều trị chống các loại nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh khác nhau và kích thích thực vật sinh trưởng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn mới thuộc họ *Bacillus*, được định rõ là *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật, phân lập và nhận dạng phần chiết của vi khuẩn mới này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm, phân giải protein, phân giải tinh bột, chế phẩm chứa vi khuẩn mới và/hoặc dịch chiết này, phương pháp ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và/hoặc nấm gây bệnh bằng cách cho vi khuẩn và hoặc nấm gây bệnh tiếp xúc với lượng hữu hiệu vi khuẩn mới này và/hoặc chế phẩm và/hoặc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật và sử dụng nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết là khí quyển trái đất cùng với các vi sinh vật có trong không gian khiến cho môi trường không thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn mặc dù cường độ ánh sáng cao, sự biến đổi nhiệt độ cực cao, nồng độ chất hữu cơ thấp và khan hiếm nước. Vật liệu sinh học có thể chiếm khoảng 20%, 22% và 10% thể tích tổng vật liệu dạng hạt có trong không gian trong các môi trường lục địa xa xôi, lục địa có cư dân sinh sống, và các môi trường biển xa xôi, tương ứng. Hầu hết trong số chúng bắt nguồn từ các nguồn tự nhiên như đất, hồ, động vật và người. Hơn nữa, các thực hành trong nông nghiệp, các thiết bị chăm sóc sức khỏe và các hoạt động trong lĩnh vực công nghiệp như xử lý chất thải, chăn nuôi động vật, các quy trình lên men, và các nhà máy chế biến thực phẩm cũng đưa các vi sinh vật có thể sống sót vào trong môi trường.

Vi khuẩn tạo thành một trường lớn các vi sinh vật đơn bào chưa có nhân điển hình. Một cách điển hình, với chiều dài vài micromet, vi khuẩn có hình dạng đa dạng, thay đổi từ cầu khuẩn đến trực khuẩn và xoắn khuẩn. Vi khuẩn có mặt ở mọi nơi trên trái đất, phát triển trong đất, các suối nước nóng có tính axit, chất thải phóng xạ, nước, và sâu trong vỏ trái đất, cũng như trong các vật liệu hữu cơ và các cơ thể thực vật và động vật sống. Trực khuẩn là các vi khuẩn có hình que, gram dương, sinh bào tử, hiếu khí hoặc kỵ khí không bắt buộc. Hầu hết các trực khuẩn là vi khuẩn hoại sinh. Mỗi vi khuẩn chỉ tạo ra một bào tử, mà nó chịu được nóng, lạnh, phóng xạ, sự khô hạn, và các thuốc sát trùng. Các trực

khuẩn thể hiện một loạt các khả năng sinh lý cho phép chúng sống trong nhiều môi trường sống khác nhau, bao gồm nhiều môi trường sống khắc nghiệt như cát trên sa mạc, suối nước nóng, và đất thuộc Bắc cực. Loài *Bacillus* có thể ưa nhiệt, ưa lạnh, ưa axit, ưa kiềm, chịu mặn, hoặc ưa mặn và có khả năng phát triển ở các giá trị độ pH, nhiệt độ, và nồng độ muối khác nhau.

Việc sản sinh các tác nhân kháng khuẩn dường như là một hiện tượng phổ biến đối với hầu hết các vi khuẩn. Các vi khuẩn này tạo ra một loạt các hệ thống phòng thủ vi sinh vật tuyệt vời, bao gồm các chất kháng sinh cổ điển phổ rộng, các sản phẩm phụ trong quá trình trao đổi chất như các axit hữu cơ, và các tác nhân gây tan bào như lysozyme. Ngoài ra, một số loại ngoại độc tố protein, và bacteriocin, là các gốc peptit có hoạt tính sinh học với phương thức tác động diệt khuẩn, cũng được tạo ra. Kho vũ khí sinh học từ vi khuẩn là đáng chú ý cả về tính đa dạng và mức độ phong phú trong tự nhiên.

Việc tìm kiếm các tác nhân kháng khuẩn mới là một lĩnh vực quan trọng. Việc phát triển tính kháng đối với các tác nhân kháng khuẩn ngày càng tăng ở mức báo động. Các giải pháp hiện thời bao gồm phát triển một phương pháp hợp lý hơn để sử dụng các chất kháng sinh và tìm ra các chất kháng khuẩn mới.

Patent có mối liên quan mật thiết

1. Chủng vi khuẩn mới và phương pháp phòng trừ nấm gây bệnh (WO/2000/015761).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục tiêu của sáng chế là nhằm đề xuất vi khuẩn mới thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật.

Mục tiêu của sáng chế nhằm phân lập và nhận dạng dịch chiết của vi khuẩn mới, trong đó dịch chiết này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật.

Mục tiêu của sáng chế cũng nhằm đề xuất chế phẩm hoặc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật trong đó chế phẩm hoặc tác nhân này chứa vi khuẩn mới và/hoặc dịch chiết của vi khuẩn mới.

Một mục tiêu khác của sáng chế là nhằm đề xuất phương pháp ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và/hoặc nấm gây bệnh bằng cách cho vi khuẩn và hoặc nấm gây bệnh tiếp xúc với lượng hữu hiệu vi khuẩn mới và/hoặc chế phẩm và/hoặc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật trong đó chế phẩm hoặc tác nhân này chứa vi khuẩn mới và/hoặc dịch chiết của vi khuẩn mới và/hoặc hỗn hợp gồm vi khuẩn mới và dịch chiết của nó.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất việc sử dụng vi khuẩn mới, chế phẩm hoặc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm trong đó chế phẩm hoặc tác nhân này chứa vi khuẩn mới và/hoặc dịch chiết của vi khuẩn mới này và/hoặc hỗn hợp gồm vi khuẩn mới này và dịch chiết của nó, để ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và/hoặc nấm gây bệnh.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vi khuẩn được phân lập mới hữu hiệu trong sản xuất các chất chuyển hóa hoặc tác nhân có tác dụng kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dạng vi khuẩn mới thuộc loài *Bacillus* có tên gọi *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* với số truy cập (MTCC-5674). Cụ thể, vi khuẩn mới được bộc lộ trong sáng chế có khả năng biểu lộ đặc tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật khác biệt.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm hoặc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật, trong đó chế phẩm hoặc tác nhân này chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và/hoặc dịch chiết của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674). Chế phẩm này có thể còn bao gồm các tá dược, chất pha loãng và/hoặc chất mang được dụng.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm chứa dịch chiết của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674). Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm chứa dịch chiết trong nước của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674). Chế phẩm này có thể còn bao gồm các tá dược, chất pha loãng và/hoặc chất mang được dụng.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và/hoặc

nấm gây bệnh bằng cách cho vi khuẩn và hoặc nấm gây bệnh tiếp xúc với lượng hữu hiệu *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) hoặc dịch chiết của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674). *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và/hoặc dịch chiết của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) có thể tùy ý chứa một hoặc nhiều tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật khác nữa.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và/hoặc dịch chiết của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) trong bào chế chế phẩm hoặc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật để ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và/hoặc nấm gây bệnh.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất vi khuẩn mới thuộc họ *Bacillus* có tên gọi *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* và có số truy cập (MTCC-5674) và phương pháp sản xuất chế phẩm hoặc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật trong đó chế phẩm hoặc tác nhân này chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và/hoặc dịch chiết của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp ức chế vi khuẩn và/hoặc nấm gây bệnh bằng cách cho vi khuẩn và/hoặc nấm tiếp xúc với lượng hữu hiệu vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và/hoặc chế phẩm chứa vi khuẩn mới hoặc dịch chiết của nó.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674), và/hoặc chế phẩm hoặc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật chứa vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và/hoặc dịch chiết của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) để ức chế vi khuẩn và/hoặc nấm gây bệnh.

Bacillus subtilis ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) mới này có thể được sử dụng để sản xuất chế phẩm/hỗn hợp bào chế/tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật bằng cách nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* trong môi trường sinh trưởng thích hợp trong các điều kiện thuận lợi.

Nhờ các nghiên cứu chuyên sâu và kỹ lưỡng, tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng, vi khuẩn mới được phân lập và nuôi cấy có thể tạo ra tác nhân mới. Nhờ các nghiên cứu thử nghiệm cụ thể, tác giả sáng chế đã sáng chế ra phương pháp sản xuất tác nhân mới đã nêu từ vi sinh vật mới đã nêu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 - Đã chỉ ra sự phân lập và tinh chế *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (A) Đã nuôi cấy giống gốc chỉ ra sự phát triển của vi khuẩn cùng với hệ sợi nấm; (B) Tinh chế *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) từ các khuẩn lạc chứa vi khuẩn trong đĩa (A). Mũi tên chỉ ra khuẩn lạc chứa vi khuẩn giả định.

Fig. 2 - Tạo dòng một trong số các khuẩn lạc đã tinh chế của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) cho thấy ức chế sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Fusarium oxysporum*.

Fig. 3 - Ảnh chụp trên kính hiển vi của các tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) cùng với bào tử.

Fig. 4 - Đã thể hiện các khuẩn lạc *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) đang phát triển một cách mạnh mẽ.

Fig. 5 - *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) có hình que dưới kính hiển vi quang học.

Fig. 6 - Ảnh thể hiện kết quả của thử nghiệm catalaza: (A) Mẫu đối chứng âm tính; (B) Mẫu đối chứng dương tính và (C) *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) cho thấy kết quả dương tính đối với hoạt tính catalaza.

Fig. 7 - Đã chỉ ra hoạt tính phân giải tinh bột của dịch lọc nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Fig. 8 - Ảnh thể hiện kết quả của thử nghiệm O/F (Oxidation-Fermentation - Oxy hóa-Lên men) (A) mẫu đối chứng âm tính; (B) *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) chỉ ra sự thay đổi màu sắc chỉ ở phần trên của môi trường; (C) mẫu đối chứng dương tính.

Fig. 9 - Ảnh thể hiện kết quả của thử nghiệm sản xuất hydro sulphit (A) mẫu đối chứng âm tính; (B) *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và (C) mẫu đối chứng dương tính.

Fig. 10 - Ảnh thể hiện kết quả của SDS-PAGE của dịch nuôi cấy cô đặc của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Fig. 11 - Các đĩa nuôi cấy thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm được biểu hiện bởi (A) khuẩn lạc *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và (B) dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674). Giống cây *Fusarium oxysporum* đã được sử dụng làm nấm thử nghiệm.

Fig. 12 - Ảnh thể hiện kết quả của thử nghiệm MIC của hợp chất kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm theo phương pháp pha loãng trong ống. 1 đến C-2: Ảnh bào tử của *Fusarium oxysporum* (được quan sát dưới kính hiển vi quang học), sau khi ủ trong PDB chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm ở các nồng độ khác nhau. 1-28 (Tỷ lệ pha loãng bằng từ 1:1 đến 1:100), C-1 - Bào tử trong tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm (thô); C-2 - Đối chứng (Bào tử trong canh PDB không chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm).

Fig. 13 - Ảnh thể hiện kết quả của thử nghiệm MIC của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm theo phương pháp khuếch tán trên thạch. 1 đến C-2: Ảnh của hệ sợi *Fusarium oxysporum* phát triển trên đĩa thử nghiệm. Các dịch pha loãng 1-28 của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm ở các tỷ lệ từ 1:1 đến 1:100 (v/v), C1 - Lỗ chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm (thô); C2 - Lỗ đối chứng chứa PDB; C3 - Lỗ đối chứng chứa 70% amoni sulfat bão hòa.

Fig. 14 - Ảnh thể hiện ảnh hưởng của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm đối với bào tử của *Aspergillus niger*. (A, B & C) Bào tử của *Aspergillus niger* thể hiện sự nảy mầm bình thường trong môi trường PDB; (D) Bào tử Spores của *Aspergillus niger* không nảy mầm trong môi trường PDB chứa dịch chiết *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Fig. 15 - Đĩa thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm của dịch tan tế bào đối với *Fusarium oxysporum*; (1) Lỗ chỉ chứa lysozym (để kiểm tra ảnh hưởng của

lysozym đối với nấm *Fusarium oxysporum*) và (2) Lỗ chứa dịch tan tế bào của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Fig. 16 - Đĩa thể hiện thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm của tế bào/dịch chiết *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) đối với các loài nấm và vi khuẩn khác nhau gây bệnh trên thực vật. A. *Fusarium oxysporum*, B. *Sarocladium oryzae* C. *Trichoderma viridae* D. *Colletotrichum capsicii* E. *Exerohilum turcicum* F. *Rhizoctonia solanii* G. *Macrophomina phaseolina* H. *Xanthomonas oryzae*

Fig. 17 - Đĩa thể hiện kết quả của hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm của dịch chiết *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) đối với sự nảy mầm của hạt thóc khi có mặt *Fusarium oxysporum*. (A) Hạt thóc được xử lý bằng bào tử nấm *Fusarium oxysporum*; (B & C) Hạt thóc được xử lý bằng dịch chiết nấm *Fusarium oxysporum* và *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Fig. 18 - Đĩa thể hiện kết quả của thí nghiệm cho thấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) không có khả năng gây bệnh đối với các loài thực vật khác nhau. (A) Lúa, (B) Bông, (C) Thuốc lá, (D) Ngô, và (E) Cà chua.

Fig. 19 - Ảnh thể hiện kết quả của thử nghiệm cho thấy tác dụng của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. (A) Cây cà chua bị nhiễm nấm *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194). (B) Cây cà chua với *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194) và *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và (C) Cây cà chua đối chứng (không chứa nấm *Rhizoctonia solani* và *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Fig. 20 - Các đĩa cho thấy (1) Khuẩn lạc nấm *Penicillium oxalicum* (NFCCI-1997) và (2) khuẩn lạc tinh khiết *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) .

Fig. 21 - Các đĩa cho thấy hạt ngô được phủ bằng các chế phẩm khác nhau chứa tác nhân kháng khuẩn/kháng nấm *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674). 1. Hạt (Đối chứng-1) được xử lý bằng chế phẩm không chứa mầm bệnh nấm và tác nhân kiểm soát sinh học; 2. Hạt (Đối chứng-2) được xử lý bằng chế phẩm không chứa tác nhân kiểm soát sinh học; 3. Hạt (Đối chứng-3) được xử lý bằng chế phẩm chứa thuốc diệt nấm thương mại “Carbendazim WP50”; 4a. Hạt được xử lý bằng chế phẩm chứa các tế bào

Bacillus subtilis ssp. *shriramensis* (5×10^4 cfu); 4b. Hạt được xử lý bằng chế phẩm chứa các tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^5 cfu); 4c. Hạt được xử lý bằng chế phẩm chứa các tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^6 cfu); 4d. Hạt được xử lý bằng chế phẩm chứa các tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^7 cfu) và 5. Hạt được xử lý bằng chế phẩm chỉ chứa các tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^7 cfu).

Fig. 22 - Đồ thị thể hiện kết quả hoạt tính kiểm soát sinh học sau 2 tuần ủ. 1. Hạt (Đối chứng-1) được xử lý bằng chế phẩm-1 không chứa mầm bệnh nấm và tác nhân kháng nấm; 2. Hạt (Đối chứng-2) được xử lý bằng chế phẩm-2 không chứa tác nhân kiểm soát sinh học; 3. Hạt (Đối chứng-3) được xử lý bằng chế phẩm-3 chứa thuốc diệt nấm thương mại “Carbendazim WP50”; 4a. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-4a chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^4 cfu); 4b. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-4b chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^5 cfu); 4c. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-4c chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^6 cfu); 4d. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-4d chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^7 cfu) và 5. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-5 chỉ chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^7 cfu).

Fig. 23 - Đồ thị thể hiện kết quả hoạt tính kiểm soát sinh học sau 4 tuần ủ. 1. Hạt (Đối chứng-1) được xử lý bằng chế phẩm-1 không chứa mầm bệnh nấm và tác nhân kháng nấm; 2. Hạt (Đối chứng-2) được xử lý bằng chế phẩm-2 không chứa tác nhân kiểm soát sinh học; 3. Hạt (Đối chứng-3) được xử lý bằng chế phẩm-3 chứa thuốc diệt nấm thương mại “Carbendazim WP50”; 4a. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-4a chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^4 cfu); 4b. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-4b chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^5 cfu); 4c. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-4c chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^6 cfu); 4d. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-4d chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^7 cfu) và 5. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-5 chỉ chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5×10^7 cfu).

Fig. 24 - Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm và/hoặc kháng khuẩn đối với nhiều loài nấm khác nhau gây bệnh trên người. A, B và C - Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm và/hoặc kháng khuẩn chống lại *Penicillium* spp. (A) Khuẩn lạc nấm *Penicillium* spp. (B) Hệ sợi nấm và (C) Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-

5674). D, E và F - Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm và/hoặc kháng khuẩn chống lại *Aspergillus flavus* (D) Khuẩn lạc nấm (E) Hệ sợi và (F) Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674). G, H và I - Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm và/hoặc kháng khuẩn chống lại *Aspergillus niger*. (G) Khuẩn lạc nấm (H) Hệ sợi và (I) Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674). J, K và L - Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm và/hoặc kháng khuẩn chống lại nấm chưa biết gây ra sự nhiễm trùng da. (J) Khuẩn lạc nấm (K) Bào tử đính và (L) Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Fig.25 - Ảnh hưởng của chế phẩm *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) đến sự sinh trưởng và phát triển của ngô. Hạt ngô được xử lý bằng chế phẩm chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) chỉ ra tốc độ sinh trưởng, sinh khối và sản lượng hạt lớn hơn.

Phân lập và nhận dạng vi khuẩn mới

Các tác giả sáng chế đã tuyển chọn các mẫu có trong không khí từ 18 địa điểm khác nhau ở Hyderabad và Patancheru (Telangana, India) trong khi tiến hành nghiên cứu về thực vật có trong không khí. Các đĩa petri dùng một lần chứa môi trường (Môi trường T3, Travers, *et al.*, 1987) được chuẩn bị trong phòng thí nghiệm và được cho tiếp xúc với không khí ở các địa điểm khác nhau. Các đĩa đã tiếp xúc được đậy kín và được ủ ở 30°C trong tủ ủ trong phòng thí nghiệm. Ở một trong số các đĩa đã tiếp xúc với không khí ở vùng Patancheru, quan sát thấy một khuẩn lạc vi khuẩn được bao xung quanh bởi hệ sợi nấm (Fig. 1A). Mặc dù được ủ tiếp, vùng trống vẫn được duy trì và sự phát triển của hệ sợi nấm vẫn bị hạn chế ở bên ngoài của vùng trống này. Các vi sinh vật từ khuẩn lạc được đưa đi tinh sạch bằng cách sử dụng các phương pháp vi sinh tiêu chuẩn (Fig. 1B). Các khuẩn lạc riêng rẽ được kiểm tra khả năng chống lại nấm thông thường *Fusarium oxysporum* (Fig. 2).

Một trong số các khuẩn lạc thể hiện khả năng ức chế sự sinh trưởng của nấm và quan sát thấy vùng trống (Fig. 2). Kiểm tra vi khuẩn từ khuẩn lạc này trên kính hiển vi cho thấy vi khuẩn này di động và có dạng que (Fig. 5). Sau sáu ngày ủ trong môi trường nuôi cấy, vi khuẩn này sinh bào tử. Các khuẩn lạc của vi khuẩn này là nhầy, nổi, có hình

tròn, nhẵn, và có màu từ kem đến trắng nhờ (Fig. 4), và các tế bào thể hiện sự nhuộm gram có thể thay đổi (Fig. 5).

