



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003064

(51) A01N 25/00
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00472

(22) 25/09/2020

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/03/2021 396

(73) Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (VN)
244 Điện Biên Phủ, Phường 7, Quận 3, Thành Phố Hồ Chí Minh

(72) Lê Đăng Quang (VN); Trần Đại Lâm (VN); Nguyễn Thị Phương Thảo (VN); Vũ Đình Hoàng (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM KHÁNG NẤM

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm kháng nấm, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị dung dịch nano TiO_2 nồng độ 100 ppm bằng phương pháp sol-gel kết hợp vi sóng; b) chuẩn bị dung dịch vi khuẩn có giá trị mật độ quang (OD) 0,5; và c) phối trộn dung dịch nano TiO_2 và dung dịch vi khuẩn để thu chế phẩm kháng nấm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực tạo ra quy trình sản xuất chế phẩm kháng nấm bảo vệ cây trồng, và thân thiện với môi trường, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình ổn định tạo ra chế phẩm mới trên cơ sở tích hợp nhóm vi khuẩn nội ký sinh thực vật (Endophytic bacteria) (trong giải pháp này là *Bacillus subtilis* GB03 và *Paenibacillus polymyxa* IN937a) với vật liệu nano (trong giải pháp này là TiO_2 hoặc SiO_2) để kích thích tăng trưởng, tăng khả năng kháng nấm gây bệnh hại cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Phân bón và thuốc bảo vệ thực vật là các lĩnh vực phát triển song song cùng với sự phát triển của ngành trồng trọt, do đó chiến lược phát triển phân bón và thuốc bảo vệ thực vật là để phục vụ chiến lược phát triển của ngành trồng trọt. Để chống lại sâu bệnh, thuốc trừ sâu hóa học đã là giải pháp trong nhiều năm qua. Tuy nhiên, việc sử dụng thâm canh các loại thuốc trừ sâu tổng hợp này đã gây ra thiệt hại lớn cho hệ sinh thái, tạo ra khả năng kháng sâu bệnh và các vấn đề sức khỏe, do chúng tồn tại lâu trong môi trường. Trong bối cảnh đó, kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng thuốc trừ sâu sinh học đã là một giải pháp thân thiện với môi trường trong những năm gần đây.

Bacillus spp. được phát hiện là một loại vi khuẩn nội ký sinh thực vật (Endophytic bacteria) trong đất, đã được sử dụng làm thuốc trừ sâu sinh học trong nông nghiệp và lâm nghiệp. Hầu hết các bằng sáng chế đều chỉ tập trung đến việc cải tiến các chủng *B. thuringiensis* hoặc sản xuất các protein Cry của chúng thể hiện hoạt động diệt các loại côn trùng khác nhau.

Tác giả Baum J và cộng sự (2006) trong sáng chế WO/2005/019414 đề cập đến việc phân lập và mô tả đặc điểm của trình tự nucleotit mã hóa các protein ngoại bào của *Bacillus thuringiensis* với tác dụng diệt côn trùng được tiết vào không gian và các chủng liên quan. Các protein được phân lập từ bề mặt nuôi cấy của *Bacillus thuringiensis* và các chủng liên quan, và thể hiện hoạt động diệt côn trùng đối với côn trùng coleopteran như bọ khoai tây Colorado (*Lymantria dispar*) và sâu hại rễ cây ngô tây (*Diabrotica undecempunctata*).

Tác giả Van RJ và cộng sự (2007) trong sáng chế WO/2007/107302 đề cập đến trình tự gen mới mã hóa protein diệt côn trùng do các chủng *Bacillus thuringiensis* tạo ra. Đặc biệt, các gen chimeric mới mã hóa protein Cry1C, Cry1B hoặc Cry1D được cung cấp rất hữu ích để bảo vệ thực vật khỏi bị côn trùng phá hoại.

Nhiều sản phẩm thương mại được bán trên thị trường dưới dạng thuốc diệt nấm sinh học dựa trên các loài *Bacillus* khác nhau như *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* và *B. subtilis* (Fravel 2005). Nhiều hợp chất chống nấm được phân lập từ những vi khuẩn này đã được xác định như *mycobacillins*, *iturins*, *plisatins*, *bacillomycins*, *Suractins*, *mycosubtilins*, *Mushistatins* và *subsporin* (Koumoutsis 2004; Madonna và cộng sự 2003; Nihorimbere và cộng sự 2012; Nishikiori và cộng sự 1986; Pathak và cộng sự 2012; Pecci và cộng sự 2010). Các chất chuyển hóa khác, bao gồm chitinase và các hợp chất và enzym phân hủy thành tế bào khác, cũng được sản xuất bởi *Bacillus* spp. (Chaaboni và cộng sự 2012).

Tác giả Hinarejos E và cộng sự trong sáng chế EP2781592A1 (2014) đã đề cập đến việc phát hiện ra một chủng *Bacillus subtilis* mới (IAB/BS03), có thể ức chế một loạt các bệnh do nấm và vi khuẩn trên cây trồng. Sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm diệt nấm bao gồm chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* mới nói trên, hoặc đơn lẻ, như một phần của công thức hoặc kết hợp với các loại thuốc trừ sâu sinh học và hóa học khác.

Tuy nhiên, một trong những ứng dụng quan trọng của chủng vi khuẩn *Bacillus* ít được đề cập đến, đó là một số loài chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng vi khuẩn thúc đẩy tăng trưởng thực vật vì chúng tạo ra thuốc kháng sinh; chúng gây ra sự ức chế tổng hợp ethylene và gây ra sự đề kháng toàn thân của cây trồng. Các cơ chế đã biết của vi khuẩn nội ký sinh thực vật (Endophytic bacteria) đối với cây trồng: (1): Biofertilizer (cố định đạm, sản sinh siderophore và hòa tan P trong đất); (2) Kiểm soát sinh học đối với các tác nhân gây bệnh cây trồng (đối kháng ức chế các tác nhân gây bệnh, sản sinh enzym lytic và cơ chế kích kháng trên cây trồng).

Vi khuẩn nội ký sinh thực vật (Endophytic bacteria) được tìm thấy trong hầu hết ở các loài thực vật, chúng cư trú ở trong nội mô của thực vật ký chủ và giữa

chúng hình thành một loạt các mối quan hệ khác nhau như cộng sinh tương hỗ, cộng sinh dinh dưỡng, hội sinh. Vi khuẩn nội ký sinh thực vật khi kết hợp chức năng kích thích tăng trưởng thực vật (PGPR) sẽ thúc đẩy thực vật tăng trưởng, tăng năng suất và đóng vai trò là một tác nhân điều hòa sinh học. Vi khuẩn nội ký sinh thực vật sản xuất hàng loạt các sản phẩm tự nhiên có lợi cho thực vật ký chủ mà ta có thể khai thác những tác nhân đó để ứng dụng trong y học, nông nghiệp hay công nghiệp. Ngoài ra nó còn có tiềm năng loại bỏ các chất gây ô nhiễm trong đất bằng cách tăng cường khả năng khử độc đồng thời có khả năng sản xuất sinh khối và nhiên liệu sinh học.

Hầu hết các nghiên cứu về vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (PGPR) hiện nay chủ yếu tập trung nhiều vào phân lập và thử nghiệm vai trò tăng khả năng chống chịu với điều kiện môi trường khắc nghiệt của nhóm vi khuẩn này. Tác giả Chaiharn và cộng sự trong một nghiên cứu “Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand” trên tạp chí *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2008) đã phân lập được tổng cộng có 216 phân lập vi khuẩn hòa tan phosphate được phân lập từ đất trồng lúa khác nhau ở miền Bắc Thái Lan. Những chủng này được sàng lọc *in vitro* cho các hoạt động thúc đẩy tăng trưởng thực vật của chúng như hòa tan phosphate vô cơ, amoniac (NH_3), catalase và hoạt động enzyme làm thoái hóa tế bào. Kết quả cho thấy 100% phosphate hòa tan vô cơ, 77,77% sản xuất NH_3 và hầu hết các chủng phân lập đều dương tính với catalase. Ngoài ra, một số chủng cũng sản sinh ra các enzym làm thoái hóa tế bào như protease (7%), chitinase (1%), cellulase (3%) và β -glucanase. Các chủng phân lập có thể biểu hiện nhiều hơn hai hoặc ba đặc tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật (PGP), có thể thúc đẩy tăng trưởng thực vật trực tiếp hoặc gián tiếp.