Một loạt các thử nghiệm hóa sinh bao gồm lên men hydrat cacbon, hoạt tính catalaza, thử nghiệm oxy hóa-lên men, thủy phân tinh bột, thử nghiệm sản sinh hydro sulfua, thử nghiệm hoạt tính oxidaza, thử nghiệm desoxycholate aga được thực hiện. Kết quả của những thử nghiệm này xác nhận rằng vi khuẩn này là dương tính với catalaza, có hoạt tính amylaza, cực kỳ hiếu khí, không sản sinh hydro sulfua, dương tính với oxidaza và có thể thay đổi đặc tính nhuộm gram.

Để nhận diện vi khuẩn, phương pháp phân tích FAME và xác định trình tự 16S DNA được thực hiện. Kết quả của cả hai nghiên cứu này chỉ ra rằng vi khuẩn này thể hiện sự khác biệt về trình tự 16S DNA và chỉ số độ tương tự FAME bằng 0,827 với *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* và 0,84% sự khác biệt về trình tự 16S DNA và chỉ số độ tương tự FAME bằng 0,749 với *Bacillus atrophaeus*. Vì vậy, kết quả gợi ý rằng vi khuẩn này có liên quan đến *Bacillus subtilis* và *Bacillus atrophaeus*, nhưng không giống bất kỳ loài vi khuẩn nào đã được liệt kê trong bộ sưu tập ATCC.

Kết quả của so sánh trình tự 16S DNA

Bắt cặp	% khác biệt	Chiều dài	Tên ghi trong thư viện
1	0,19	535	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>
2	0,84	535	<i>Bacillus atrophaeus</i>
3	1,03	535	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>

Kết quả của phép so sánh phân tích FAME

Số	Chỉ số độ tương tự	Tên ghi trong thư viện
1	0,827	<i>Bacillus subtilis</i>
2	0,749	<i>Bacillus atrophaeus</i>

Vi khuẩn đã phân lập là một thành viên mới thuộc phân loài của giống *Bacillus*. Theo quy tắc đặt tên vi khuẩn, loài vi khuẩn mới này có tên gọi là *Bacillus subtilis* ssp.

shriramensis. Vi khuẩn này được lưu giữ trong bộ sưu tập chủng giống kiểu vi khuẩn (Microbial Type Culture Collection - MTCC) ở IMTECH, Chandigarh, India. Số lưu giữ của loài mới này là (MTCC-5674).

Các đặc điểm đặc trưng của vi khuẩn mới có số truy cập/lưu giữ (MTCC-5674) được tạo ra bởi sáng chế

Vi khuẩn này có hình que với kích thước 2,45x0,88 μm , di động, sinh bào tử, đặc tính nhuộm gram có thể thay đổi; khuẩn lạc nhẵn, nhầy, màu trắng nhờ đến kem ở các giai đoạn đầu nhưng trở nên có nếp nhăn khi ủ kéo dài. Vi khuẩn biến đổi thành bào tử khi các chất dinh dưỡng trong môi trường bị suy kiệt, thông thường quá trình hình thành bào tử xảy ra trong 4 ngày ủ trong 10 ml môi trường chứa 100 μl giống cấy chứa 5×10^8 tế bào trong ống nuôi cấy 25x150 mm ở 30 °C và lắc ở 200 vòng/phút.

Vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm. Dịch chiết của vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm. Phạm vi của các ứng dụng tiềm năng và việc sử dụng vi khuẩn này là rộng lớn.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất dịch chiết kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm từ vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674).

Sản xuất và phân lập tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm

Thành phần của môi trường nuôi cấy để *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) phát triển là như sau

1. Trypton : 0,32 % (w/v)
2. Tryptone : 0,24 % (w/v)
3. Dịch chiết nấm men : 0,18 % (w/v)
4. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,044 M
5. Na_2HPO_4 : 0,062 M
6. MnCl_2 : 0,000 5% (w/v)

pH = 6,8

1. Môi trường được chuẩn bị theo phương pháp nêu trong Phụ lục I (I) và các phần phân ước 100 ml được chuyển vào các bình thót cổ hình nón dung tích 500 ml. Môi trường được thanh trùng bằng cách hấp ở 121°C trong 15 phút.
2. Mỗi bình thót cổ được cấy bằng một khuẩn lạc thuần khiết duy nhất của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và được ủ ở 30°C, 200 vòng/phút trong 60 giờ.

Phân lập tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm từ môi trường nuôi cấy

Sau khi vi khuẩn sinh trưởng trong canh T3 trong 60 giờ, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C. Phần dịch nổi được thu hồi và được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc đĩa cỡ lỗ 0,22 µm (Millipore/Sartorius). Dịch lọc được bảo quản trong điều kiện lưu trữ thích hợp để dùng cho các thí nghiệm cụ thể nhằm nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Đặc biệt là, sáng chế đề xuất vi sinh vật mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) và phương pháp sản xuất chế phẩm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm từ vi khuẩn mới này và/hoặc dịch chiết của nó hoặc hỗn hợp gồm vi khuẩn mới này và/hoặc dịch chiết của nó.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến vi khuẩn được phân lập mới thuộc *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm, có số truy cập (MTCC-5674).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến vi khuẩn mới có tên gọi *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674).

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến giống cây thuần khiết của vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến dịch chiết của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) trong đó dịch chiết này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến dịch chiết của vi khuẩn mới

Bacillus subtilis ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) trong đó dịch chiết thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm là dịch chiết trong nước. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất dịch chiết của vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), trong đó quy trình này bao gồm bước cho vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), sinh trưởng trong môi trường dinh dưỡng và thu hồi dịch chiết có hoạt tính kháng nấm bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất dịch chiết của vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) trong đó quy trình này bao gồm bước cho vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), sinh trưởng trong điều kiện hiếu khí.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất dịch chiết của vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), trong đó quy trình này bao gồm bước cho vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis*, sinh trưởng trong môi trường dinh dưỡng, thu hồi dịch chiết có hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và tùy ý bao gồm bước cô đặc dịch chiết này bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), trong đó chế phẩm này có hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa dịch chiết của vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), trong đó chế phẩm này có hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) và dịch chiết của vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), trong đó chế phẩm này có hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), và/hoặc dịch chiết của vi khuẩn

mới đã nêu, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis*, hoặc tổ hợp của chúng mà tùy ý bao gồm một hoặc nhiều tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa dịch chiết của vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), mà tùy ý bao gồm một hoặc nhiều tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa tổ hợp của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) và dịch chiết của nó mà tùy ý bao gồm một hoặc nhiều tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), hoặc dịch chiết của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) hoặc tổ hợp của chúng mà tùy ý bao gồm chất mang nông dụng hoặc được dụng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa the vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674), mà tùy ý bao gồm chất mang nông dụng hoặc được dụng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa dịch chiết của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) mà tùy ý bao gồm chất mang nông dụng hoặc được dụng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa tổ hợp của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) và dịch chiết của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *Shriramensis* này, tùy ý bao gồm chất mang nông dụng (Xem phụ lục III).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự sinh trưởng của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh tiếp xúc với lượng hữu hiệu vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) hoặc chế phẩm chứa vi khuẩn mới đã nêu, hoặc dịch chiết của nó hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp để ức chế sự sinh trưởng

của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh tiếp xúc với lượng hữu hiệu vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674).

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự sinh trưởng của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh tiếp xúc với lượng hữu hiệu chế phẩm chứa vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674).

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự sinh trưởng của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh tiếp xúc với lượng hữu hiệu chế phẩm chứa dịch chiết của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674), trong đó dịch chiết này có hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự sinh trưởng của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh tiếp xúc với lượng hữu hiệu chế phẩm chứa vi khuẩn mới, *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và dịch chiết của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* đã nêu, trong đó dịch chiết này có hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) hoặc chế phẩm chứa vi khuẩn mới đã nêu hoặc dịch chiết của nó hoặc tổ hợp của chúng, để điều chế chế phẩm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm để ức chế sự sinh trưởng của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674) để điều chế chế phẩm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm để ức chế sự sinh trưởng của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm chứa vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) để điều chế chế phẩm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm để ức chế sự sinh trưởng của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm chứa dịch chiết của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) để điều chế chế phẩm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm để ức chế sự sinh trưởng của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm chứa dịch chiết của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và dịch chiết của vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* này để điều chế chế phẩm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm để ức chế sự sinh trưởng của nấm và/hoặc vi khuẩn gây bệnh.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm hữu hiệu dùng trong dược phẩm và nông nghiệp chứa the vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm hữu hiệu dùng trong dược phẩm và nông nghiệp chứa dịch chiết của the vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm hữu hiệu đã nêu từ vi khuẩn mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674).

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, các bước và thời gian cần thiết để sản xuất chế phẩm/dịch chiết đã nêu là duy trì trong khoảng thời gian tối thiểu kết hợp với thu hồi tối đa hợp chất.

Các lợi thế hoặc ích khác của sáng chế

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) cùng với tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm cũng sản sinh proteaza và amylaza cực kỳ ưa nhiệt mà có hoạt tính thậm chí sau khi tiếp xúc với nhiệt độ cao, chẳng hạn 121°C trong 15 phút.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích rõ hơn bởi các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này theo cách bất kỳ. Các ví dụ sau đây nhằm minh họa các phương án thực hiện mà không nhằm áp dụng những giới hạn bất kỳ cho phạm vi của

sáng chế. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các thay thế tương đương cho các hợp chất cụ thể được nêu trong bản mô tả này, hoặc các cải tiến tương ứng được xem là thuộc phạm vi của sáng chế.

Phương pháp học cụ thể được giải thích trong các ví dụ sau đây:

Các phương pháp được dùng trong sáng chế là đã được biết rõ trong lĩnh vực vi sinh, trong đó các thông số tương ứng được thay đổi và tối ưu hóa cho nghiên cứu trong sáng chế.

Ví dụ 1

1.1. Suu tập và sàng lọc sơ bộ các mẫu có trong không khí

Việc lấy mẫu trong không khí được thực hiện ở các địa điểm khác nhau ở Hyderabad và Patancheru (Telangana, India). Các đĩa petri dùng một lần chứa môi trường T3 được chuẩn bị trong phòng thí nghiệm và được tiếp xúc với không khí ở các địa điểm khác nhau. Các đĩa đã tiếp xúc được đậy kín và được ủ ở 30°C trong tủ ủ trong phòng thí nghiệm. Ở một trong số các đĩa đã tiếp xúc với không khí ở vùng Patancheru, quan sát thấy một khuẩn lạc vi khuẩn được bao xung quanh bởi hệ sợi nấm.

1.2. Sàng lọc sơ bộ các mẫu có trong không khí dựa trên hoạt tính kháng khuẩn và /hoặc kháng nấm

Mặc dù được ủ tiếp, vùng trống vẫn được duy trì và sự phát triển của hệ sợi nấm vẫn bị hạn chế ở bên ngoài của vùng trống này. Các vi sinh vật từ khuẩn lạc được đưa đi tinh sạch bằng cách sử dụng các phương pháp vi sinh tiêu chuẩn (Fig. 1B). Các khuẩn lạc riêng rẽ được kiểm tra khả năng chống lại nấm thông thường *Fusarium oxysporum* (Fig. 2). Một trong số các khuẩn lạc thể hiện khả năng ức chế sự sinh trưởng của nấm và quan sát thấy vùng trống (Fig. 2).

1.3. Sàng lọc thể phân lập mới

Đánh giá vi khuẩn dưới kính hiển vi cho thấy đây là vi khuẩn có hình que và chuyển động (Fig. 5). Sau sáu ngày ủ, vi khuẩn sinh bào tử.

Các khuẩn lạc của vi khuẩn này là nhầy, nổi, có hình tròn, nhẵn, và có màu từ kem đến trắng nhờ (Fig. 4), và các tế bào này thể hiện sự nhuộm gram có thể thay đổi.

Ví dụ 2

2.1. Mô tả đặc trưng và nhận dạng của vi sinh vật mới

2.1.1 Đặc trưng của thể phân lập mới *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* có số truy cập (MTCC-5674)

Một loạt các thử nghiệm hóa sinh bao gồm lên men hydrat cacbon, thử nghiệm catalaza, thử nghiệm oxy hóa-lên men, thủy phân tinh bột, thử nghiệm sản sinh hydro sulfua, thử nghiệm hoạt tính oxidaza được thực hiện. Kết quả của ngưỡng thử nghiệm này xác nhận rằng vi khuẩn này là dương tính với catalaza, dương tính với amylaza, dương tính với oxydaza và cực kỳ hiếu khí.

2.1.1.1. *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)- Hình thái học khuẩn lạc

Các khuẩn lạc của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) là nhầy, nổi, hình tròn, nhẵn và có màu từ kem đến trắng nhờ (Fig. 4).

2.1.1.2. Đặc tính nuôi cấy

Bacillus subtilis ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) thể hiện sự sinh trưởng tối ưu ở 30°C (có thể sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 15°C đến 55°C). Do nó là vi khuẩn hiếu khí, nó đòi hỏi phải có một lượng oxy thích hợp để sinh trưởng, cần lắc liên tục để nuôi cấy trồng canh.

2.1.1.3. Hình thái học tế bào

Các tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) có hình que, đứng thành cặp nối tiếp nhau (diplobacilli) và chuyển động (Fig. 5).

2.1.1.3.1 So sánh sự phát triển của khuẩn lạc và hình thái học của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) với sự phát triển của khuẩn lạc và hình thái học của *Bacillus subtilis* và *Bacillus atrophaeus*

	<i>B. subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i>	<i>B. subtilis</i> ssp, <i>subtilis</i>	<i>B. atrophaeus</i>
--	--	--	----------------------

Hình thái khuẩn lạc	Nhảy, hình tròn, nhẵn, (gồ ghề sau khi ủ trong thời gian dài), đường kính 2,0-4,0 mm.	Nhảy, hình tròn, nguyên vẹn, đục, đường kính 2,0-4,0 mm	Đục, nhẵn, hình tròn, nguyên vẹn và có đường kính 1,0-2,0 mm (Nakamura L.K. 1989).
Màu khuẩn lạc	Kem đến trắng nhờ	Trắng nhờ đến nâu	Nâu sẫm đến đen

2.1.1.4. Thử nghiệm catalaza

Vật liệu

- Ống nuôi cấy chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Hydro peroxit

Phương pháp

- Ba ống chứa môi trường LB được gắn nhãn là “mẫu thử nghiệm”, “mẫu đối chứng dương tính” và “mẫu đối chứng âm tính”, một vòng que cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674), *Escherichia coli* và *Streptococcus pneumonia* được cấy vào trong các ống tương ứng. Sau khi ủ ở 30°C trong 24 giờ, vài giọt hydro peroxit được bổ sung vào trong tất cả các ống và được quan sát sự hình thành bọt khí.

Kết quả

Bọt khí được hình thành ở cả ống “mẫu thử nghiệm” và ống “mẫu đối chứng dương tính” chỉ ra rằng *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) là dương tính đối với catalaza (Fig. 6).

2.1.1.5. Thủy phân tinh bột

Vật liệu

- Dịch lọc nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Đĩa thạch chứa tinh bột
- Iot

- Tủ ủ

Phương pháp

Môi trường thạch tinh bột được chuẩn bị theo phương pháp được nêu trong phụ lục – I (VI). Hai lỗ được tạo ra ở các khoảng cách bằng nhau trong đĩa chứa môi trường thạch tinh bột và được gắn nhãn “mẫu thử nghiệm” và “mẫu đối chứng âm tính”. Phần phân ước gồm 500 µl dịch lọc nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và nước cất vô trùng được phân phối vào các lỗ gắn nhãn “mẫu thử nghiệm” và “mẫu đối chứng âm tính”. Đĩa được ủ ở 50°C trong 4 giờ.

Kết quả

Sau 4 giờ ủ, màu xanh da trời bao quanh mẫu thử nghiệm biến mất, chỉ ra rằng dịch lọc nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) có hoạt tính phân giải tinh bột. Không quan sát thấy sự thay đổi màu xanh da trời trong vùng bao quanh lỗ đối chứng (Fig. 7).

2.1.1.6. Thử nghiệm O/F (Oxy hóa -Lên men)

Vật liệu

- Môi trường cơ bản dùng cho thử nghiệm OF của Hugsh Leifson
- Ống nghiệm
- Giống cấy *E.coli*
- *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Tủ ủ

Phương pháp

Ba ống chứa môi trường cơ bản OF của Hugsh Leifson (OFBM) (Phụ lục– I (VII)) được gắn nhãn là “mẫu đối chứng âm tính”, “mẫu đối chứng dương tính” và “mẫu thử nghiệm” và một vòng que cấy *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) được cấy vào các ống tương ứng. Các ống được ủ ở 30°C trong 48 giờ và được quan sát sự thay đổi màu sắc.

Kết quả

Từ những nhận xét đó kết luận được rằng sinh vật thử nghiệm (*Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) hiếu khí nghiêm ngặt do nó không lên men hydrat cacbon (không tạo khí cũng như không có sự thay đổi màu sắc) ở sâu trong môi trường này. Do tính sẵn có của oxy trên bề mặt của môi trường, quan sát thấy sự thay đổi màu một chút. Ngược lại, *E. coli* sinh trưởng rất mạnh ở sâu trong môi trường và lên men hydrat cacbon (cả tạo khí cũng như làm thay đổi màu của môi trường) chỉ ra rằng vi khuẩn này là kỵ khí tùy tiện (Fig. 8). Trong mẫu đối chứng âm tính, không quan sát thấy cả sự tạo khí cũng như sự thay đổi màu.

2.1.1.7. Thử nghiệm sản sinh hydro sulfua

Vật liệu

- Môi trường SIM (Sulfide Indole Motility)
- Ống nuôi cấy
- Giống cây *E.coli*
- *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Tủ ủ

Phương pháp

- Các ống chứa môi trường SIM [Sulfide Indole Motility, {Phụ lục – I (VII)}] được gắn nhãn “mẫu đối chứng âm tính” và “mẫu thử nghiệm” và một vòng que cấy chứa *E. coli* và *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674), được cấy lần lượt vào các ống, và được ủ ở 30°C trong 24 giờ và quan sát sự thay đổi màu sắc.

Kết quả

Từ những nhận xét thu được, kết luận rằng sinh vật thử nghiệm âm tính đối với sự sản sinh H₂S do môi trường không chuyển thành màu đen. Quan sát thấy kết quả tương tự ở mẫu đối chứng âm tính (Fig. 9).

2.1.1.8. Ảnh hưởng của độ pH đối với sự sinh trưởng của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)

Các ống nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy tiêu chuẩn (LB) được điều chỉnh đến các giá trị độ pH khác nhau nằm trong khoảng từ 3,4 đến 11,0 (từ axit đến bazơ) được sử dụng để nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) trong các điều kiện tiêu chuẩn. Quan sát sự sinh trưởng của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,4 đến 7,2 và nhận thấy độ pH tối ưu là 7,0.

2.1.1.9. Thử nghiệm độ nhạy kháng sinh của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)

Giống cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) 24 giờ tuổi được trải trên bề mặt của thạch T3. Các đĩa kháng sinh khác nhau được đặt trên bề mặt của đĩa thạch T3 được gắn nhãn kháng sinh tương ứng. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 24 giờ.