Gần đây, nhóm tác giả Yachana Jha và cộng sự (2015) trong một nghiên cứu “Endophytic *Pseudomonas pseudoalcaligenes* shows better response against the *Magnaporthe grisea* than a rhizospheric *Bacillus pumilus* in *Oryza sativa* (Rice)” trên tạp chí *Archives of Phytopathology and Plant Protection* đã nghiên cứu hoạt động của hỗn hợp vi khuẩn nội sinh (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) và vi khuẩn vùng rễ (*Bacillus pumilus*) trên *Oryza sativa* L. cũng cho thấy phản ứng tốt trong việc chống lại các tác động bất lợi của độ mặn.

Một nghiên cứu khác của tác giả Chandra Shekhar Nautiyal và cộng sự (2013) trong một nghiên cứu “Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress” trên tạp chí *Plant Physiology and Biochemistry* cũng cho thấy vai trò tương tự của vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (PGPR). Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của khả năng chịu mặn của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 (SN13) trên cây lúa trong điều kiện thủy canh và đất bị nhiễm mặn. SN13 tăng khả năng sinh trưởng của thực vật và khả năng chịu mặn (NaCl 200 mM).

Tác giả Labuschagne N và đồng sự trong sáng chế WO2015114552A1 (2015) đã đề cập đến chế phẩm kiểm soát sinh học bao gồm ít nhất một chủng phân lập được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Bacillus megaterium* A-07, chủng *Paenibacillus barcinonensis* A-10, chủng *Pseudomonas fluoresceins* N-04, chủng *Bacillus cereus* T-11, chủng *Lysinibacillus sphaericus* T-19, *Paenibacillus alvei* chủng T-22 và *Paenibacillus alvei* chủng T29 đã được chứng minh là chất tăng trưởng thực vật hiệu quả và tác nhân kiểm soát sinh học của bệnh thực vật trong nhà kính và trong các thử nghiệm đồng ruộng. Sáng chế còn liên quan đến các quy trình xác định các chủng vi khuẩn Rhizobacteria thúc đẩy tăng trưởng thực vật hiệu quả, phân lập các chủng này, nuôi cấy chúng trong môi trường nuôi cấy thuần khiết và sàng lọc các chủng phân lập để có hiệu quả như chất tăng trưởng thực vật và tác nhân kiểm soát sinh học của mầm bệnh thực vật bằng các thử nghiệm cụ thể.

Tác giả Hirsch AM và đồng sự trong sáng chế US20160143295A1 (2016) đã đề cập đến lĩnh vực tương tác giữa thực vật và vi sinh vật. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến các phương pháp và chế phẩm để tăng đặc tính phát triển của cây trồng bằng cách trồng cây với sự có mặt của các chủng vi sinh vật thúc đẩy tăng trưởng thực vật.

Gần đây, khoa học và công nghệ nano đã trở thành một lĩnh vực nghiên cứu hấp dẫn trong những năm gần đây. Các phân tử kích thước nhỏ đang ngày một được sử dụng rộng rãi trong nhiều ngành khác nhau. Trong số các ứng dụng, người ta chú ý nhiều hơn đến việc sử dụng các hạt nano trong các ngành công nghiệp y sinh và nông nghiệp. Trong nông nghiệp, năng suất của cây trồng được cải thiện đáng kể bằng cách sử dụng các chất dinh dưỡng vĩ mô và vi lượng thiết yếu dưới dạng phân bón nano.

Những nghiên cứu gần đây về hoạt chất dạng nano hóa như nano chitosan và nano bạc giúp kiểm soát hiệu quả bệnh hại cây trồng theo một cơ chế đặc hiệu riêng và có hàm lượng hoạt chất thấp từ đó giảm thiểu được ảnh hưởng của hóa chất đối với con người và môi trường. Công nghệ nano hóa hoạt chất mang lại nhiều lợi ích cho quá trình gia công (formulation) đối với chủng *Bacillus cereus* T-11 nói chung và cả biopesticide nói riêng để tạo ra các sản phẩm nano-biopesticide. Các nhiệm vụ nghiên cứu về các hoạt chất dạng nano hóa có thể kể tới như: chế phẩm nano bạc/chitosan sản xuất bằng phương pháp chiếu xạ gamma (2018), nano kẽm-đồng diệt nấm *Phytophthora capsici* (2016), nano đồng tổng hợp theo phương pháp sinh học trong phòng trừ bệnh nấm hồng do *Corticium salmonicola* (2015), nano MgAl layered double hydroxides (LDH) gắn anacardic acid để phòng trừ sâu (2015), chế phẩm nano silica và oligochitosan trừ bệnh thán thư (2015), nanocomposite chứa nano bạc trừ bệnh cây (2014). Trên thế giới hiện nay đã xuất hiện khái niệm nano-biopesticide. Một số thuốc chứa hoạt chất nano bạc như MIFUM 0,6 DD và Nano Kito 2.6 SL đã được nghiên cứu và phát triển gần đây đồng thời được đăng ký thương mại hóa tại Việt Nam.