Bảng-1 Quan sát độ nhạy kháng sinh của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) RES – kháng, INT – trung bình, SEN - Nhạy

Số	Kháng sinh	Mã	Vùng	Kết quả	Tiêu chuẩn		
					RES	INT	SEN
1	Ampicillin	A10	0	RES	13	14-16	17
2	Gentamicin	G10	20	SEN	12	13-14	15
3	Tobramycin	TB10	15	SEN	12	13-14	15
4	Carbenicillin	CB100	15	RES	19	20-22	23
5	Vancomycin	VA30	20	SEN	<15		15
6	Oxacillin	OX1	11	INT	10	11-12	13
7	Novobiocin	NV30	24	SEN	17	18-21	22
8	Sulfisoxazole	SF300	33	SEN	12	13-16	17
9	Amikacin	AK30	15	INT	14	15-16	17
10	Kanamycin	K10	13	RES	13	14-17	18
11	Streptomycin	S10	12	INT	11	12-14	15
12	Cephalothin	CH30	40	SEN	14	15-17	18
13	Chloramphenicol	C30	25	SEN	12	13-17	18
14	Erythromycin	E15	16	INT	13	14-22	23
15	Enrofloxacin	EX10	41	RES	N/A	N/A	N/A
16	Lincomycin	L10	12	RES	N/A	N/A	N/A
17	Amoxicillin	AC30	0	RES	19		20

18	Clindamycin	CD2	10	RES	14	15-20	21
19	Ceftriaxone	CI30	28	SEN	13	14-20	21
20	Bacitracin	B10	21	SEN	8	9-12	13
21	Neomycin	N30	12	RES	12	13-16	17
22	Azithromycin	AT15	10	RES	13	14-17	18

Kết quả

Từ những nhận xét trên đã kết luận rằng *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) có tính kháng đối với các kháng sinh ampicillin, carbenicillin, kanamycin, enrofloxacin, lincomycin, amoxicillin, clindamycin, neomycin, azithromycin. Vi khuẩn thử nghiệm nhạy với gentamicin, tobramycin, vancomycin, novobiocin, sulfisoxazole, cephalothin, chloramphenicol, ceftriaxone và bacitracin và thể hiện tính kháng trung bình với oxacillin, amikacin, streptomycin và erythromycin.

2.1.2. Nhận dạng thể phân lập *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) mới

Để nhận dạng vi khuẩn, phương pháp phân tích FAME và xác định trình tự 16S DNA được thực hiện. Kết quả của cả hai nghiên cứu đã chỉ ra rằng vi khuẩn này thể hiện mức khác biệt 0,37% về trình tự 16S DNA và chỉ số độ tương tự FAME bằng 0,827 với *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* và mức khác biệt 0,84% về trình tự 16S DNA và chỉ số độ tương tự FAME bằng 0,749 với *Bacillus atrophaeus*. Vì vậy, kết quả chỉ ra rằng vi khuẩn này có liên quan đến *Bacillus subtilis* và *Bacillus atrophaeus*, nhưng không giống hệt với bất kỳ loài vi khuẩn nào trong số các loài vi khuẩn đã được liệt kê trong bộ sưu tập ATCC.

2.1.2.1. Kết quả so sánh trình tự 16S DNA

Bắt cặp	% khác biệt	Chiều dài	Tên ghi trong thư viện
1	0,19	535	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>
2	0,84	535	<i>Bacillus atrophaeus</i>
3	1,03	535	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>

2.1.2.2. Kết quả so sánh phân tích FAME

Số	Chỉ số độ tương tự	Tên ghi trong thư viện
1	0,827	<i>Bacillus subtilis</i>
2	0,749	<i>Bacillus atrophaeus</i>

Vi khuẩn được phân lập là thành phần mới thuộc giống *Bacillus*. Theo quy tắc đặt tên vi khuẩn, loài vi khuẩn mới này có tên gọi là *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis*. Vi khuẩn này được lưu giữ trong bộ sưu tập chủng giống kiểu vi khuẩn (Microbial Type Culture Collection - MTCC) ở IMTECH, Chandigarh, India. Số lưu giữ của loài mới này là (MTCC-5674).

Ví dụ 3

3.1. Sản xuất và sàng lọc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm

3.1.1. Sản xuất tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm

Vật liệu

- Canh T3 – 1 L
- Bình nón thót cổ – dung tích 2 L
- Kanamycin (30 µg/ml)
- Chủng cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Tủ ủ kèm theo lắc (đặt ở nhiệt độ 30°C & lắc ở 200 vòng/phút)

Phương pháp

Canh T3 được điều chế theo phương pháp được mô tả trong Phụ lục – I (1). 1 ml dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) được cấy vào canh T3 vô trùng và được ủ trong tủ ủ có kèm theo lắc ở 30°C trong 60 giờ, đồng thời lắc ở 200 vòng/phút. Sau khi *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) sinh trưởng trong canh T3 trong 60 giờ, môi trường nuôi cấy được ly tâm ở 12000 vòng/phút và 4°C trong 10 phút. Phần dịch nổi được thu hồi và cho đi qua dụng cụ lọc cỡ lỗ 0,22 µm để tách các tế bào vi khuẩn bất kỳ còn sót lại. Dịch lọc được giữ ở 4°C.

3.1.2. Sàng lọc hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm của dịch lọc nuôi cấy thu được ở bước 3.1.1 trên đây

Vật liệu

- Dịch lọc nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm
- Đĩa PDA
- Nấm thử nghiệm *Fusarium oxysporum*
- Tủ ủ

Phương pháp

Để thử nghiệm hoạt tính của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm trong dịch lọc, tạo ra một lỗ ở một góc của đĩa thạch PDA, 500 µl dịch lọc được đưa vào lỗ này. Một vòng que cấy chứa nấm *Fusarium oxysporum* được cấy ở một góc khác trên cùng đĩa thạch PDA và được ủ trong 5 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Hoạt tính ức chế của dịch lọc đối với nấm *Fusarium oxysporum* được xác định là vùng ức chế xung quanh lỗ tính bằng milimet.

Kết quả

Quan sát thấy vùng ức chế rõ rệt 14 mm quanh lỗ này, gợi ý rằng phương pháp này được sử dụng để sản xuất tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm là tối ưu.

3.2. Đặc tính của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm

Hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm có liên quan đến *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* được nghiên cứu để xác định bản chất của tác nhân gây ra hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Vật liệu

- Canh T3 – 1 L
- Bình nón thót cổ – dung tích 2L
- Kanamycin (30 µg/ml)
- Chủng cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Tủ ủ kèm theo lắc

Phương pháp

Canh T3 được điều chế theo phương pháp được mô tả trong Phụ lục – I (1). Phần phân ước 1 ml của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) 24 giờ tuổi được cấy vào canh T3 vô trùng và được ủ trong tủ ủ kèm theo lắc ở 30°C trong 60 giờ, đồng thời lắc ở 200 vòng/phút. Sau khi *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) sinh trưởng trong canh T3 trong 60 giờ, môi trường nuôi cấy được ly tâm ở 12000 vòng/phút và 4°C trong 10 phút. Phần dịch nổi được thu hồi và được cho qua dụng cụ lọc cỡ lỗ 0,22 µm để loại bỏ các tế bào vi khuẩn còn sót lại.

3.2.1. Thử nghiệm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm với tế bào vi khuẩn *Bacillus subtilis* ssp. *Shriramensis* (MTCC- 5674)

Để thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm tác nhân bởi các tế bào, một vòng que cấy chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) được cấy ở một góc của đĩa thạch T3 và một vòng que cấy chứa nấm *Fusarium oxysporum* được cấy ở một góc khác trên cùng đĩa thạch T3 và được ủ trong 5 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Hoạt tính ức chế của tế bào vi khuẩn đối với nấm *Fusarium oxysporum* được xác định là vùng ức chế bao quanh khuẩn lạc vi khuẩn tính bằng milimet.

Kết quả

Quan sát thấy vùng trống ức chế 14 mm (Fig. 11A) bao quanh khuẩn lạc vi khuẩn, gợi ý rằng hợp chất có hoạt tính được tiết ra bởi tế bào vi khuẩn được khuếch tán ra và đi vào môi trường nuôi cấy tạo thành vùng trống tách ra khỏi khuẩn lạc vi khuẩn.

3.2.2. Thử nghiệm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm bởi dịch lọc nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)

Để thử nghiệm bản chất của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm trong dịch lọc, tạo ra một lỗ trong đĩa thạch PDA và 500 µl dịch lọc được đưa vào lỗ này. Một vòng que cấy chứa nấm *Fusarium oxysporum* được cấy ở một góc chéo đối diện trên cùng đĩa thạch PDA và được ủ trong 5 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Hoạt tính ức chế của dịch lọc đối với nấm *Fusarium oxysporum* được xác định là vùng ức chế xung quanh lỗ tính bằng milimet.

Kết quả

Quan sát thấy vùng trống ức chế 14 mm (Fig. 11B) bao quanh lỗ này, gợi ý rằng dịch lọc vẫn có hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm, vì vậy chỉ ra rằng hợp chất có hoạt tính được tiết ra khỏi tế bào vi khuẩn đi vào môi trường nuôi cấy.

3.3. Xác định MIC của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm từ *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)

3.3.1 Làm đông khô tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm

Vật liệu

- Dịch lọc nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Amoni sulphat
- Thiết bị sấy thăng hoa

Phương pháp

Tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm được sản xuất và tinh chế bằng các phương pháp được giải thích trong 3.1.1. Phần phân ước 800 ml dịch lọc nuôi cấy được kết hợp với 382,18 g amoni sulphat bão hòa ở 70% (w/v) (quy trình cải biến của Jing *et al.*, 2009) và dung dịch được trộn nhẹ nhàng bằng cách khuấy qua đêm ở 4°C. Huyền phù được ly tâm ở 10,000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Viên kết thu được được làm đông khô trong 24 giờ trong thiết bị sấy thăng hoa và viên kết đã sấy được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng.

3.3.2 MIC của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm từ *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)

Các phương pháp

3.3.2.1 Phương pháp pha loãng trong ống nghiệm

3.3.2.2 Phương pháp khuếch tán trên thạch

- Chuẩn bị dung dịch gốc chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm đã được làm đông khô

Dung dịch gốc được điều chế bằng cách pha loãng 1 g bột tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm đã ddwwocj làm đông khô trong 50 ml dung dịch đệm phosphat (độ pH 7,0). Nồng độ cuối của dung dịch gốc được điều chỉnh đến 20 µg/µl. Dung dịch gốc này được sử dụng để tạo ra các dung dịch pha loãng trong môi trường PDB ở các tỷ lệ khác nhau như được chỉ ra trong Bảng-1.

3.3.2.1 Phương pháp pha loãng trong ống nghiệm

Vật liệu

- Ống nghiệm 1,5 ml
- môi trường PDB
- Dung dịch gốc chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm
- Huyền phù chứa bào tử của *Fusarium oxysporum*

Phương pháp

Thử nghiệm MIC của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm được thực hiện trong các ống nghiệm 1,5 ml Các dịch pha loãng khác nhau của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm được chuẩn bị trong môi trường PDB (Bảng -2) nằm trong khoảng từ 10 µg/µl (1:1) đến 198 ng/µl (1:100). Thử nghiệm MIC được tiến hành đối với *Fusarium oxysporum* bằng cách bổ sung 30 µl (5×10^6 cfu/ml) huyền phù chứa bào tử vào tất cả các ống nghiệm và ủ ở 28°C, trong 2 ngày, lắc ở 180 vòng/phút.

Ba mẫu đối chứng được sử dụng, một mẫu với dung dịch gốc tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm chưa được pha loãng, mẫu thứ hai với 70% amoni sulfat trong PDB và mẫu thứ ba chỉ với PDB. Môi trường trong cả ba ống được cấy 30 µl (5×10^6 cfu/ml) huyền phù chứa bào tử *Fusarium oxysporum* và được ủ ở 28°C, trong 2 ngày, đồng thời lắc ở 180 vòng/phút.

3.3.2.2 Phương pháp khuếch tán trên thạch

Vật liệu

- Đĩa PDA (thạch dextroza khoai tây - Potato Dextrose Agar)
- Môi trường PDB (canh dextroza khoai tây - Potato Dextrose Broth)

- Dung dịch gốc chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm
- *Fusarium oxysporum*

Phương pháp

Thử nghiệm MIC của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) đã được làm đông khô cũng được tiến hành theo phương pháp khuếch tán trên thạch. Bốn lỗ có đường kính 9 mm, mỗi lỗ được tạo ra ở các khoảng cách bằng nhau trên đĩa PDA. Các dịch pha loãng khác nhau của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm được chuẩn bị trong PDB (Table-3) nằm trong khoảng từ 10 µg (1:1) đến 198 ng (1:100). Một phần phân ước 200 µl của mỗi dịch pha loãng được đưa vào lỗ có gắn nhãn dịch pha loãng tương ứng. Nấm thử nghiệm *Fusarium oxysporum* được cấy ở tâm của môi trường PDA và đĩa được ủ ở 28°C trong 4 ngày.

Đĩa với ba mẫu đối chứng, một chứa dung dịch gốc của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm, mẫu thứ hai chỉ chứa canh PDB và mẫu thứ ba chứa PDB với 70 % amoni sulphat được dùng làm đĩa đối chứng. Hoạt tính được xác định là vùng ức chế tính bằng milimet bao quanh lỗ.

Kết quả

Phương pháp pha loãng trong ống nghiệm (Fig.12)

Các mẫu được quan sát sự tạo bào tử dưới kính hiển vi quang học sau 48 giờ ủ. Các bào tử không tạo ra trong các ống nghiệm chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm ở các tỷ lệ 1:1, 1:2, 1:3 và 1:4. Quan sát thấy sự tạo bào tử vừa phải ở các ống nghiệm chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm ở các tỷ lệ pha loãng là 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 và 1:9, và quan sát thấy sự tạo bào tử và sự hình thành hệ sợi ở các ống nghiệm còn lại chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm ở các tỷ lệ từ 1:10 đến 1:100 (Bảng 2).

Bảng-2 MIC của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm theo phương pháp pha loãng trong ống nghiệm

Số thứ tự	Tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm: PDB	Nồng độ của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm sau khi pha loãng ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tổng nồng độ của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm được sử dụng trong mỗi lỗ trên đĩa thạch ($\mu\text{g}/200\mu\text{l}$)	Tỷ lệ phần trăm của nấm bị ức chế (vùng ức chế tính bằng mm)
1	1:1	10,000	2000,00	92,30 (12)
2	1:2	6,666	1333,20	84,61 (11)
3	1:3	5,000	1000,00	76,92 (10)
4	1:4	4,000	800,00	61,53 (8)
5	1:5	3,333	666,60	46,15 (6)
6	1:6	2,857	571,40	38,46 (5)
7	1:7	2,500	500,00	23,07 (3)
8	1:8	2,222	444,40	15,38(2)
9	1:9	2,000	400,00	0 (0)
10	1:10	1,818	363,60	0 (0)
11	1:15	1,250	250,00	0 (0)
12	1:20	0,952	190,40	0 (0)
13	1:25	0,769	153,80	0 (0)
14	1:30	0,645	129,00	0 (0)
15	1:35	0,555	111,00	0 (0)
16	1:40	0,487	97,40	0 (0)
17	1:45	0,434	86,80	0 (0)
18	1:50	0,392	78,40	0 (0)
19	1:55	0,357	71,40	0 (0)
20	1:60	0,327	65,40	0 (0)
21	1:65	0,303	60,60	0 (0)
22	1:70	0,281	56,20	0 (0)
23	1:75	0,263	52,60	0 (0)
24	1:80	0,246	49,20	0 (0)
25	1:85	0,232	46,40	0 (0)
26	1:90	0,219	43,80	0 (0)
27	1:95	0,208	41,60	0 (0)
28	1:100	0,198	39,60	0 (0)
29	Chỉ chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm	Thô (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	4000,00	100 (13)
30	Chỉ chứa môi trường	0	0	0 (0)
31	Chỉ chứa amoni sulphat 70%	0	0	0 (0)

Phương pháp khuếch tán trên thạch (Fig.13)

Quan sát sự ức chế sự sinh trưởng của hệ sợi nấm xung quanh các lỗ chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm ở các tỷ lệ 1:1, 1:2, 1:3 và 1:4 (Bảng 3). Quan sát thấy sự ức chế vừa phải xung quanh các lỗ chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm ở các tỷ lệ pha loãng 1:5, 1:6 và 1:7 và không quan sát thấy sự ức chế ở các tỷ lệ pha loãng còn lại (từ 1:8 đến 1:100) (Bảng 3).

Kết luận

Từ những thí nghiệm trên đây, kết luận rằng tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm ở dạng bột của dịch chiết thô ức chế sự tạo bào tử cũng như sự sinh trưởng của hệ sợi ở tỷ lệ pha loãng lên tới 1:4 (v/v), theo cách phụ thuộc nồng độ.

Bảng-3 MIC của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm theo phương pháp khuếch tán trên thạch

Số thứ tự	Tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm: PDB	Nồng độ của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm sau khi pha loãng ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tổng nồng độ của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm được sử dụng trong mỗi ống nghiệm ($\mu\text{g}/200\mu\text{l}$)	Tạo bào tử
1	1:1	10,000	2000,00	Không tạo bào tử
2	1:2	6,666	1333,20	Không tạo bào tử
3	1:3	5,000	1000,00	Không tạo bào tử
4	1:4	4,000	800,00	Không tạo bào tử
5	1:5	3,333	666,60	Sự trôi lên của ống
6	1:6	2,857	571,40	Sự sinh trưởng của
7	1:7	2,500	500,00	Sự dài ra của ống mầm
8	1:8	2,222	444,40	Sự sinh trưởng của hệ
9	1:9	2,000	400,00	Sự mở rộng của hệ sợi
10	1:10	1,818	363,60	Hệ sợi xếp chặt
11	1:15	1,250	250,00	Hệ sợi xếp chặt
12	1:20	0,952	190,40	Hệ sợi xếp chặt
13	1:25	0,769	153,80	Hệ sợi xếp chặt
14	1:30	0,645	129,00	Hệ sợi xếp chặt
15	1:35	0,555	111,00	Hệ sợi xếp chặt
16	1:40	0,487	97,40	Hệ sợi xếp chặt
17	1:45	0,434	86,80	Hệ sợi xếp chặt
18	1:50	0,392	78,40	Hệ sợi xếp chặt
19	1:55	0,357	71,40	Hệ sợi xếp chặt
20	1:60	0,327	65,40	Hệ sợi xếp chặt
21	1:65	0,303	60,60	Hệ sợi xếp chặt
22	1:70	0,281	56,20	Hệ sợi xếp chặt
23	1:75	0,263	52,60	Hệ sợi xếp chặt
24	1:80	0,246	49,20	Hệ sợi xếp chặt
25	1:85	0,232	46,40	Hệ sợi xếp chặt
26	1:90	0,219	43,80	Hệ sợi xếp chặt
27	1:95	0,208	41,60	Hệ sợi xếp chặt
28	1:100	0,198	39,60	Hệ sợi xếp chặt
29	Chỉ chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm	Thô (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	4000,00	Không tạo bào tử
30	Chỉ chứa môi	0	0	Hệ sợi xếp chặt
31	Chỉ chứa amoni sulphat 70%	0	0	Hệ sợi xếp chặt

3.4 Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm của dịch tan tế bào của thể phân lập *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) mới

Vật liệu

- Đĩa thạch PDA
- Canh LB
- Tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Lysozym
- Tủ ủ

Các phương pháp

3.4.1 Dịch tan tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)

Canh LB được điều chế theo phương pháp được mô tả trong Phụ lục – I (3). Một khuẩn lạc đơn của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) được cấy vào canh LB vô trùng và được ủ ở 30°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ ủ các tế bào sinh dưỡng được thu hồi bằng cách ly tâm ở 6500 vòng/phút, 4°C, tế bào được rửa ba lần bằng nước cất vô trùng và được đưa đi phân giải tế bào bằng cách ủ trong lysozym ở 37°C trong 2 h. Sau khi phân giải, huyền phù được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ các mảnh vụn tế bào. Phần dịch nổi được thu hồi và cho đi qua dụng cụ lọc cỡ lỗ 0,22 µm và được bảo quản ở 4°C.