Tuy nhiên, các nghiên cứu tích hợp vật liệu nano với vi khuẩn endophyt còn rất mới mẻ, chưa có các nghiên cứu tích hợp vật liệu nano với vi khuẩn endophyt và đánh giá tác dụng của chúng đối với cây trồng và vi sinh vật hại cây trồng. Sự tích hợp giúp cho quá trình chuyển hóa và hấp thụ phân bón của cây diễn ra nhanh chóng và hiệu quả giúp giảm lượng phân bón và thuốc tăng trưởng thực vật. Sự có mặt của hạt nano giúp vi khuẩn bám dính và xâm nhập vào bề mặt rễ cây hiệu quả hơn. Đồng thời khi endophyt phát triển mạnh, thì cây trồng sẽ phải tiết ra nhiều hoạt chất phytoalexin - hoạt chất miễn dịch tự nhiên có trong cây. Hoạt chất này sẽ giúp cây tăng thêm khả năng chống chịu khi gặp những điều kiện bất lợi từ môi trường giúp người nông dân giảm đi việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trong quá trình chăm sóc cây.

Do đó, có nhu cầu cao về một quy trình công nghệ tạo ra một chế phẩm mới tích hợp vật liệu nano với vi khuẩn nội ký sinh thực vật (endophytic bacteria) để giúp cho quá trình chuyển hóa và hấp thụ phân bón của cây diễn ra nhanh chóng và hiệu quả giúp giảm lượng phân bón và thuốc tăng trưởng thực vật, nhờ đó giúp người nông dân giảm đi việc sử dụng thuốc BVTV trong quá trình chăm sóc cây.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Vi khuẩn nội ký sinh thực vật (Endophytic bacteria) được tìm thấy trong hầu hết ở các loài thực vật, chúng cư trú ở trong nội mô của thực vật ký chủ và giữa chúng hình thành một loạt các mối quan hệ khác nhau như cộng sinh tương hỗ, cộng sinh dinh dưỡng, hội sinh. Vi khuẩn nội ký sinh thực vật (Endophytic bacteria) khi kết hợp chức năng chức năng kích thích tăng trưởng thực vật (PGPR) sẽ thúc đẩy thực vật tăng trưởng, tăng năng suất và đóng vai trò là một tác nhân điều hòa sinh học. Vi khuẩn nội ký sinh thực vật sản xuất hàng loạt các sản phẩm tự nhiên có lợi cho thực vật ký chủ mà ta có thể khai thác những tác nhân đó để ứng dụng trong y học, nông nghiệp hay công nghiệp. Ngoài ra nó còn có tiềm năng loại bỏ các chất gây ô nhiễm trong đất bằng cách tăng cường khả năng khử độc trên thực vật và làm cho đất trở nên màu mỡ thông qua chu trình photphat và cố định đạm. Ngày càng có nhiều quan tâm trong việc phát triển các ứng dụng tiềm năng công nghệ sinh học của vi khuẩn nội ký sinh thực vật (Endophytic) để phát triển các giống cây trồng có khả năng khử độc đồng thời có khả năng sản xuất sinh khối và nhiên liệu sinh học