3.4.2 Phân tích tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm của dịch tan tế bào

Hai lỗ được khoét ở hai đầu chéo nhau của thạch PDA trên đĩa petri và một lỗ được gắn nhãn là “lỗ thử nghiệm” và lỗ còn lại được gắn nhãn là “lỗ đối chứng”. Một phần phân ước 500 µl dịch tan được bổ sung vào lỗ thử nghiệm và 500 µl chỉ lysozym được bổ sung vào lỗ đối chứng. Nấm thử nghiệm *Fusarium oxysporum* được cấy vào giữa thạch PDA và được ủ trong 5 ngày ở nhiệt độ trong phòng.

Kết quả

Dịch tan tế bào không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm (Fig. 15) đối với nấm *Fusarium oxysporum*, gợi ý rằng tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng

nấm chủ yếu được tiết ra ngoài môi trường.

Ví dụ 4

4.1 Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm đối với các nấm gây bệnh khác

Vật liệu

- *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Nấm gây bệnh trên thực vật
 1. *Rhizoctonia solani* (Gây bệnh khô vằn ở các thành viên thuộc họ cà).
 2. *Sarocladium oryzae* (Gây bệnh thối bẹ ở lúa)
 3. *Colletotrichum capsicii* (Gây bệnh thán thư ở ớt).
 4. *Exerohilum turcicum* (Gây bệnh đốm lá to).
 5. *Macrophomina phaseolina* (Gây bệnh thối than).
- Canh T3
- Đĩa thạch T3
- Đĩa thạch PDA
- Tủ ủ

Phương pháp

4.1.1 Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm của tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC- 5674) đối với nấm gây bệnh khác nhau trên thực vật

Một vòng que cấy chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và một vòng que cấy chứa nấm thử nghiệm được cấy ở các điểm đối diện chéo góc của đĩa T3 được gắn nhãn các loại nấm tương ứng và được ủ ở 28°C cho đến khi quan sát thấy sự sinh trưởng của hệ sợi nấm ở vùng xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn.

4.1.2 Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm của dịch lọc đối với các loại nấm khác nhau gây bệnh trên thực vật

Một phần phân ước 500 µl dịch lọc nuôi cấy chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm được bổ sung vào các lỗ được tạo ra trên thạch PDA và một vòng que cấy chứa nấm thử nghiệm được cấy ở một góc khác của các đĩa tương ứng được gắn nhãn các loại nấm tương ứng và được ủ ở 28°C cho đến khi quan sát thấy sự sinh trưởng của hệ sợi nấm ở vùng xung quanh lỗ chứa dịch lọc nuôi cấy.

Hoạt tính ức chế của dịch lọc đối với các loại nấm đã nêu là vùng ức chế được tạo thành xung quanh lỗ tính bằng milimet.

Kết quả

Nhiều loài nấm gây bệnh trên thực vật được thử nghiệm theo thử nghiệm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và toàn bộ trong số chúng biểu hiện sự ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng khi có mặt các tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) cũng như dịch lọc nuôi cấy của nó.

4.2 Hiệu quả của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm trong việc bảo vệ hạt lúa khỏi bị tấn công bởi nấm

Hạt lúa được xử lý bởi bào tử *Fusarium oxysporum* và dịch lọc nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và được đặt trong đĩa petri chỉ chứa thạch để kiểm tra hiệu quả của tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm từ *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) trong việc ức chế nấm tấn công trên hạt đang nảy mầm.

Hạt đối chứng chỉ được xử lý bằng bào tử nấm *Fusarium oxysporum*.

Kết quả

Khi có mặt tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm từ *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674), nấm không gây bệnh cho hạt và hạt lúa nảy mầm bình thường. Tuy nhiên, hạt chỉ được xử lý bằng nấm bị nhiễm bệnh nghiêm trọng và không nảy mầm (Fig. 17).

4.3 Thử nghiệm bản tính gây bệnh của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) đối với thực vật

Vật liệu

- *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) trong 1 % CMC ở dạng có thể phun được
- Các cây lúa, bông, thuốc lá, ngô và cà chua
- Dụng cụ phun

Phương pháp

Gống cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) được thử nghiệm rộng khắp về khả năng gây bệnh nếu có, trên nhiều loại thực vật.

Bacillus subtilis ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) được cấy vào 1 L canh LB vô trùng trong bình nón thót cổ dung tích 2 L và được ủ ở 30°C, trong 24 giờ, lắc ở 200 vòng/phút. Sau khi vi khuẩn sinh trưởng, các tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm ở 6.500 vòng/phút, ở 4°C trong 10 phút. Viên kết được rửa hai lần trong dung dịch đệm phosphat (độ pH 7,0) và được tạo huyền phù đặc trong 1% CMC (Carboxy Metyl Xenluloza) trong dung dịch đệm phosphat (độ pH 7,0). Huyền phù này được sử dụng để phun lên cây trồng như lúa, thuốc lá, ngô, cà chua và bông.

Kết quả

Từ những nhận xét này, đã kết luận rằng tất cả các loài thực vật (lúa, thuốc lá, ngô, cà chua và bông) được phun *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) không thể hiện loại triệu chứng bệnh bất kỳ và sự sinh trưởng và phát triển của chúng là tương đương với các cây đối chứng, chỉ ra rằng *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) không gây bệnh cho các loài thực vật (Fig. 18).

Ví dụ 5

5.1 Bào chế chế phẩm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm chứa các tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) làm tác nhân kiểm soát sinh học

Vật liệu

- *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Canh LB
- PDB (canh dextroza khoai tây - Potato Dextrose Broth)

- Dung dịch đệm phosphat (độ pH 7,0)
- CMC (carboxy methyl xenluloza - Carboxy Methyl Cellulose)

Phương pháp

5.1.1 Chuẩn bị huyền phù chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)

Bacillus subtilis ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) được cấy trong 1 L canh LB vô trùng trong bình nón thót cổ có dung tích 2 L và được ủ ở 30°C, trong 24 giờ, lắc ở 200 vòng/phút. Sau khi *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) sinh trưởng, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 6.500 vòng/phút, ở 4 °C trong 10 phút. Viên kết được rửa hai lần trong dung dịch đệm phosphat (pH 7,0) và được kết hợp với 1% CMC (carboxy methyl xenluloza) trong dung dịch đệm phosphat (pH 7,0) để chuẩn bị huyền phù đặc chứa 6×10^7 cfu/ml. Huyền phù đặc chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) được sử dụng để phun lên thực vật và xử lý rễ của cây giống bằng cách nhúng.

5.1.2 Thử nghiệm hiệu quả của chế phẩm chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm trong việc ức chế sự phá hoại bởi *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194) ở rễ của cây cà chua

Vật liệu

- Huyền phù đặc chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- Nấm *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194) (gây bệnh đốm vằn ở các thành viên thuộc họ cà).
- Đất rite
- Cây giống cà chua

5.1.3 Chuẩn bị *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194)

Rhizoctonia solani (NFCCI-3194) được sinh trưởng trong môi trường chứa canh dextroza khoai tây (Potato Dextrose Broth) (được chuẩn bị theo phương pháp nêu trong Phụ lục– I (V) trong 6 ngày. Sau khi *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194) sinh trưởng, nó được trộn kỹ với đất rite và được ủ trong 15 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Đất rite chứa nấm được trộn với đất theo tỷ lệ 1:1.

- Cây giống cà chua

Cây giống cà chua có chiều cao 10 cm được sử dụng trong nghiên cứu này

Phương pháp

Thí nghiệm được tiến hành như được mô tả dưới đây

A. Cây giống cà chua được trồng trên đất chứa *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194), nhưng không được xử lý bằng *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674).

B. Rễ của cây giống cà chua được xử lý bằng huyền phù đặc chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và được trồng trên đất chứa *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194).

C. Cây giống cà chua không được xử lý theo cách bất kỳ.

A. Cây giống được xử lý bằng tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và nấm *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194)

Rễ của cây giống cà chua được nhúng trong chế phẩm chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) trong 30 phút. Cây giống đã được xử lý được trồng trong chậu chứa đất kết hợp với nấm *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194).

Cây giống đối chứng

Để gây bệnh cho cây giống, cây giống cà chua (chưa được xử lý) được trồng trong chậu chứa đất được trộn với nấm *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194).

Đối với mẫu đối chứng âm tính, cây giống cà chua (chưa được xử lý) được trồng trong chậu chứa đất mà không được trộn với nấm *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194).

Tất cả các chậu chứa cây giống cà chua được chuyển vào nhà kính và được giữ ở đó cho đến giai đoạn ra quả.

Kết quả

Từ những quan sát, đã kết luận được rằng cây giống được xử lý bằng tổ hợp gồm *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) và nấm *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194) sinh trưởng rất tốt, ngang bằng với cây đối chứng, trong khi cây giống (chưa được xử lý) được trồng trong chậu chứa nấm *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194) thể hiện sự sinh trưởng chậm, ra hoa và tạo quả ít so với cây đối chứng. Do đó, có thể kết luận rằng

Bacillus subtilis ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) ức chế sự sinh trưởng của nấm *Rhizoctonia solani* (NFCCI-3194) trong vùng rễ của cây giống cà chua và bảo vệ cây giống khỏi nấm gây bệnh (Fig. 19).

Ví dụ 6

6.1 Đánh giá *in vitro* số tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) tối thiểu mà có thể kiểm soát nhiễm bệnh của hạt ngô đang nảy mầm bởi đất và hạt mang nấm gây bệnh *Penicillium oxalicum* (NFCCI-1997).

6.1.1 Điều chế dịch nuôi cấy ở dạng huyền phù chứa vi khuẩn và nấm

Vật liệu

- a. *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)
- b. *Penicillium oxalicum* (NFCCI-1997)- nấm gây bệnh trên thực vật
- c. Carbendazim WP50 (thuốc diệt nấm thương mại)
- d. Canh Luria Bertani Broth (LB)

Phương pháp

6.1.1.1 Chuẩn bị dịch nuôi cấy huyền phù chứa *Bacillus subtilis* ssp. *Shriramensis* (MTCC-5674)

Khuẩn lạc thuần khiết của *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (Fig. 20-1) được cấy vào 10 ml canh LB và được ủ ở 30°C trong 24 h ở 180 vòng/phút. Để điều chế chế phẩm kiểm soát sinh học, 1 ml giống cấy mới được cấy vào 100 ml canh LB và được ủ ở 30°C trong 24 giờ ở 180 vòng/phút. Sự sinh trưởng của giống cấy được giám sát bằng cách định kỳ xác định độ hấp thụ của dịch nuôi cấy ở 625 nm. Tế bào vi khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm và được rửa bằng dung dịch đệm phosphat vô trùng, bằng cách ly tâm ở 5500 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Cuối cùng, các tế bào được tạo huyền phù trong 5 ml dung dịch đệm phosphat vô trùng. Huyền phù đặc này được sử dụng để điều chế chế phẩm kiểm soát sinh học.

6.1.1.2 Chuẩn bị dịch nuôi cấy dạng huyền phù của *Penicillium oxalicum* (NFCCI-1997) (nấm gây bệnh)

Khuẩn lạc thuần khiết của *Penicillium oxalicum* (NFCCI-1997) (Fig. 20-2) được cấy trên đĩa PDA và được ủ ở 28°C cho đến khi hình thành bào tử. Một vòng que cấy chứa bào tử nấm được cấy vào 100 ml PDB và được ủ ở 28°C trong 7 ngày ở 180 vòng/phút. Phần chứa nước của dịch nuôi cấy chứa các bào tử nấm được gom lại trong các ống polypropylen dung tích 50 ml. Bào tử được rửa bằng dung dịch đệm phosphate vô trùng bằng cách ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Bào tử được tạo huyền phù trong một thể tích quy định dung dịch đệm phosphate vô trùng để thu được cfu bằng $6 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$.

6.1.2 Gây nhiễm đất bằng *P. oxalicum* (NFCCI-1997) (nấm gây bệnh)

Để duy trì lượng bào tử nấm thích hợp trong môi trường đất, 50 ml huyền phù chứa bào tử nấm ($6 \times 10^4 \text{ cfu/ml}$) được trộn với 1 kg soilrite đã được hấp trong nồi hấp và được ủ trong 10 ngày ở 28°C. Soilrite mà đã được cho nấm sinh trưởng trên đó được trộn đều với đất theo tỷ lệ 1:1 và được đổ vào khay gồm 96 cốc.

6.1.3 Điều chế chế phẩm chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) để kiểm soát sinh học đất mang bệnh cho thực vật

Vật liệu

- CMC (carboxy metyl xenluloza - Carboxy Methyl Cellulose)
- Sacaroza
- Polyme đỏ (không chứa thuốc diệt nấm)
- Huyền phù chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (tác nhân kiểm soát sinh học)
- Carbendazim (thuốc diệt nấm thương mại)

Để đánh giá nồng độ hữu hiệu của tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) mà có thể ức chế sự sinh trưởng và khả năng gây bệnh của *P. oxalicum* (NFCCI-1997) trên hạt ngô đang nảy mầm, bốn chế phẩm khác nhau được tạo ra (chi tiết được đưa ra trong bảng dưới đây). Các chế phẩm chỉ chứa tác nhân kiểm soát sinh học, chỉ chứa thuốc diệt nấm thương mại, và một chế phẩm không chứa tác nhân kiểm soát sinh học hoặc thuốc diệt nấm được sử dụng làm mẫu đối chứng. Tất cả các chế phẩm

chứa vật liệu kết dính - CMC (Carboxy Methyl Cellulose), nguồn cacbon (sucroza) và polyme đỏ (không chứa thuốc diệt nấm).

1. Mẫu đối chứng-1 (chế phẩm không chứa nấm gây bệnh và tác nhân kiểm soát sinh học)

Chế phẩm này bao gồm 1% CMC, 2% sucroza, và đỏ polyme. Chế phẩm này không có tác nhân kiểm soát sinh học, tác nhân gây bệnh và thuốc diệt nấm. Hạt được xử lý bằng chế phẩm này được dùng làm hạt đối chứng.

Chế phẩm

Số	Thành phần	Khối lượng/Thể tích/Số	Nồng độ cuối
1	CMC	1,71 µg	1,00 % w/v
2	Sacaroza	3,42 µg	2,00 % w/v
3	Polyme đỏ	34 µl	19,88 %v/v
4	Nước	31,87 µl	-
	Tổng	171 µl	-

2. Mẫu đối chứng-2 (Chế phẩm chứa nấm gây bệnh nhưng không chứa tác nhân kiểm soát sinh học)

Chế phẩm này bao gồm 1% CMC, 2% sucroza, và đỏ polyme. Chế phẩm này không có tác nhân kiểm soát sinh học/thuốc diệt nấm thương mại, nhưng hạt được xử lý bằng chế phẩm này được gieo trên đất được cấy nấm *P. oxalicum* (NFCCI-1997). Do không có sự bảo vệ sinh học hoặc hóa học chung quanh hạt, nấm sinh trưởng một cách dồi dào, làm nhiễm bệnh cho hạt và phát triển bệnh ở cây giống. Hạt được xử lý bằng chế phẩm này được dùng làm mẫu đối chứng có bệnh.

Chế phẩm

Số	Thành phần	Khối lượng/Thể tích/ Số	Nồng độ cuối
1	Bào tử nấm <i>P. oxalicum</i> (NFCCI-1997)	Có mặt trong đất	-

2	CMC	1,71 µg	1,00 % w/v
3	Sacaroza	3,42 µg	2,00 % w/v
4	Polyme đỏ	34 µl	19,88 % v/v
5	Nước	31,87 µl	-
	Tổng	171 µl	-

3. Mẫu đối chứng-3 (Chế phẩm với thuốc diệt nấm thương mại “Carbendazim WP50”)

Chế phẩm này bao gồm 1% CMC, 2% sucroza, polyme đỏ và thuốc diệt nấm thương mại Carbendazim WP50 (tên thương mại Bavistin) được sử dụng ở nồng độ 500 µg/ml (Mohiddin *et al.*, 2013). Chế phẩm này được sử dụng để so sánh hiệu quả của cả tác nhân kiểm soát sinh học và thuốc diệt nấm thương mại trong việc ức chế sự sinh trưởng nấm ở vùng xung quanh hạt đang nảy mầm.

Chế phẩm

Số	Thành phần	Khối lượng/Thể tích/Số	Nồng độ cuối
1	Carbendazim	85,50 µg	
2	CMC	1,71 µg	1,00 % w/v
3	Sacaroza	3,42 µg	2,00 % w/v
4	Polyme đỏ	34 µl	19,88 % v/v
5	Nước	31,87 µl	-
	Tổng	171 µl	-

4a. Chế phẩm chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (5×10^4 cfu)

Chế phẩm này bao gồm 1% CMC, 2% sucroza, polyme đỏ và tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) ở nồng độ 5×10^4 cfu/ml. Chế phẩm này có số tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) tối thiểu.

Chế phẩm

Số	Thành phần	Khối lượng/Thể tích/Số	Nồng độ cuối
1	Huyền phù chứa tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674)	100,00 µl	5x10 ⁴ cfu/ml
2	CMC	1,71 µg	1,00 % w/v
3	Sacaroza	3,42 µg	2,00 % w/v
4	Polyme đỏ	34,0 µl	19,88 % v/v
5	Nước	31,87 µl	-
	Tổng	171,0 µl	-

4b. Chế phẩm chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (5x10⁵ cfu)

Chế phẩm này bao gồm 1% CMC, 2% sucroza, polyme đỏ và tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) ở nồng độ 5x10⁵ cfu/ml.

Chế phẩm

Số	Thành phần	Khối lượng/Thể tích/Số	Nồng độ cuối
1	Dịch huyền phù chứa tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674)	100,00 µl	5x10 ⁵ cfu/ml
2	CMC	1,71 µg	1,00 % w/v
3	Sacaroza	3,42 µg	2,00 % w/v
4	Polyme đỏ	34 µl	19,88 % v/v
5	Nước	31,87 µl	-
	Tổng	171 µl	-

4c. Chế phẩm chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (5x10⁶ cfu)

Chế phẩm này bao gồm 1% CMC, 2% sucroza, polyme đỏ và tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) ở nồng độ 5x10⁶ cfu/ml.

Chế phẩm

Số	Thành phần	Khối lượng/Thể tích/Số	Nồng độ cuối
1	Huyền phù chứa tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674)	100,00 µl	5x10 ⁶ cfu/ml
2	CMC	1,71 µg	1,00 % w/v
3	Sacaroza	3,42 µg	2,00 % w/v
4	Polyme đỏ	34 µl	19,88 % v/v
5	Nước	31,87 µl	-
	Tổng	171 µl	-

4d. Chế phẩm chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (5x10⁷ cfu)

Chế phẩm này bao gồm 1% CMC, 2% sucroza, polyme đỏ và tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) ở nồng độ 5x10⁷ cfu/ml (50 triệu tế bào/ml chất mang). Chế phẩm này có số tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) tối đa.

Chế phẩm

Số thứ tự	Thành phần	Khối lượng/Thể tích/Số	Nồng độ cuối
1	Huyền phù chứa tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674)	100,00 µl	5x10 ⁷ cfu/ml
2	CMC	1,71 µg	1,00 % w/v
3	Sacaroza	3,42 µg	2,00 % w/v
4	Polyme đỏ	34 µl	19,88 % v/v
5	Nước	31,87 µl	-
	Tổng	171 µl	-

5. Chế phẩm chỉ chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (5×10^7 cfu)

Chế phẩm này bao gồm 1% CMC, 2% sucroza, polyme đỏ và tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) ở nồng độ 5×10^7 cfu/ml. Chế phẩm này có số tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) tối đa và được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của tác nhân kiểm soát sinh học đến sự nảy mầm của hạt và sự sinh trưởng thực vật.