Mục đích của giải pháp là đề xuất quy trình cho phép tạo ra một loại chế phẩm bằng cách tích hợp vật liệu nano (nano TiO_2 hoặc nano SiO_2) và vi khuẩn nội ký sinh thực vật. Sự tích hợp giúp cho quá trình chuyển hóa và hấp thụ phân bón của cây diễn ra nhanh chóng và hiệu quả giúp giảm lượng phân bón và thuốc tăng trưởng thực vật. Sự có mặt của hạt nano giúp vi khuẩn bám dính và xâm nhập vào bề mặt rễ cây hiệu quả hơn. Bề mặt tích điện của hạt nano sẽ kết dính các tế bào vi khuẩn tạo thành cụm và cũng đồng thời bám vào bề mặt rễ cây trồng. Đồng thời khi vi khuẩn nội ký sinh thực vật phát triển mạnh, thì cây trồng sẽ phải tiết ra nhiều hoạt chất phytoalexin (PA) hơn, đây là hoạt chất miễn dịch tự nhiên có trong cây. Hoạt chất này sẽ giúp cây tăng thêm khả năng chống chịu khi gặp những điều kiện bất lợi từ môi trường giúp người nông dân giảm đi việc sử dụng thuốc BVTV trong quá trình chăm sóc cây. Hiện nay có rất ít các nghiên cứu tích hợp vật liệu nano với vi khuẩn vi khuẩn nội ký sinh thực vật và đánh giá tác dụng của chúng đối với cây trồng và vi sinh vật hại cây trồng.

Chúng vi khuẩn nội ký sinh thực vật *Bacillus spp.* được sử dụng có cơ chế dạng đa tác động lên các vi sinh vật gây hại lây nhiễm cây trồng từ đất và hạn chế các bệnh trên thân và lá như đối với nấm *Sphaerotheca fuliginea* gây bệnh phấn

trắng trên cây dưa lưới. Bên cạnh đó có khả năng kích kháng đối với cây trồng nâng cao tính chống chịu với các tác nhân gây bệnh. Quá trình đưa các bào tử vi khuẩn tích hợp với các hạt khoáng nano tạo thành phân bón đa chức năng/kiểm soát sinh học còn có sự kết hợp giữa một số loại vi khuẩn loài *Bacillus* khác như IN937a, E681, EXTN1 nhằm tạo ra phổ tác dụng rộng đối với môi trường và sinh thái giúp cải tạo đất và giúp cây trồng phát triển khỏe mạnh và hạn chế được bệnh do nấm và vi khuẩn gây ra. Hiệu quả sử dụng sản phẩm phân bón sinh học-kiểm soát sinh học của chúng tôi trên cây họ bầu bí đã cho thấy có khả năng làm tăng trưởng biomass và năng suất cây trồng tăng từ 15-30%.

Mục đích của giải pháp là đề xuất quy trình tạo ra chế phẩm tích hợp tích hợp vật liệu nano (nano TiO_2 /nano SiO_2) và vi khuẩn nội ký sinh thực vật, bao gồm các công đoạn sau:

a) Chuẩn bị dung dịch nano TiO_2 nồng độ 100 ppm bằng phương pháp sol-gel kết hợp vi sóng, bao gồm các bước

- định lượng các thành phần cần thiết dùng cho công đoạn này, cụ thể là: Titanium Isopropoxit (TTIP): $\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$, Polyethylen glycol 400 (PEG 400), H_2O , và etanol,

- hòa tan $\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$ trong dung môi etanol theo tỉ lệ quy định thu được dung dịch A,

- hòa tan nước trong dung môi etanol theo tỉ lệ quy định thu được dung dịch B,

- hòa tan polyethylen glycol 400 trong etanol theo tỉ lệ quy định thu được dung dịch C,

- nạp dung dịch C vào bình phản ứng,

- nạp từ từ đồng thời dung dịch A và dung dịch B ở trên vào bình phản ứng trong thời gian quy định,

- phân tán hỗn hợp có trong bình này bằng siêu âm tại nhiệt độ và thời gian quy định,

- nạp từ từ dung môi etanol trong quá trình siêu âm để đảm bảo thể tích dung dịch không đổi do quá trình bay hơi,

- ngừng nạp dung môi ethanol, tiếp tục gia nhiệt tại nhiệt độ quy định để loại bỏ hết ethanol trong bình phản ứng,

- khuấy đều hỗn hợp này trong thời gian quy định,

- làm nguội dung dịch này đến nhiệt độ trong phòng,

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, tỉ lệ $Ti[OCH(CH_3)_2]_4$ và ethanol nằm trong khoảng 1/5 đến 3/5 (khối lượng gam/thể tích ml).

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, tỉ lệ nước và ethanol nằm trong khoảng 1/50 đến 3/50 (thể tích/thể tích).

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, tỉ lệ polyethylen glycol 400 và ethanol là 1/4 (thể tích/thể tích).

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, tỉ lệ $Ti[OCH(CH_3)_2]_4$, nước và polyethylen glycol 400 là 2,0 g/2,0 ml/100 ml (khối lượng/thể tích/thể tích).