Chế phẩm

Số	Thành phần	Khối lượng/Thể tích/Số	Nồng độ cuối
1	Huyền phù chứa tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674)	100,00 μ l	5×10^7 cfu/ml
2	CMC	1,71 μ g	1,00 % w/v
3	Sacaroza	3,42 μ g	2,00 % w/v
4	Polyme đỏ	34 μ l	19,88% v/v
5	Nước	31,87 μ l	-
	Tổng	171 μ l	-

Bảng -4 Kế hoạch thí nghiệm ở dạng bảng

Điều trị	Vật liệu được sử dụng	Tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674) (cfu/ml)	Bào tử <i>P. oxalicum</i> (NFCCI-1997) trong đất (cfu/g)	Carbendazim (tính bằng μg)	Số hạt ngô trong một lần xử lý		
					Ban đầu	Lặp đôi	Lặp ba
*1	Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza (Hạt đối chứng)	Nil	Nil	Nil	20	20	20
*2	Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza (hạt được gieo trên đất chứa <i>P. oxalicum</i> (NFCCI-1997)) (Hạt đối chứng)	Nil	6×10^4	Nil	20	20	20
*3	Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza + Carbendazim (Hạt đối chứng)	Nil	6×10^4	85,50	20	20	20
*4a	Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza + tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674) (Nồng độ-1)	5×10^4	6×10^4	Nil	20	20	20
*4b	Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza + tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674) (Nồng độ-2)	5×10^5	6×10^4	Nil	20	20	20

*4c	Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza + tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674) (Nồng độ-3)	5x10 ⁶	6x10 ⁴	Nil	20	20	20
*4d	Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza + tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674) (Nồng độ-4)	5x10 ⁷	6x10 ⁴	Nil	20	20	20
*5	Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza + tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674)	5x10 ⁷	Nil	Nil	20	20	20

*1(Mẫu đối chứng-1)- Chế phẩm không chứa nấm gây bệnh và kháng nấm tác nhân; *2(Mẫu đối chứng-2)- Chế phẩm chứa nấm gây bệnh nhưng không chứa tác nhân kiểm soát sinh học; *3(Mẫu đối chứng-3)- Chế phẩm chứa thuốc diệt nấm thương mại “Carbendazim WP50”; *4a- Chế phẩm chứa *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (5x10⁴ cfu); *4b- Chế phẩm chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (5x10⁵ cfu); *4c- Chế phẩm chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis*(MTCC-5674) (5x10⁶ cfu) ; *4d- Chế phẩm chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (5x10⁷ cfu) và *5- Chế phẩm chỉ chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (5x10⁷ cfu).

Bao hạt

Chế phẩm kiểm soát sinh học như các chế phẩm nêu trên được bao trên hạt ngô (Fig. 21). Hai mươi hạt ngô được chia làm 3 mẫu lặp (tổng cộng 60 hạt) đối với mỗi mẫu xử lý được khử trùng bề mặt bằng 0,1% HgCl₂ trong 10 phút và được tráng bằng 95% etanol, và được rửa bằng nước vô trùng trong 10 phút mỗi mẫu. Các hạt khô được bao bằng 171 µl chế phẩm khác nhau/60 hạt và được làm khô bằng không khí trong 2 h.

Gieo hạt

Tất cả các hạt đã xử lý được gieo trên các khay 96 cốc với ba mẫu lặp đối với mỗi mẫu xử lý. Tất cả các khay được giữ trong nhà kính và được giữ trong điều kiện điều chỉnh được. Giám sát sự nảy mầm của hạt trên mỗi khay cho đến 5 tuần.

Thu nhận dữ liệu

Tỷ lệ nảy mầm tính theo phần trăm

Tỷ lệ nảy mầm tính theo phần trăm của tất cả các mẫu hạt xử lý được thu nhận sau 1 tuần gieo hạt.

Tỷ lệ mắc bệnh

Tỷ lệ mắc bệnh được ghi nhận là tỷ lệ phần trăm sau 4 tuần gieo hạt. Công thức được sử dụng để tính tỷ lệ mắc bệnh (Hoffman *et al.*, 2002) là như sau:

$$\% \text{ tỷ lệ mắc bệnh} = \frac{\text{Số cây giống bị bệnh}}{\text{Tổng số cây giống}} \times 100$$

Kết quả

Khả năng nảy mầm của hạt và khả năng sống sót của cây giống

Khả năng nảy mầm tối ưu nghĩa là, 93,33%, 96,66%, 100,00%, 100,00%, 100,00% và 100,00% được ghi nhận ở hạt được xử lý bằng các chế phẩm -3 (đối chứng-3), 4c, 1 (đối chứng-1), 4b, 4d và 5, tương ứng, tiếp theo là 83,33% và 33,33% ở các hạt được xử lý

bằng các chế phẩm – 4a và 2(đối chứng-2). Tỷ lệ sống sót của cây giống sau 4 tuần gieo hạt được ghi nhận là 100,00 % ở các hạt được xử lý bằng tất cả các chế phẩm nêu trên ngoại trừ những hạt được xử lý bằng chế phẩm-3 (có thuốc diệt nấm thương mại), điều này chỉ ra rõ ràng thuốc diệt nấm thương mại “Carbendazim WP50”, mặc dù nó hữu hiệu trong việc ức chế sự sinh trưởng của nấm, nhưng không đạt hiệu quả 100,00 %. Chế phẩm chứa các nồng độ khác nhau (ngoại trừ chế phẩm 4a- có số tế bào ít nhất) của tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) được chứng minh là có hiệu quả 100,00 % trong việc bảo vệ hạt khỏi *P. oxalicum* (NFCCI-1997) có mặt trong đất.

Sự giảm tỷ lệ nảy mầm của những hạt được xử lý bằng chế phẩm – 4a (Chế phẩm chứa nồng độ tế bào vi khuẩn ít nhất, 50.000 tế bào/ml chất mang) chỉ ra rõ ràng liều cơ sở của tế bào vi khuẩn được đòi hỏi để tạo ra tác dụng bảo vệ hạt đang nảy mầm khỏi *P. oxalicum* (NFCCI-1997) có mặt trong đất. Vì vậy, chế phẩm-4b, có nồng độ vi khuẩn là 5×10^5 cfu/ml (0,5 triệu tế bào/ml) tạo ra sự bảo vệ tuyệt vời đối với *P. oxalicum* (NFCCI-1997) và mang lại tỷ lệ nảy mầm của hạt và tỷ lệ sống sót của cây giống là 100%, giống như hạt đối chứng.

Bảng-5 Xác định nồng độ hữu hiệu (cfu/g chất mang) của tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) để ức chế sự sinh trưởng và khả năng gây bệnh của *P. oxalicum* (NFCCI-1997).

Điều trị	Nồng độ của <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674) (cfu/g)	Nồng độ của <i>P. oxalicum</i> (NFCCI-1997) (cfu/ml)	Nồng độ của Carbendazim (µg)	Số hạt được gieo trên một khay	Số hạt nảy mầm (Trị số tính theo %)	Dữ liệu được ghi sau 2 tuần gieo hạt				Dữ liệu được ghi sau 4 tuần gieo hạt				Mức dao động tính theo phần trăm (Trị số tính theo %)
						Số cây giống sống sót (Trị số tính theo %)	Số cây giống chết do bệnh (Trị số tính theo %)	Số cây giống chết không do bệnh (Trị số tính theo %)	Số cây giống sống sót (Trị số tính theo %)	Số cây giống chết do bệnh (Trị số tính theo %)	Số cây giống chết không do bệnh (Trị số tính theo %)	Số cây giống chết do bệnh (Trị số tính theo %)	Số cây giống chết không do bệnh (Trị số tính theo %)	
1*	-	-	-	60	60(100%)	60 (100%)	0	0	60 (100%)	0	0	0	0	0
2*	-	6x10 ⁴	-	60	20(33,33%)	0 (0 %)	20 (100 %)	0	0	0	0	0	0	-100
3*	-	6x10 ⁴	85,50	60	56(93,33%)	54 (96,42%)	2 (3,33%)	0	54 (90%)	0	0	0	0	-10
4a*	5x10 ⁴	6x10 ⁴	-	60	50 (83,33%)	14 (28%)	36 (72%)	0	9 (18%)	5 (10%)	0	0	0	-82
4b*	5x10 ⁵	6x10 ⁴	-	60	60 (100 %)	60 (100%)	0	0	60 (100%)	0	0	0	0	0
4c*	5x10 ⁶	6x10 ⁴	-	60	59(96,66%)	59 (100%)	0	0	59(100%)	0	0	0	0	0
4d*	5x10 ⁷	6x10 ⁴	-	60	60(100%)	60 (100%)	0	0	60 (100%)	0	0	0	0	0
5*	5x10 ⁷	-	-	60	60(100%)	60 (100%)	0	0	60 (100%)	0	0	0	0	0

*1- Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza; *2- Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza + *P. oxalicum* (NFCCI-1997); *3- Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza + *P. oxalicum* (NFCCI-1997) + Carbondazim; *4a to 4d - Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC + Sucroza + *P. oxalicum* (NFCCI-1997) + tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC. 5674) ở các nồng độ khác nhau; *5- Hạt ngô + Polyme đỏ + CMC +

Sucroza

+ *Bacillus subtilis* ssp *shriramensis* (MTCC-5674).

Tỷ lệ mắc bệnh

Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng có sự khác biệt đáng kể giữa các mẫu xử lý. Các hạt được xử lý bằng chế phẩm 1, 4b, 4c, 4d và 5 không biểu hiện triệu chứng bệnh bất kỳ và thể hiện sự sinh trưởng khỏe mạnh, tương tự cây giống đối chứng, chỉ ra rằng tác nhân kiểm soát sinh học *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) có mặt trong chế phẩm ức chế rõ rệt sự sinh trưởng và khả năng gây bệnh của nấm *P. oxalicum* (NFCCI-1997), và do vậy bảo vệ hạt khỏi bị nhiễm nấm. Hạt được xử lý bằng chế phẩm-3 (có chứa thuốc diệt nấm thương mại Carbendazim 50WP) thể hiện tỷ lệ mắc bệnh là 3,57 % chỉ ra rằng mặc dù thuốc diệt nấm thương mại là hữu hiệu trong việc ức chế sinh trưởng của nấm, nó không tốt bằng tác nhân kiểm soát sinh học được sử dụng trong nghiên cứu này.

Bảng-6 Tỷ lệ mắc bệnh tính theo phần trăm của cây ngô giống được xử lý bằng các chế phẩm khác nhau.

Xử lý	Nồng độ của tế bào vi khuẩn	Nồng độ của bào tử nấm trong đất	Tổng số cây giống	Số cây giống bị bệnh	Tỷ lệ mắc bệnh tính theo phần trăm
1(Đối chứng-1)	Nil	Nil	60	0	0,00
2(Đối chứng-2)	Nil	6×10^4	20	20	100,00
3(Đối chứng-3)	Nil	6×10^4	56	2	3,57
4a	5×10^4	6×10^4	50	41	82,00
4b	5×10^5	6×10^4	60	0	0,00
4c	5×10^6	6×10^4	59	0	0,00
4d	5×10^7	6×10^4	60	0	0,00
5	5×10^7	Nil	60	0	0,00

Tỷ lệ mắc bệnh là 82 % và 100 % được ghi nhận ở hạt được xử lý bằng chế phẩm 4a và 2, tương ứng. Kết quả chỉ ra rằng mật độ tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) có mặt trong chế phẩm 4a không hữu hiệu trong việc ức chế sự sinh trưởng của nấm và vì vậy các hạt đang nảy mầm bị nhiễm nấm và chết sau khi nảy mầm 2 tuần. Như được mong đợi, hạt được xử lý bằng chế phẩm -2 không chứa tác nhân kiểm soát

sinh học cũng như thuốc diệt nấm thương mại thể hiện tỷ lệ mắc bệnh là 100%, chỉ ra rằng các hạt đang nảy mầm bị nhiễm nấm và cây giống vị chết trong vòng 2 tuần sau khi nảy mầm.

Kết luận

Kết quả trên đây chỉ ra rõ ràng *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) ở nồng độ 5×10^5 cfu/ml (chế phẩm-4b) là hữu hiệu trong việc ức chế sự sinh trưởng của nấm gây bệnh và mang lại sự bảo vệ 100% với cây ngô giống đang nảy mầm. Vì vậy, tác nhân kiểm soát sinh học có thể được sử dụng thành công trong việc bao hạt để phòng trừ hữu hiệu đất mang nấm gây bệnh *P. oxalicum* (NFCCI-1997).

6.2 Thử nghiệm hiệu quả của chế phẩm chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) trong việc thúc đẩy sự sinh trưởng và sản lượng ở thực vật

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

1. Hạt ngô, cà chua và Brinjal được xử lý bằng chế phẩm như đã nêu trong phần 6.1.3 (4b).
2. Hạt ngô, cà chua và Brinjal đối chứng.

Các phương pháp

Bao hạt

Hạt ngô, cà chua và Brinjal được xử lý bằng chế phẩm như đã nêu trong 6.1.3 (4b) và được làm khô bằng không khí.

Gieo hạt

Hạt ngô, cà chua và Brinjal đã được xử lý và chưa được xử lý (hạt đối chứng), mỗi loại được bố trí ba mẫu lặp và mỗi mẫu lặp chứa 23 hạt được gieo trên cánh đồng có diện tích 4 mét vuông. Duy trì kích thước khoảng cách tiêu chuẩn chằng hạn các cây cách nhau 20 cm và mỗi hàng cách nhau 60 cm. Tuân theo các thực hành nông nghiệp thích hợp để các cây này sinh trưởng đến giai đoạn trưởng thành.

Kết quả

Có sự gia tăng đáng kể về các thông số sinh trưởng thực vật và sản lượng trong

các điều kiện trồng trọt trên cánh đồng. Hạt được bao bằng chế phẩm chứa tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) làm tăng sản lượng ngô, Brinjal và cà chua lên 17,60, 37,15 và 1,58%, tương ứng (Bảng -7). Các cây ngô, Brinjal và cà chua thể hiện tốc độ sinh trưởng, phát triển và tích tụ sinh khối (bức tranh điển hình về sự khác biệt của ngô đã được xử lý và ngô chưa được xử lý được nêu trên Fig 25) là lớn hơn. Các công bố trước đó về các chất kích thích sinh trưởng thực vật cũng đã chứng minh rằng chế phẩm chứa *Bacillus subtilis* làm tăng cường sự sinh trưởng của thực vật và gây ra tính kháng hệ thống đối với sự bảo vệ bệnh bằng cách tạo ra 60 loại chất chuyển hóa thứ cấp khác nhau (Compant *et al.*, 2005 và Mohan Kumar *et al.*, 2015).

Bảng- 7 Ảnh hưởng của chế phẩm chứa các tế bào *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) đến sản lượng của ngô, cà chua và Brinjal.

Số thứ tự	Cây trồng	Xử lý	Sản lượng
1	Ngô	1% CMC, 2% sucroza, Polyme đỏ và tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674) ở nồng độ 5×10^5 cfu/ml (0,5 triệu tế bào/ml chất mang)	233,7
		Đối chứng	198,72
		Tăng so với đối chứng	17,60%
2	Brinjal	1% CMC, 2% sucroza, Polyme đỏ và tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674) ở nồng độ 5×10^5 cfu/ml (0,5 triệu tế bào/ml chất mang)	727
		Đối chứng	457
		Tăng so với đối chứng	37,15%
3	Cà chua	1% CMC, 2% sucroza, Polyme đỏ và tế bào <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>shriramensis</i> (MTCC-5674) ở nồng độ 5×10^5 cfu/ml (0,5 triệu tế bào/ml chất mang)	860
		Đối chứng	847
		Tăng so với đối chứng	1,58%

Ví dụ 7

7.1 Sàng lọc dựa trên hiệu quả của tác nhân kháng nấm/kháng khuẩn nhằm ức chế sự sinh trưởng của nấm gây bệnh ở người

Nhiều loài nấm gây bệnh ở người được phân lập từ người bị các bệnh nhiễm trùng ở da và phổi khác nhau. Hoạt tính kháng nấm và/hoặc kháng khuẩn được thử nghiệm đối với tất cả các nấm gây bệnh ở người đã được phân lập.

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

1. *Penicillium* ssp.
2. *Aspergillus flavus*
3. *Aspergillus niger*
4. *Aspergillus nidulans*
5. Đĩa PDA
6. Tác nhân kháng nấm/kháng khuẩn được phân lập từ *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674)

Phương pháp

Một phần phân ước 500 µl dịch lọc nuôi cấy chứa tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm được bổ sung vào các lỗ được tạo ra trên thạch PDA và một vòng que cấy chứa nấm thử nghiệm được cấy ở một góc khác của các đĩa tương ứng được gắn nhãn các loại nấm tương ứng và được ủ ở 28°C cho đến khi quan sát thấy sự sinh trưởng của hệ sợi nấm ở vùng xung quanh lỗ chứa dịch lọc nuôi cấy.

Hoạt tính ức chế của dịch lọc đối với các loại nấm đã nêu là vùng ức chế được tạo thành xung quanh lỗ tính bằng milimet.

Kết quả

Nhiều loài nấm gây bệnh trên người được phân lập từ người bị các bệnh nhiễm

trùng da và phổi khác nhau được thử nghiệm trong thử nghiệm kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và tất cả trong số chúng bị ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng với sự có mặt của dịch lọc nuôi cấy *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) (Fig. 24).

Kết luận

Từ những nhận xét này, kết luận rằng tác nhân kháng nấm/kháng khuẩn được phân lập từ *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* (MTCC-5674) cũng có thể được sử dụng trong những ứng dụng dược phẩm.

Tài liệu viện dẫn

1. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and Barka, E.A. (2005). Use of plants growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4951-4959. *Sci. World J.*, Vol 2012, pp. 001-012.
2. Hoffmann, W.A. and Poorter, H. 2002. Avoiding Bias in Calculations of Relative Growth Rate. *Ann. Bot.*, Vol.90 (1), pp. 37-42.
3. Li, J. Yang, Q. Zhao, L-H, Zhang, S.M., Wang, Y.X. Xiao-yu and Zhao, X.Y. 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, Vol.10 (4) pp. 264–272.
4. Malusá, E. Sas-Paszt, L. and Ciesielska, J. 2012. Mena-Violante, H.G. and Olalde-Portugal, V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Sci. Hort.*, Vol.1 (113), pp. 103–106.
6. Mohan Kumar, S.P., Chowdappa, P. and Krishna, V. (2015). Development of seed coating formulation using consortium of *Bacillus subtilis* OTPB1 and *Trichoderma harzianum* OTPB3 for plant growth promotion and induction of systemic resistance in field and horticultural crops. *Indian Phytopath.* 68 (1):25-31.
7. Mohiddin, F. A. and Khan, M. R. 2013. Tolerance of fungal and bacterial bio-control agents to six pesticides commonly used in the control of soil borne plant pathogens. *Global J. Pests, Dis. Crop Prot.*, Vol. 1 (1), pp. 001-004.

Patent có liên quan

1. A novel strain of *Bacillus* for controlling plant diseases and corn rootworm. (EP981540A1).
2. Strain of *Bacillus subtilis* for agricultural use. (WO2009031874A1).
3. Antifungal *Bacillus subtilis* and a microorganism wettable powder containing the same (KR2011075132A).

Phụ lục I

Thành phần của môi trường nuôi cấy được sử dụng

Lưu ý: Phương pháp chung để chuẩn bị môi trường được nêu dưới đây. Tất cả các thành phần môi trường được nêu dưới đây là tính trong thể tích 100 ml. Các thành phần thay đổi tùy thuộc vào lượng được cần đến.