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, thời gian nạp đồng thời dung dịch A và dung dịch B vào dung dịch C nằm trong khoảng 2 đến 3 giờ.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, nhiệt độ bình phản ứng là 70 °C đến 80 °C.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, thời gian đánh siêu âm hỗn hợp phản ứng là 12 đến 15 giờ.

b) Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn có giá trị mật độ quang (OD) 0,5, bao gồm các bước

- định lượng các thành phần cần thiết dùng cho việc tạo môi trường nuôi cấy lỏng Luria-Bertani (LB) để hoạt hóa vi khuẩn, cụ thể là: pepton, cao nấm men và NaCl,

- hoạt hóa chủng vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy lỏng LB tại điều kiện lắc, nhiệt độ và thời gian quy định, thu được dịch nuôi cấy D,

- nạp dịch nuôi cấy D vào bình môi trường nuôi cấy lỏng LB để nhân giống dịch thể trong thời gian và nhiệt độ quy định, thu được dịch nuôi E,

- pha loãng dịch nuôi E bằng môi trường nuôi cấy lỏng LB để giá trị mật độ quang (OD) đạt 0,5 thu được giống dịch thể F,

- nạp một thể tích xác định môi trường nuôi cấy lỏng LB vào bình lên men,
- nạp một thể tích xác định giống dịch thể F vào bình lên men trên,
- tiến hành lắc bình lên men tại nhiệt độ và trong thời gian quy định thu được dịch nuôi cấy G,

Theo phương án của giải pháp hữu ích, nhiệt độ nuôi cấy trong khoảng 35 °C đến 37°C.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, thời gian nuôi cấy trong khoảng 12 đến 48 giờ.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, tỉ lệ thể tích giống dịch thể và môi trường nuôi cấy lỏng LB trong khoảng từ 5% đến 15%.

c) Phối trộn dung dịch nano TiO₂ và dung dịch vi khuẩn, bao gồm các bước

- định lượng các thành phần cần thiết dùng cho việc tích hợp tạo ra chế phẩm này, cụ thể là: dung dịch nano TiO₂ ở công đoạn a) và dung dịch vi khuẩn *B. Subtilis* được nuôi cấy ở công đoạn b),

- pha loãng dung dịch chứa nano TiO₂ thu được ở công đoạn a) bằng nước theo tỉ lệ quy định thu được dung dịch H,

- nạp dung dịch H vào bình lên men,

- nạp từ từ dung dịch nuôi cấy vi khuẩn G thu được ở công đoạn b) vào bình lên men trên,

- tiến hành lắc bình lên men trong thời gian và nhiệt độ quy định thu được sản phẩm cuối cùng,

Theo phương án của giải pháp hữu ích, nồng độ dung dịch H thu được sau khi pha loãng dung dịch nano TiO₂ là từ 30 ppm đến 100 ppm.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, tỉ lệ dung dịch nano TiO₂ và dung dịch vi khuẩn *B. Subtilis* là nằm trong khoảng 50ml/ 5ml đến 167ml/5ml (thể tích/thể tích).

Theo phương án của giải pháp hữu ích, nhiệt độ nuôi cấy trong bình lên men để hạt nano bám vào vi khuẩn trong khoảng 35 °C đến 37°C.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, thời gian nuôi cấy trong bình lên

men để hạt nano bám vào vi khuẩn trong khoảng 24 đến 48 giờ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu và ưu điểm của giải pháp sẽ trở nên rõ ràng hơn qua phần mô tả chi tiết các phương án làm ví dụ cùng với hình vẽ kèm theo, trong đó:

Hình 1 là đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa giá trị mật độ quang (OD) và thời gian của các mẫu chứa vi khuẩn-nano TiO₂.

Hình 2 là ảnh được xác định bằng phương pháp kính hiển vi điện tử quét xạ trường (FE-SEM: Field Emission Scanning Electron Microscopy): (A) mẫu nano TiO₂ bám vào vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trong môi trường nuôi cấy LB sau 48h thử nghiệm; (B) mẫu nano TiO₂-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trên rễ của mẫu cây dưa lưới trước khi được trồng vào bầu đất.

Hình 3 là ảnh thể hiện khả năng kích thích tăng trưởng sự phát triển bộ rễ cây trước khi đưa ra ruộng sản xuất (A) và (B) ảnh thể hiện khả năng kích thích tăng trưởng chiều cao của dưa lưới sau trồng 28 ngày do ảnh hưởng chế phẩm nano TiO₂-Vi khuẩn nội ký sinh thực vật.