(I) Điều chế canh T3 (pH – 6,8)

Thành phần của môi trường T3

Số	Hợp phần	Lượng
1	Trypton	0,32 % (w/v)
2	Tryptosa	0,24 % (w/v)
3	Dịch chiết nấm men	0,18 % (w/v)
4	NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0,044 M
5	Na ₂ HPO ₄	0,062 M
6	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0005 % (w/v)

Phương pháp

Tất cả các hợp phần môi trường được cân và đựng trong lọ thủy tinh và được hòa tan trong nước cất. Đồ chứa cùng với môi trường trong đó được hấp ở 121⁰C trong 15 phút.

(II) Chuẩn bị đĩa thạch T3 (pH – 6,8)

Thành phần của môi trường T3

Số	Thành phần	Lượng
1	Trypton	0,32 % (w/v)
2	Tryptosa	0,24 % (w/v)
3	Dịch chiết nấm men	0,18 % (w/v)
4	NaH ₂ PO ₄	0,044 M
5	Na ₂ HPO ₄	0,062 M
6	MnCl ₂	0,0005 % (w/v)

7	Thạch Agar	2,0 % (w/v)
---	------------	-------------

Phương pháp

Tất cả các hợp phần môi trường được cân và đựng trong lọ thủy tinh và được hòa tan trong nước cất. Lọ thủy tinh chứa môi trường được hấp ở 121°C trong 15 phút. Sau khi hấp, môi trường được đổ vào đĩa petri vô trùng.

(III) Chuẩn bị canh LB (pH – 7,0)

Thành phần của môi trường LB

Số	Hợp phần	Lượng
1	Trypton	1,0 % (w/v)
2	Dịch chiết nấm men	0,5 % (w/v)
3	NaCl	1,0 % (w/v)

Phương pháp

Tất cả các hợp phần môi trường được cân và đựng trong lọ thủy tinh và được hòa tan trong nước cất. Đồ chứa cùng với môi trường trong đó được hấp ở 121°C trong 15 phút.

(IV) Chuẩn bị đĩa thạch LB (pH – 7,0)

Thành phần của môi trường LB

Số	Hợp phần	Lượng
1	Trypton	1,0 % (w/v)
2	Dịch chiết nấm men	0,5 % (w/v)
3	NaCl	1,0 % (w/v)
4	Thạch Agar	2,0 % (w/v)

Phương pháp

Tất cả các hợp phần môi trường được cân và đựng trong lọ thủy tinh và được hòa tan trong nước cất. Lọ thủy tinh cùng với môi trường được hấp ở 121°C trong 15 phút. Sau khi hấp, môi trường được đổ vào đĩa petri vô trùng.

(V) Chuẩn bị canh PDB (pH – 6,0)

Thành phần của môi trường PDB

Số	Hợp phần	Lượng
1	Bột khoai tây	2,0 % (w/v)
2	Dextroza	2,0 % (w/v)
3	Spectinomycin (tùy ý)	100 µg/ml

Phương pháp

Bột khoai tây (2,0 g) được cân và đựng trong lọ thủy tinh 250 ml chứa 50 ml nước cất và được đun sôi trong 5 phút. Nước khoai tây đã đun sôi được lọc bằng cách sử dụng vải mút-xơ-lin. Dịch lọc được thu nhận trong lọ thủy tinh sạch dung tích 250 ml và 2,0 g dextroza được bổ sung vào đó. Sau khi điều chỉnh tổng thể tích đến 100 ml, lọ cùng với môi trường được hấp ở 121°C trong 15 phút.

(VI) Chuẩn bị đĩa thạch PDA (pH – 6,0)

Thành phần của môi trường PDA

Số	Hợp phần	Lượng
1	Bột khoai tây	2,0 % (w/v)
2	Dextroza	2,0 % (w/v)
3	Thạch Agar	2,0 % (w/v)
4	Spectinomycin (tùy ý)	100 µg/ml

Phương pháp

Bột khoai tây (2,0 g) được cân và đựng trong lọ thủy tinh 250 ml chứa 50 ml nước cất và được đun sôi trong 5 phút. Nước khoai tây đã đun sôi được lọc bằng cách sử dụng vải mút-xơ-lin. Dịch lọc được thu nhận trong lọ thủy tinh dung tích 250 ml và 2,0 g dextroza và 2,0 g thạch được bổ sung vào đó. Sau khi điều chỉnh tổng thể tích đến 100 ml, lọ cùng với môi trường được hấp ở 121 °C trong 15 phút. PDA đã nấu chảy được đổ vào đĩa petri vô trùng.

(VII) Chuẩn bị môi trường cơ bản OF (OFBM) của Hugh và Leifson (pH – 7,1)

Thành phần của môi trường OFBM

Số	Hợp phần	Lượng
1	Casein Pepton (Trypton) 0,2%	0,2 % (w/v)
2	NaCl	0,5 % (w/v)
3	K ₂ HPO ₄	0,03 % (w/v)
4	Thạch Agar	2,0 % (w/v)
5	Xanh da trời bromothymol	0,004% (w/v)

Phương pháp

Tất cả các hợp phần môi trường được cân và đựng trong lọ thủy tinh và được hòa tan trong nước cất. Lọ thủy tinh cùng với môi trường được hấp ở 121⁰C trong 15 phút. Sau khi hấp, môi trường được đổ vào ống nuôi cấy vô trùng.

(VI) Chuẩn bị môi trường SIM (Sulphide Indole Motility) (pH – 7,3)

Thành phần của môi trường SIM

Số	Thành phần	Lượng
1	Pepton	3,0 % (w/v)
2	Dịch chiết thịt bò	0,3 % (w/v)
3	Sắt amoni sulphat	0,02 % (w/v)
4	Natri thiosulphat	0,0025 % (w/v)
7	Thạch Agar	2,0 % (w/v)

Phương pháp

Tất cả các hợp phần môi trường được cân và đựng trong lọ thủy tinh và được hòa tan trong nước cất. Lọ thủy tinh cùng với môi trường được hấp ở 121⁰C trong 15 phút. Sau khi hấp, môi trường ở giai đoạn đã nấu chảy được đổ vào ống nuôi cấy vô trùng.

Phụ lục II

Chuẩn bị dung dịch đệm phosphat

Số	Hợp phần	Lượng	Khối lượng dùng cho 100 ml
4	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 M	5,38 g
5	Na_2HPO_4	1 M	8,66 g
	Độ pH	7,0	

Phương pháp

Cả hai muối phosphat đều được đựng trong cốc thủy tinh, 50 ml nước cất được đổ vào các muối và được khuấy trên thiết bị khuấy từ bằng cách sử dụng thanh khuấy từ. Sau khi đảm bảo rằng các muối phosphat được hòa tan hoàn toàn, dung dịch được điều chỉnh đến 100 ml bằng nước cất.

Phụ lục III

Chất mang và các tác nhân khác được sử dụng trong thí nghiệm

Số thứ tự	Tên tác nhân	Thành phần	Được sử dụng làm/để	Tạo ra
1	CMC	Carboxy Metyl xenluloza	Tác nhân gắn kết	Himedia
2	Carbendazim	Carbendazim WP50	Thuốc diệt nấm	Bavistin
3	Soilrite	Perlite+ Peat Moss+ Vermiculite	Nhân giống nấm	KEL (Keltech Energies Ltd)

Các thuật ngữ viết tắt

Số thứ tự	Dạng ngắn gọn	Dạng đầy đủ
1	ATCC	Bộ sưu tập chủng giống kiểu Mỹ (American Type Culture Collection)
2	CMC	Carboxy Metyl xenluloza (Carboxy Methyl Cellulose)
3	CFU	Đơn vị hình thành khuẩn lạc (Colony Forming Units)
4	L	Lít
5	LB	Luria-Bertani
6	μl	Microlít
7	MTCC	Bộ sưu tập chủng giống kiểu vi khuẩn (Microbial Type Culture Collection)
8	ml	Mililit
9	MIC	Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimal Inhibitory Concentration)
10	Min	Phút
11	M	Phân tử gam (Molar)
12	NFCCI	Bộ sưu tập chủng giống nấm quốc gia của Ấn độ (National Fungal Culture Collection of India)
13	OFBM	Môi trường cơ bản lên men nhờ oxy hóa (Oxidation Fermentation Basal Medium)
14	PDA	Thạch dextroza khoai tây (Potato Dextrose Agar)
15	PDB	Canh dextroza khoai tây (Potato Dextrose Broth)
16	RPM	Vòng quay trên một phút (Revolutions Per Minute)
17	Ssp	Loài phụ (Sub-species)
18	SIM	Tính chuyển động sulfít indol (Sulphide Indole Motility)
19	v/v	Thể tích/thể tích
20	w/v	Khối lượng/thể tích
21	w/w	Khối lượng/khối lượng
22	WP	Bột có thể thấm ướt

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn thuộc loài *Bacillus* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật, trong đó vi khuẩn này là *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* được phân lập có số truy cập MTCC-5674.
2. Dịch chiết của vi khuẩn như được yêu cầu bảo hộ ở điểm 1, trong đó dịch chiết này thu được từ quy trình bao gồm các bước:
 - a. cho vi khuẩn này sinh trưởng trong môi trường T3 có độ pH 6,8 trong tủ ủ có kèm theo lắc ở 30°C trong 60 h để thu được dịch chiết và
 - b. thu hồi dịch chiết có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm.
3. Dịch chiết như được yêu cầu bảo hộ ở điểm 2, trong đó *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* được sinh trưởng trong điều kiện hiếu khí.
4. Dịch chiết như được yêu cầu bảo hộ ở điểm 2, trong đó quy trình còn bao gồm bước cô đặc dịch chiết bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường.
5. Dịch nuôi cấy thuần chủng của vi khuẩn như được yêu cầu bảo hộ ở điểm 1.
6. Chế phẩm chứa vi khuẩn như được yêu cầu bảo hộ ở điểm 1, trong đó chế phẩm này có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật ở nồng độ vi khuẩn nằm trong khoảng từ 5×10^5 cfu/ml đến 5×10^7 cfu/ml.
7. Chế phẩm chứa dịch chiết như được yêu cầu bảo hộ ở điểm 2, trong đó chế phẩm này có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm ở nồng độ dịch chiết từ 4 µg/µl đến 20 µg/µl.
8. Chế phẩm như được yêu cầu bảo hộ ở điểm 6 hoặc điểm 7, bao gồm một hoặc nhiều tác nhân kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm và kích thích sinh trưởng thực vật.
9. Chế phẩm như được yêu cầu bảo hộ ở điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, bao gồm chất mang nông dụng.

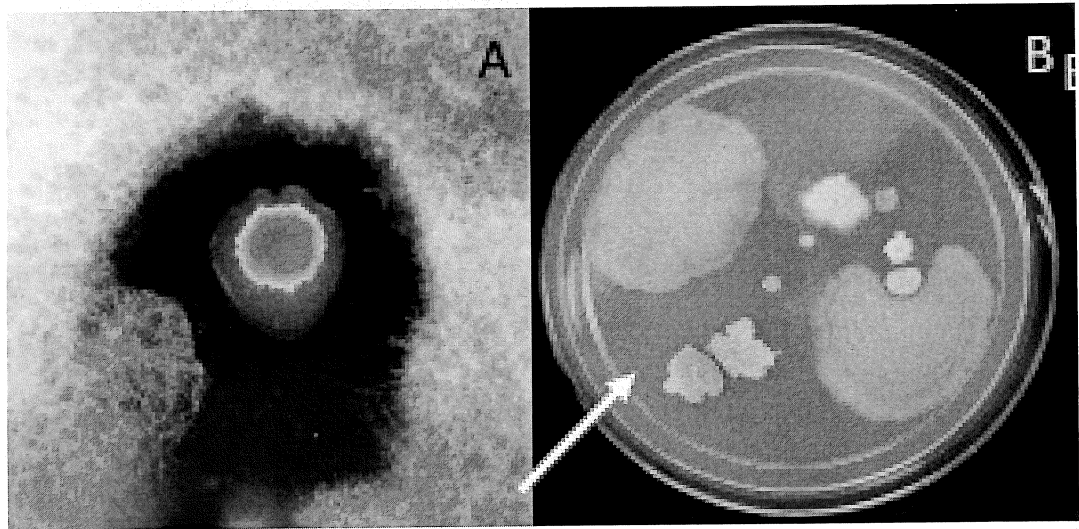


Fig. 1

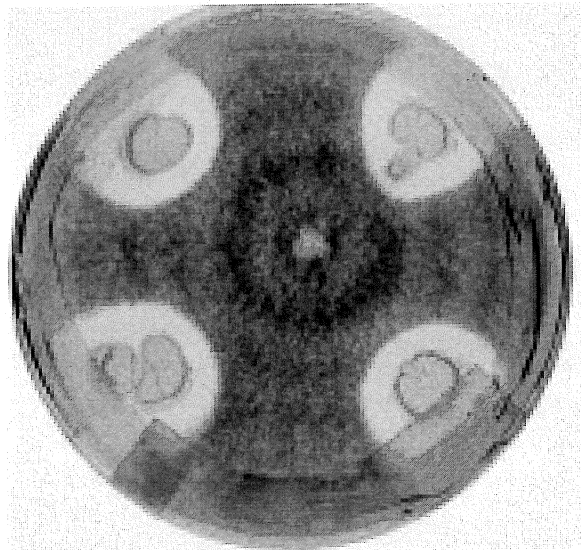


Fig. 2

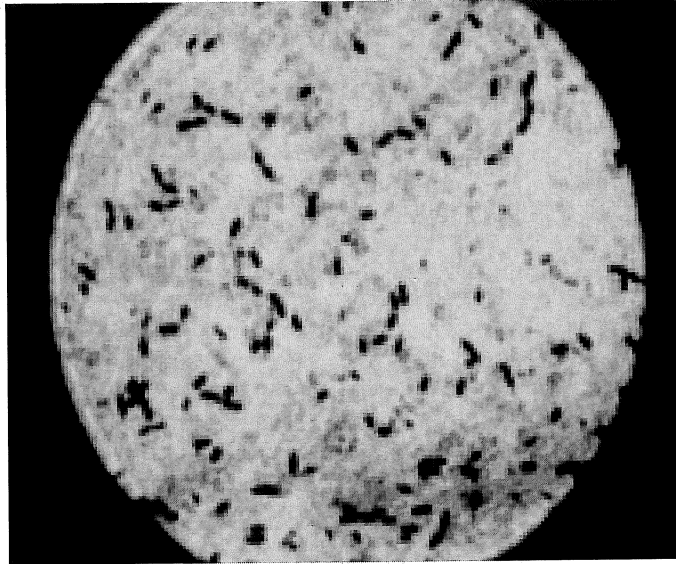


Fig. 3

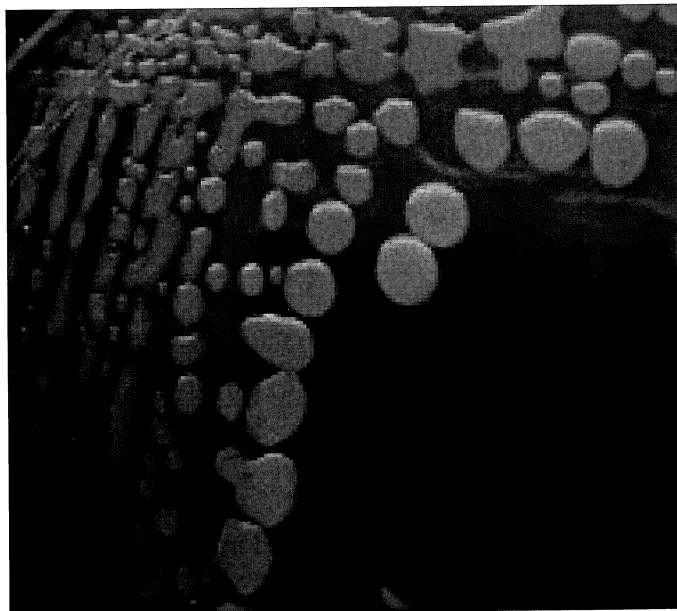


Fig. 4

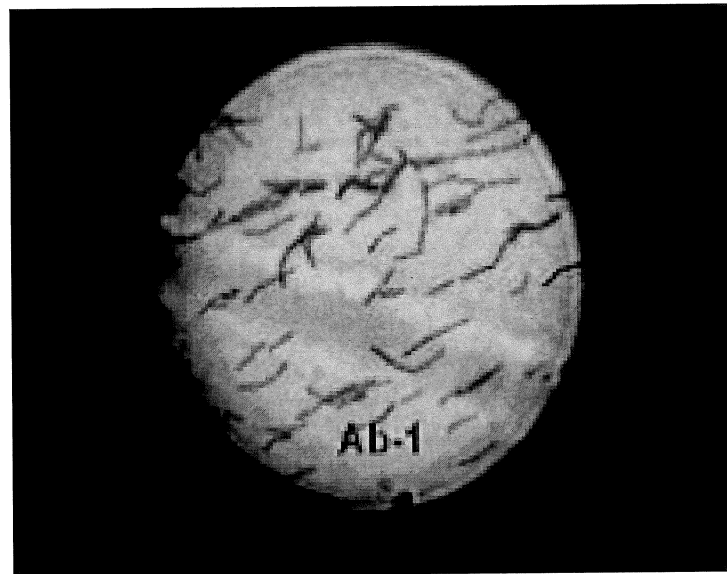


Fig. 5

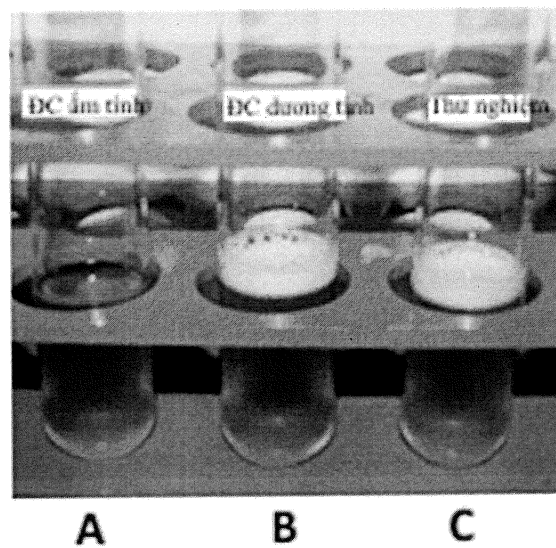


Fig. 6

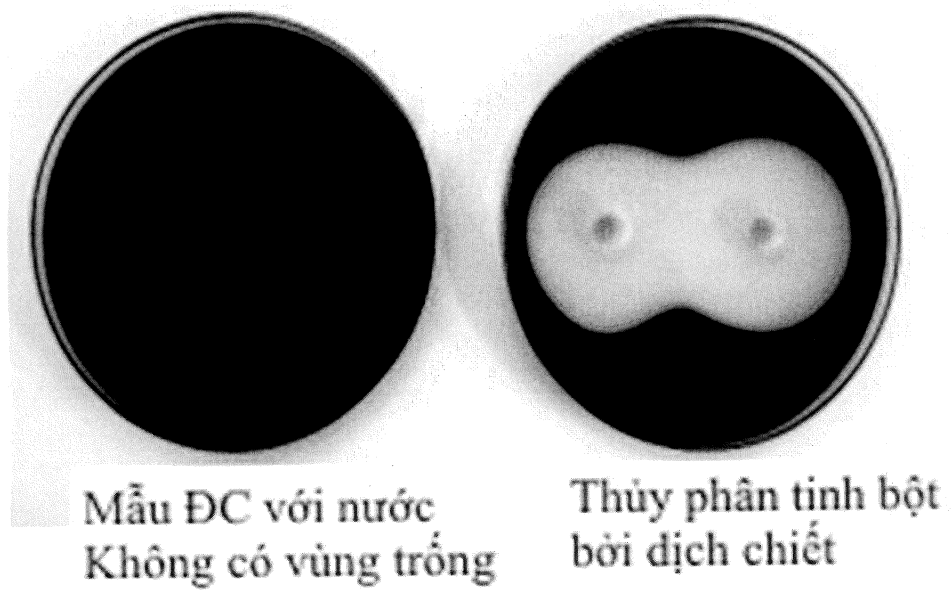
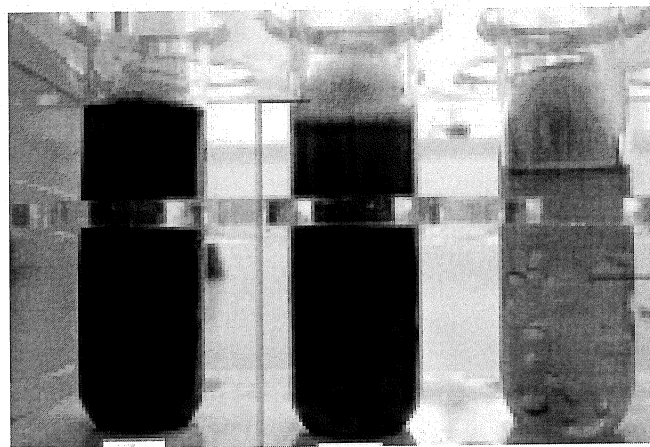


Fig. 7



A **B** **C**

Fig. 8

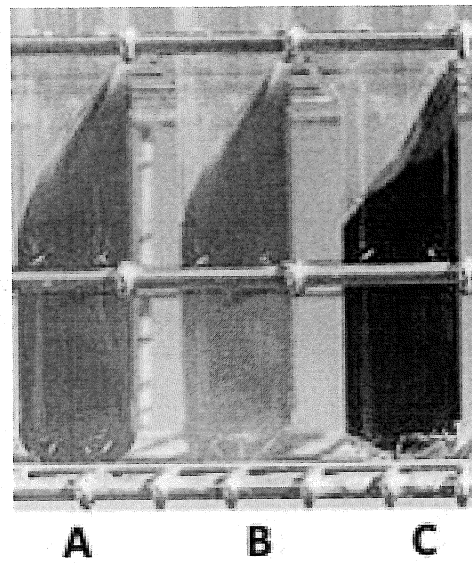


Fig. 9

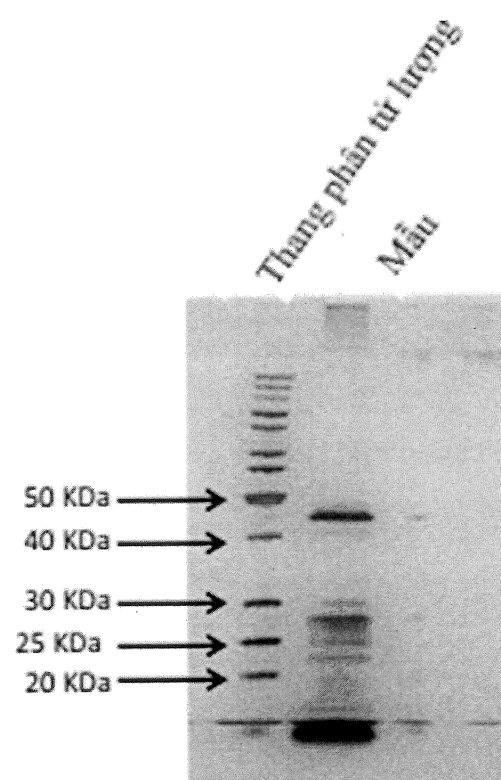


Fig. 10

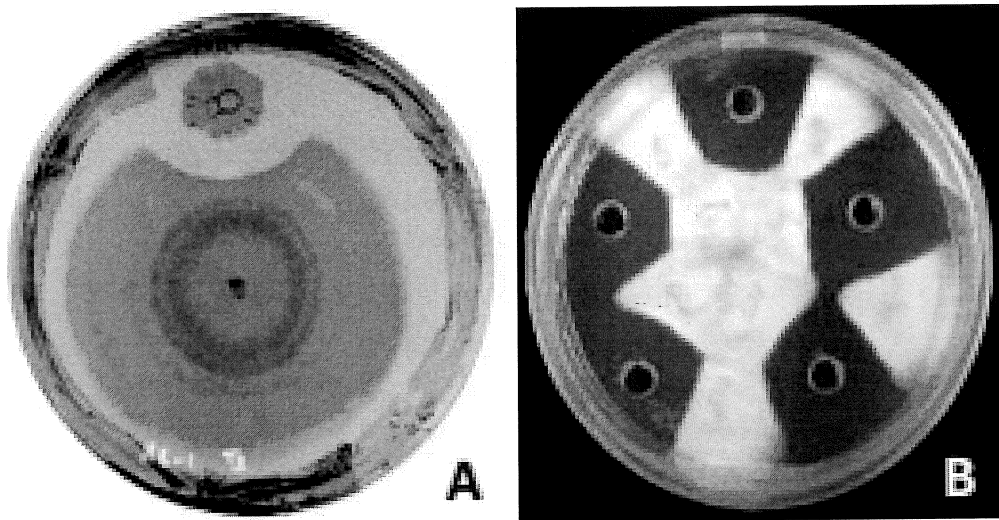


Fig. 11

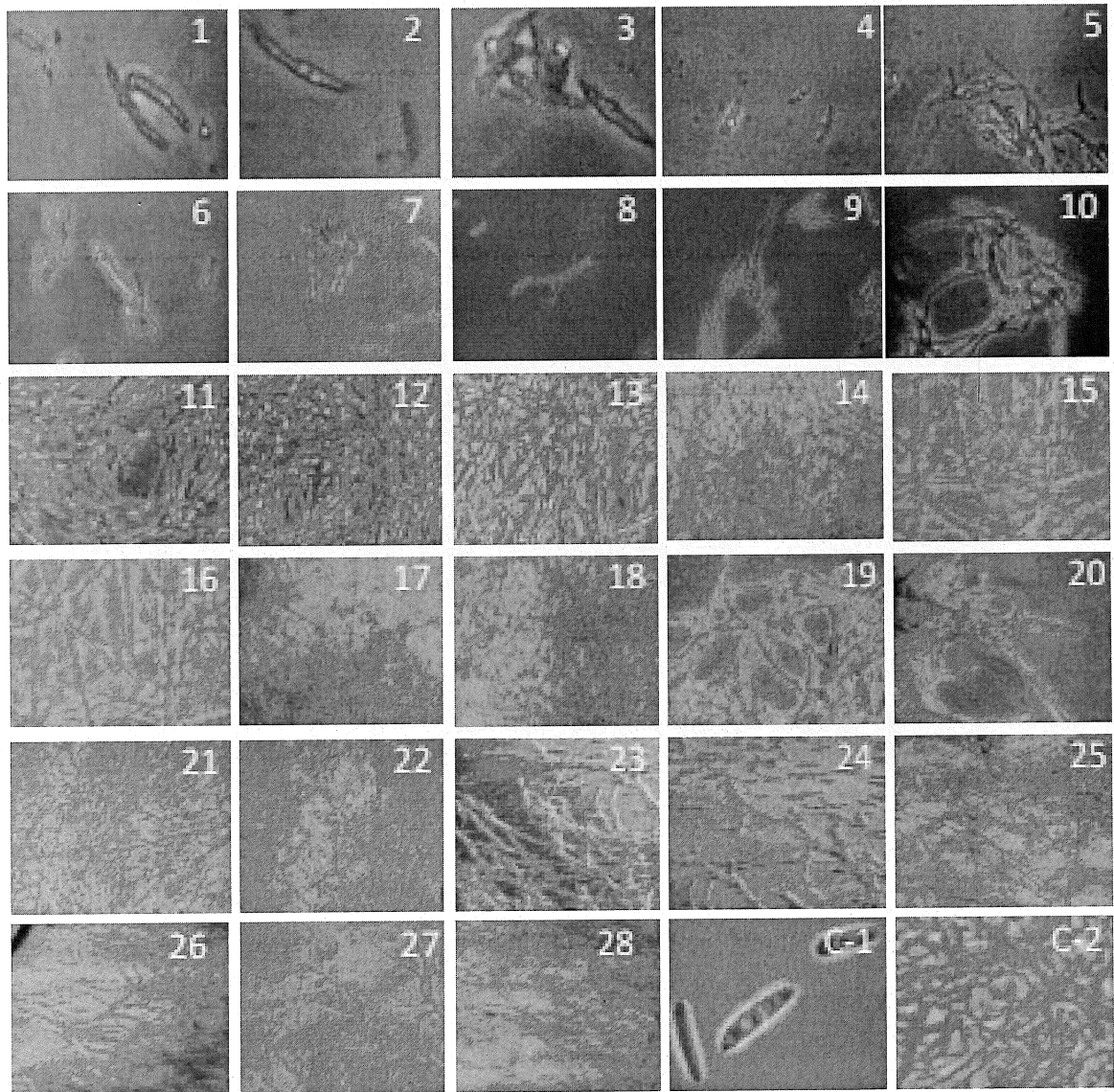


Fig. 12

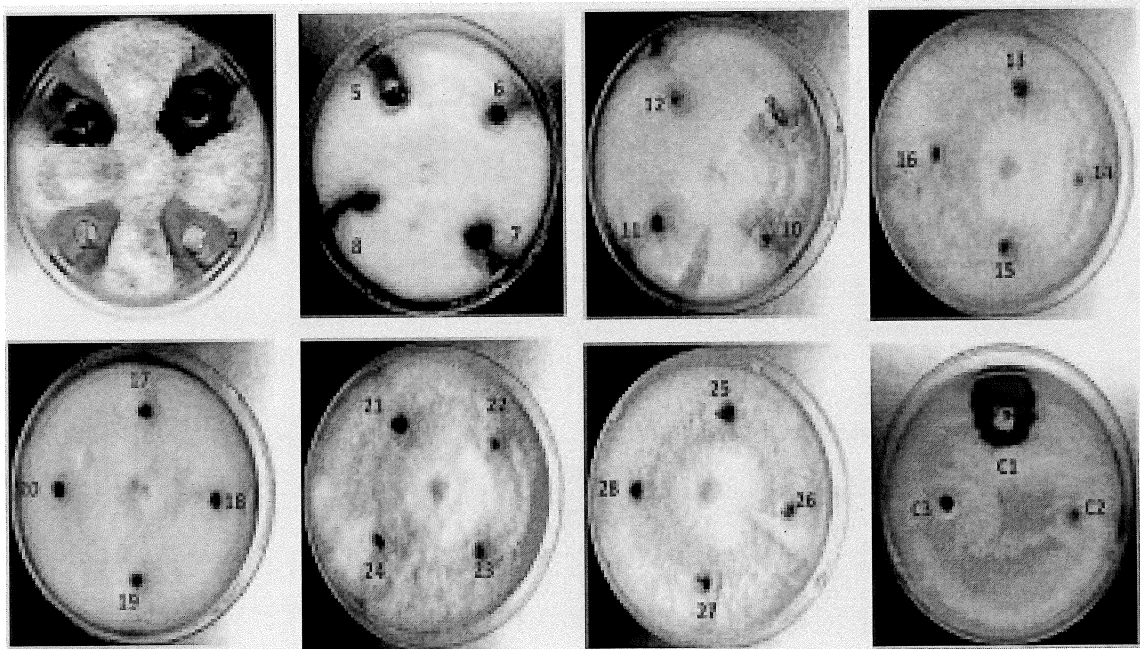


Fig. 13

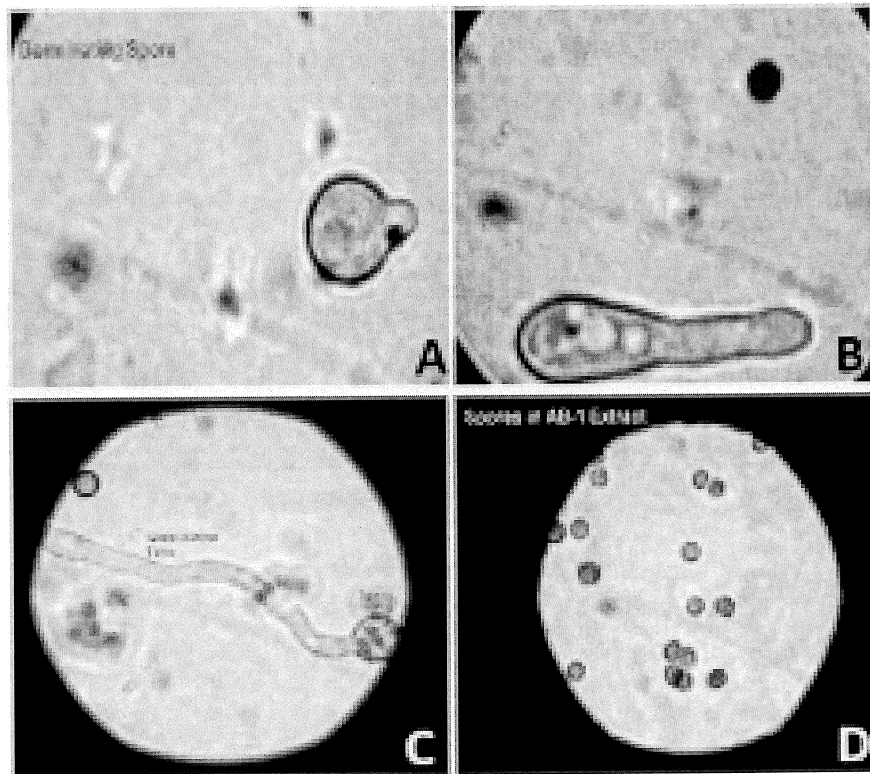


Fig. 14

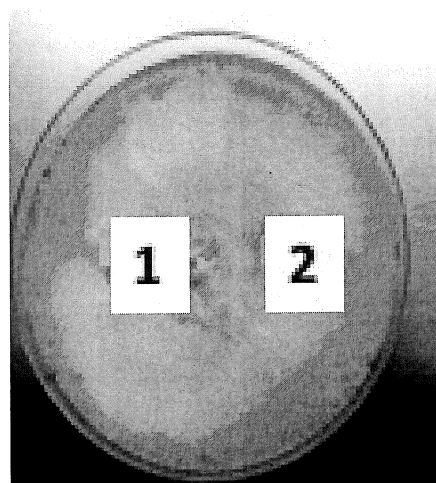


Fig. 15

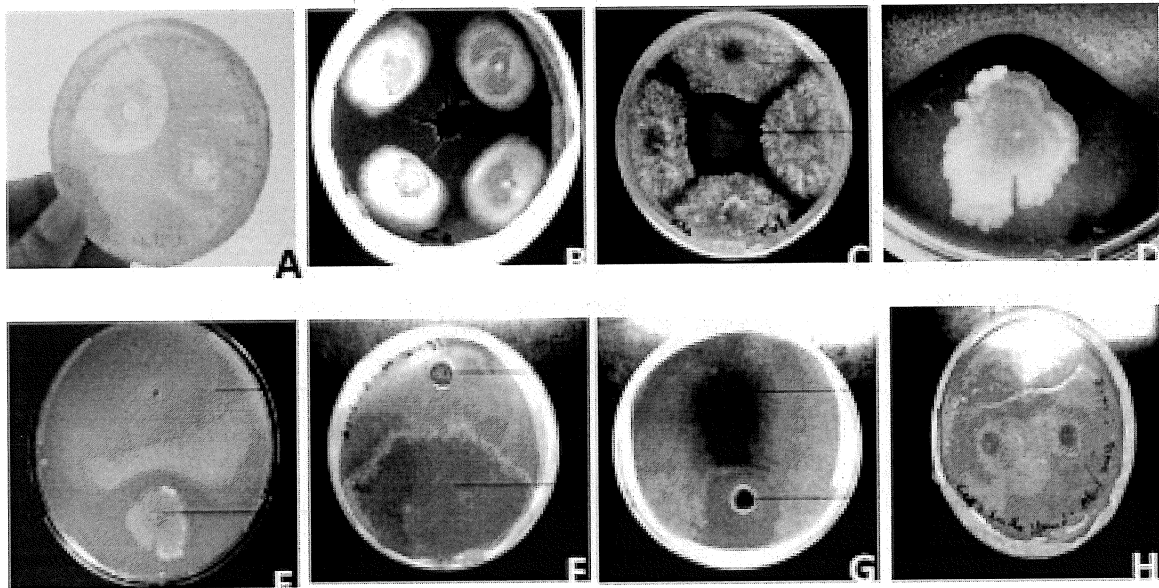


Fig. 16

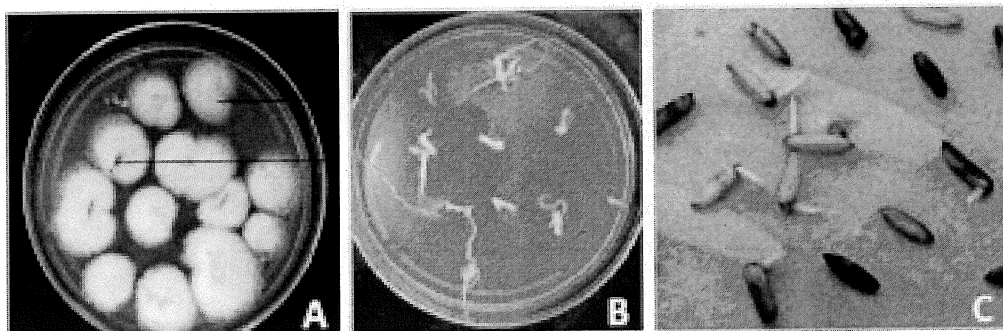