Hình 4 là ảnh được xác định bằng phương pháp kính hiển vi điện tử quét xạ trường (FE-SEM: Field Emission Scanning Electron Microscopy): (A) mẫu nano SiO₂ bám vào vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trong môi trường nuôi cấy LB sau 48h thử nghiệm; (B) mẫu nano SiO₂-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trên rễ của mẫu cây dưa lưới trước khi được trồng vào bầu đất.

Hình 5 là đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa giá trị mật độ vi khuẩn và thời gian của các mẫu chứa nano SiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật.

Hình 6 là ảnh thể hiện khả năng kích thích tăng trưởng chiều cao của dưa lưới do ảnh hưởng chế phẩm nano SiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật: mẫu đối chứng (C) và mẫu thí nghiệm (T) cây dưa lưới: (A) bộ rễ trước khi trồng vào bầu đất; (B) chiều cao thân sau trồng 28 ngày.

Hình 7 là ảnh thể hiện khả năng đối kháng nấm *Sphaerotheca fuliginea* gây bệnh phấn trắng của mẫu SiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật. Mẫu bệnh phẩm trước khi xử lý (A); Mẫu bệnh phẩm sau khi xử lý 1 ngày (B); sau khi xử lý 2 ngày (C) và sau khi xử lý 3 ngày (D).

Hình 8 là ảnh thể hiện khả năng đối kháng nấm *Phytophthora infestans* của mẫu SiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật sau 2 ngày (A); sau 4 ngày (B) và sau 6 ngày (C).

Hình 9 là ảnh thể hiện khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum orbiculare* của SiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật sau 2 ngày (A); sau 4 ngày (B) và sau 6 ngày (C).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp sẽ được mô tả cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó các phương án làm ví dụ của giải pháp được thể hiện.

Theo một khía cạnh của giải pháp, chế phẩm để giúp tăng trưởng thực vật và kháng nấm gây bệnh hại cây trồng, trong đó chế phẩm này chứa hạt nano được mang lên vi khuẩn nội ký sinh thực vật.

Chế phẩm tích hợp theo giải pháp có thể sử dụng vật liệu nano như TiO₂, SiO₂ để tăng khả năng thâm nhập của vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 vào rễ cây.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tạo ra chế phẩm tích hợp vật liệu nano TiO₂ và vi khuẩn nội ký sinh thực vật, bao gồm các công đoạn sau:

Công đoạn a) là công đoạn chuẩn bị dung dịch nano TiO₂ nồng độ 100 ppm bằng phương pháp sol-gel kết hợp vi sóng. Các hóa chất ban đầu bao gồm: Titanium Isopropoxit (TTIP): Ti[OCH(CH₃)₂]₄, Polyethylen glycol 400 (PEG 400), H₂O, và etanol. Hòa tan Ti[OCH(CH₃)₂]₄ trong dung môi etanol với tỉ lệ 12g/50ml (khối lượng/thể tích) thu được dung dịch A. Pha loãng nước trong dung môi etanol với tỉ lệ 2ml/50ml (thể tích/thể tích) thu được dung dịch B. Hòa tan Polyethylene glycol 400 trong etanol với tỉ lệ 100ml/400ml (thể tích/thể tích) thu được dung dịch C. Nạp dung dịch C vào bình phản ứng. Nhỏ giọt từ từ đồng thời dung dịch A và dung dịch B vào bình phản ứng trong thời gian 3 giờ, với tỉ lệ 50ml/52ml/500ml (thể tích dung dịch A/thể tích dung dịch B/thể tích dung dịch C). Bình phản ứng được đặt trong bể siêu âm và nhiệt độ được duy trì tại 80°C trong thời gian trên. Sau khi hết dung dịch A và dung dịch B, tiếp tục siêu âm bình phản ứng trong thời gian 15 giờ. Trong quá trình phản ứng bổ sung etanol để duy trì thể tích bình phản ứng không đổi do quá trình bay hơi etanol. Sau đó ngừng bổ sung etanol, nhiệt độ được duy trì tại 80°C cho đến khi loại bỏ etanol trong bình phản ứng. Để nguội hỗn hợp sản phẩm ở nhiệt độ trong phòng thu được sản phẩm

dạng lỏng là dung dịch nano TiO_2 với nồng độ 100 ppm.