Fig. 17

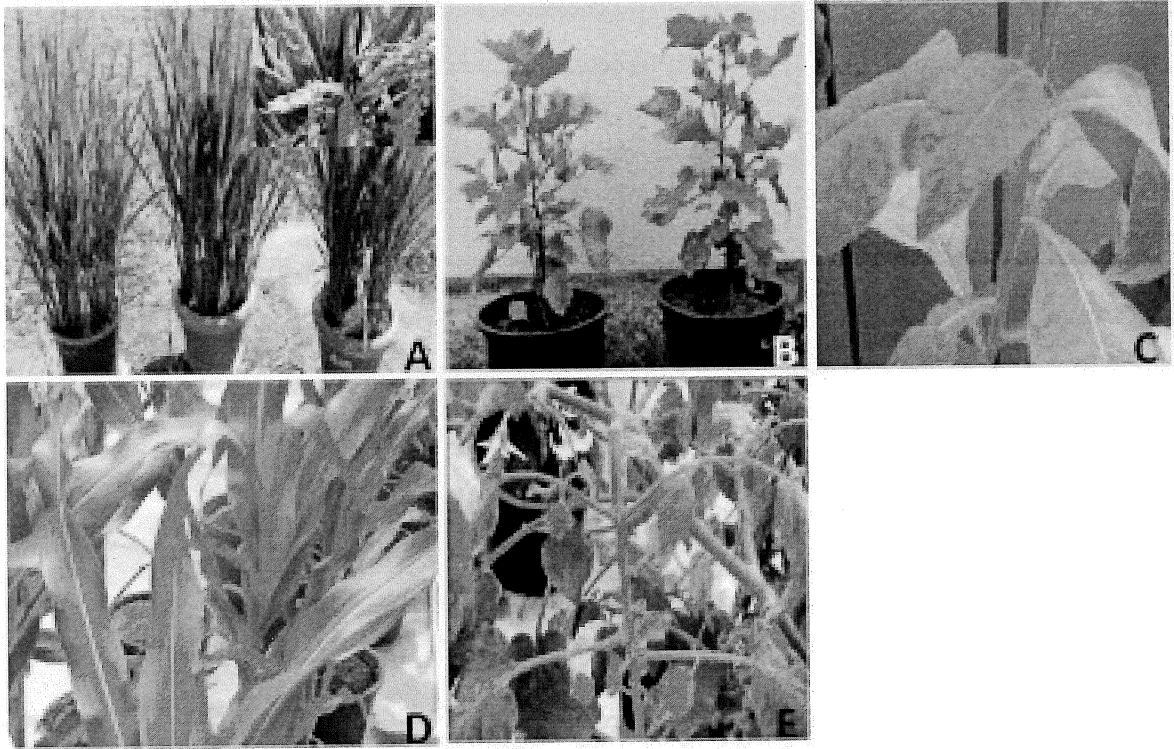


Fig. 18

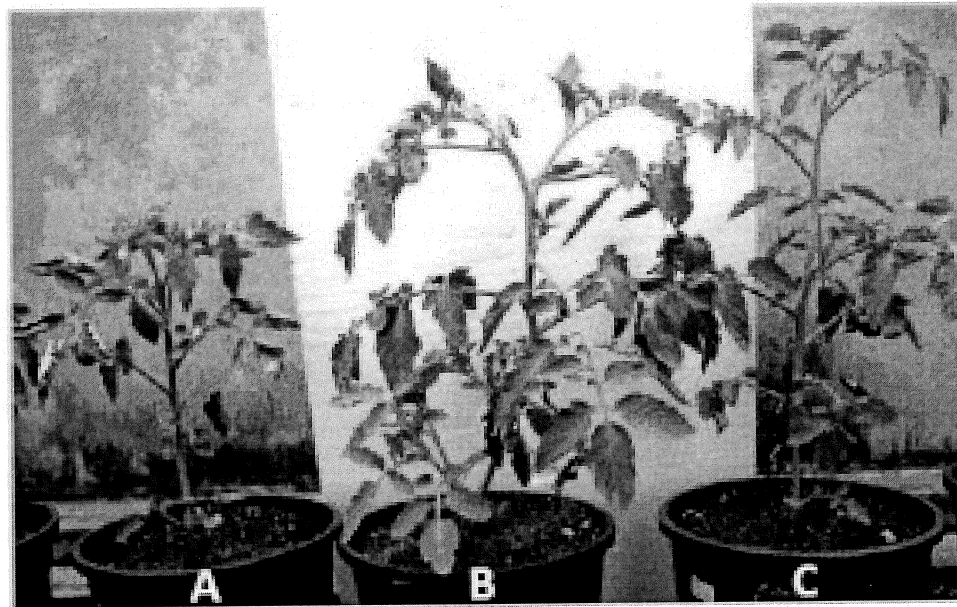


Fig. 19

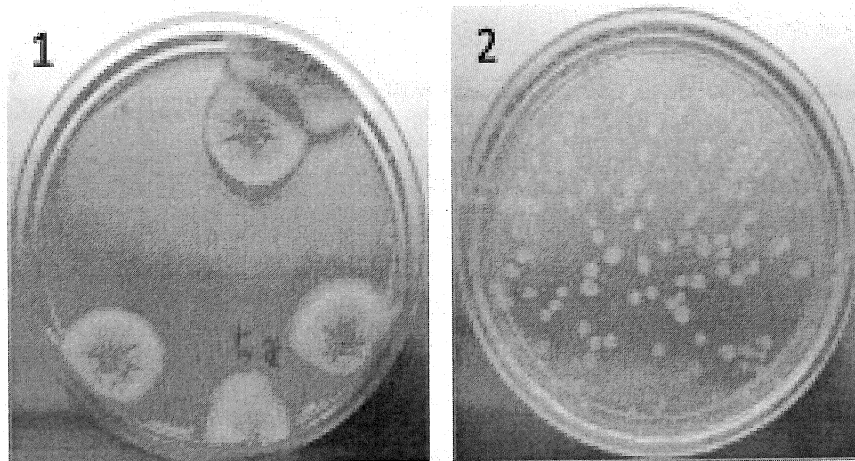


Fig. 20

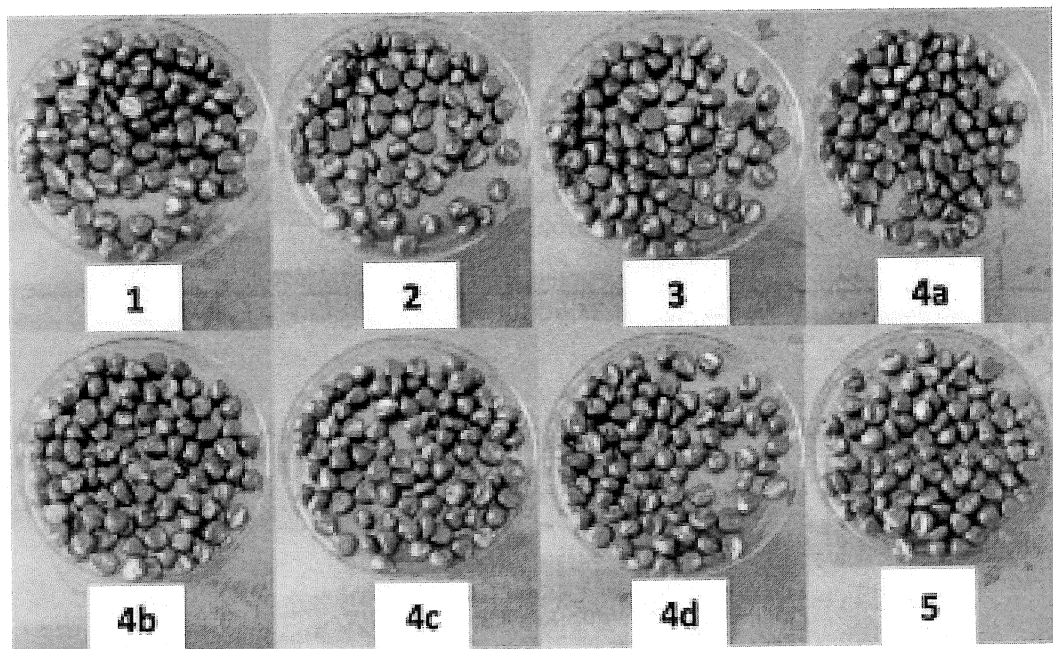


Fig. 21

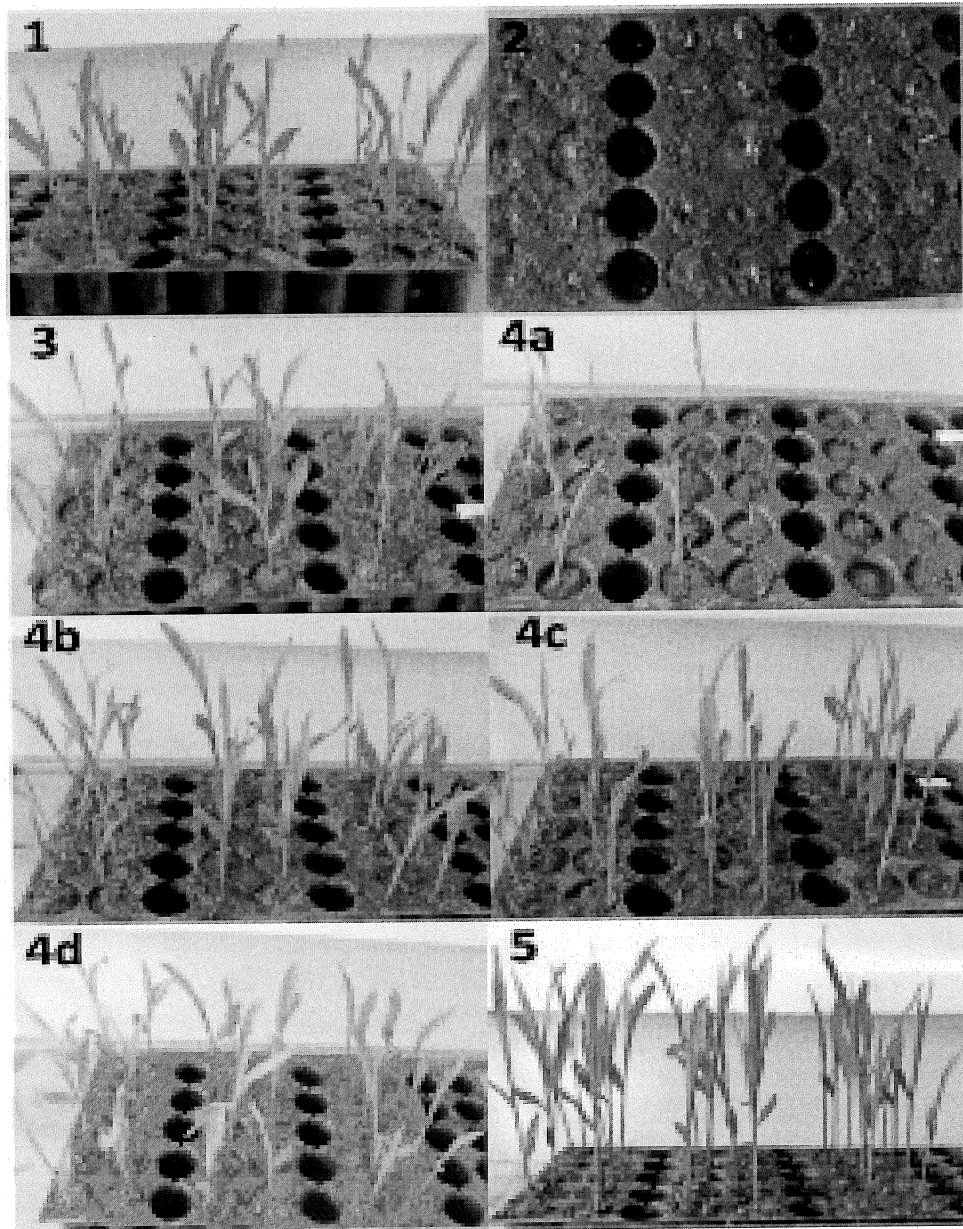


Fig. 22

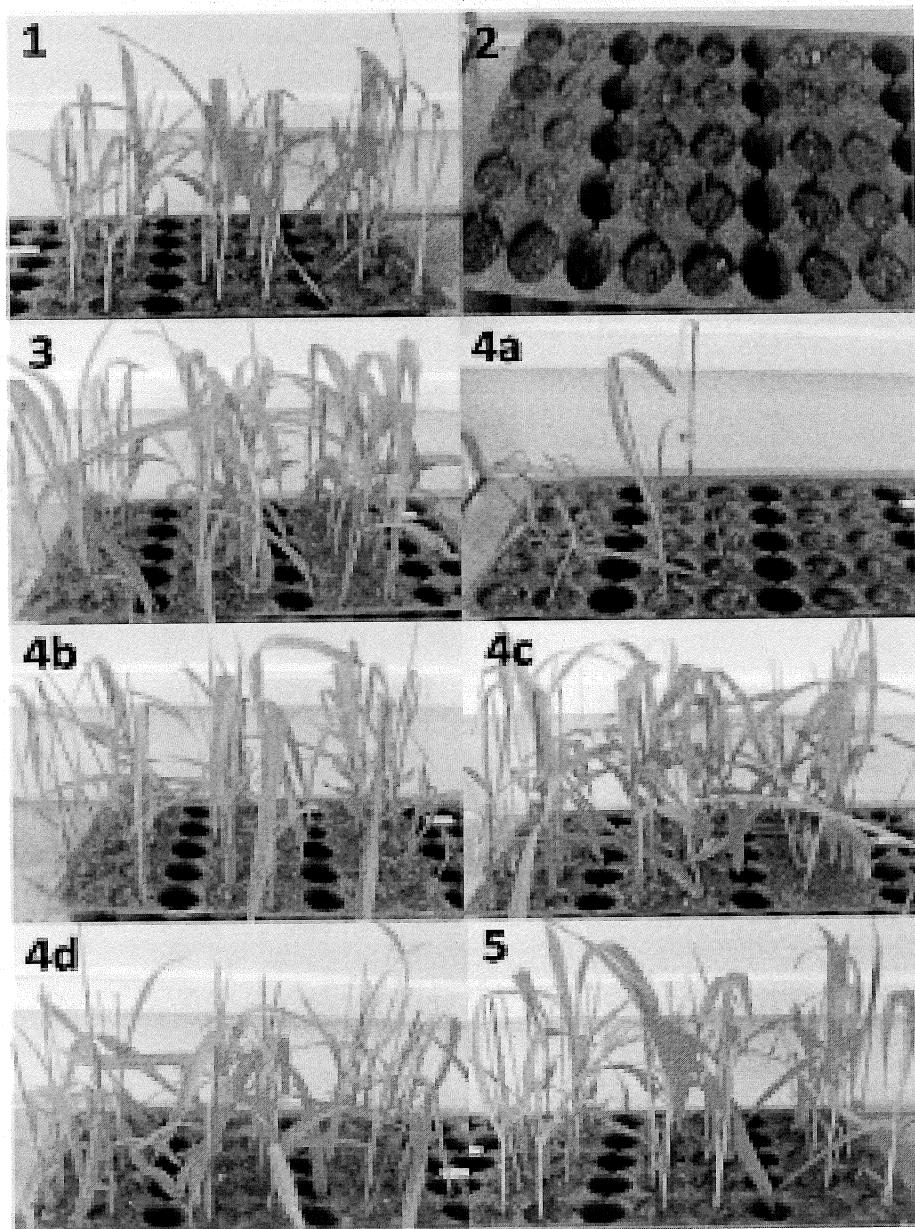


Fig. 23

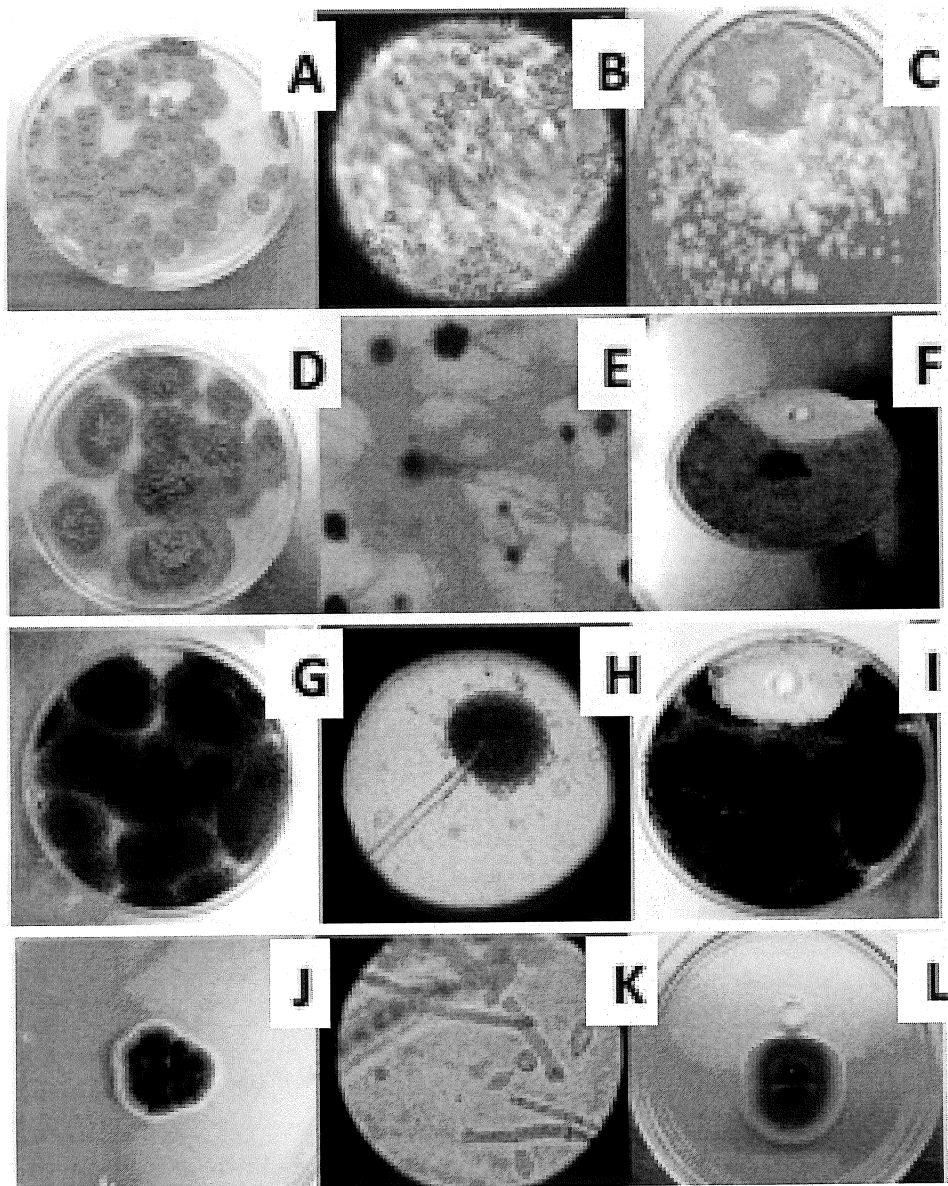
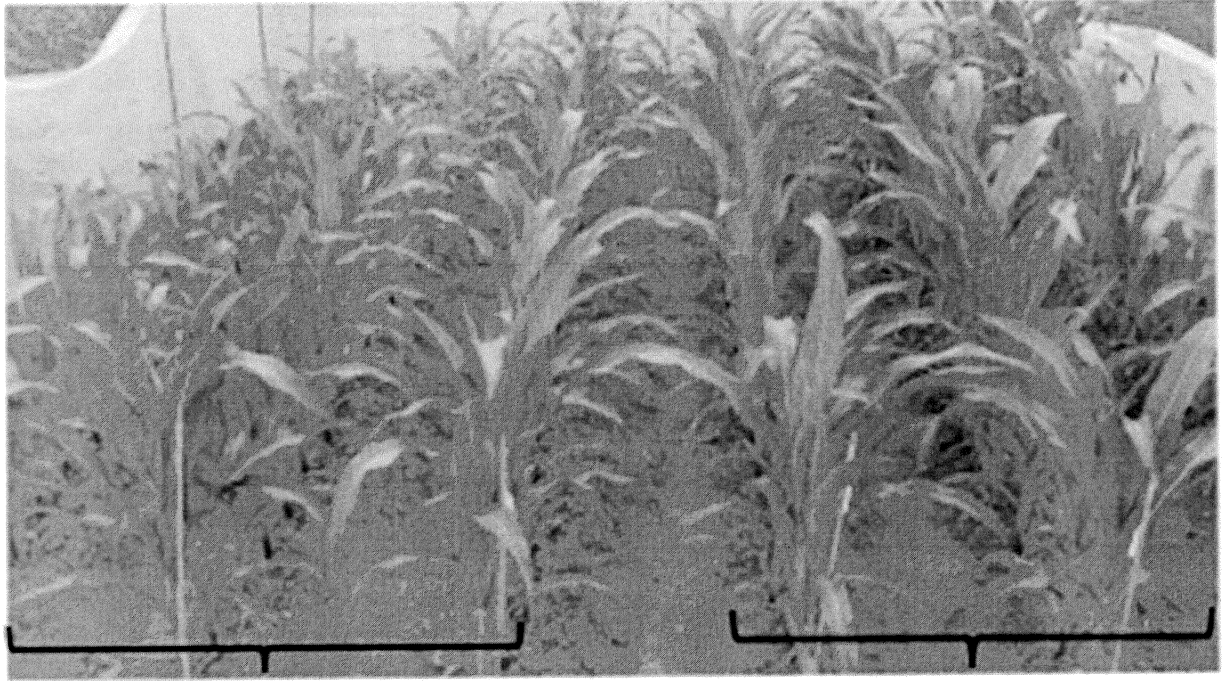


Fig. 24



Cây đối chứng

Cây được xử lý

Fig. 25