Công đoạn b) là công đoạn chuẩn bị dung dịch vi khuẩn có giá trị mật độ quang (OD) 0,5. Chúng vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 được lưu trữ dưới dạng sinh khối khô. Tiến hành hoạt hóa lại chủng vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy lỏng LB, nuôi lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng từ 35 °C đến 37°C trong vòng 24 giờ.

Sau 24 giờ, lấy dịch nuôi cấy chuyển sang môi trường thạch bằng phương pháp cấy rìa giữ trong tủ ẩm 32°C trong 24 giờ để xác định hình thái khuẩn lạc. Việc này giúp chúng ta xác định được giống gốc có thuần chủng hay không, có bị chết và bị tạp nhiễm trong quá trình bảo quản. Tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn xác định độ thuần. Khi đã xác định được, tiến hành nhân giống dịch thể. Lấy khuẩn lạc từ đĩa mới nhân truyền vào bình môi trường LB nhân giống dịch thể. Nuôi trên máy lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng từ 35 °C đến 37 °C trong 24 giờ. Xác định giá trị mật độ quang (OD) trong bình môi trường nuôi. Pha loãng dịch nuôi sao cho giá trị mật độ quang OD đạt 0,5. Lấy giống dịch thể có giá trị mật độ quang OD bằng 0,5 trên nạp vào bình lên men chứa dịch môi trường với tỉ lệ 1/10 (thể tích/thể tích). Nuôi trên máy lắc với các chế độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng từ 35 °C đến 37 °C trong 24 giờ.

Công đoạn c) là công đoạn phối trộn dung dịch nano TiO_2 và dung dịch vi khuẩn. Pha loãng dung dịch chứa hạt nano TiO_2 thu được ở công đoạn a) bằng nước tỉ lệ quy định thu được dung dịch C có nồng độ 3 µg/ml. Nạp dung dịch C vào bình lên men, sau đó nạp từ từ dung dịch nuôi cấy vi khuẩn thu được ở công đoạn b) vào bình lên men trên. Tiến hành lắc bình lên men với chế độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng từ 35°C đến 37°C trong 24 giờ, thu được sản phẩm cuối cùng dạng lỏng là dung dịch chứa nano TiO_2 được gắn lên vi khuẩn, trong đó nồng độ TiO_2 nằm trong khoảng từ 30 µg/ml đến 100 µg/ml; vi khuẩn có giá trị mật độ quang (OD) bằng 0,5.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được minh họa rõ hơn qua các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này không dùng làm giới hạn mục đích và phạm vi của giải pháp.

Ví dụ 1: Nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 và tích hợp hạt nano TiO_2 lên vi khuẩn *B. subtilis*

Nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 được lưu trữ dưới dạng sinh khối khô. Vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường nuôi cấy lỏng, nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 35 - 37 °C trong vòng 24 giờ. Sau 24 giờ, lấy dịch nuôi cấy chuyển sang môi trường thạch bằng phương pháp cấy ria giữ trong tủ ẩm 32 °C /24 giờ để xác định hình thái khuẩn lạc. Tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn xác định độ thuần. Khi đã xác định được, tiến hành nhân giống dịch thể. Lấy 1 khuẩn lạc từ đĩa mới nhân truyền vào bình môi trường LB nhân giống dịch thể. Nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút ở 35 – 37 °C trong 24 giờ. Xác định giá trị OD trong bình môi trường nuôi. Pha loãng dịch nuôi sao cho giá trị mật độ quang (OD) = 0,5. Lấy 15 ml giống dịch thể có giá trị mật độ quang (OD) cấy truyền vào bình lên men chứa 150 ml dịch môi trường (tỉ lệ 10 %). Nuôi trên máy lắc với các chế độ như trên trong 24 giờ.

Khảo sát sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 sau khi mang nano TiO₂.

Ảnh hưởng của nồng độ nano titan (0; 30; 40; 50; 60 và 100 ppm) đối với sự phát triển của vi khuẩn theo thời gian đã được thực hiện trong nghiên cứu. Tiến hành lấy nano titan ở các nồng độ khác nhau trộn với 50 ml môi trường LB trong các trong ống nghiệm. Sau đó, 5 ml vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 đạt giá trị mật độ quang OD=0,5 được thêm vào mỗi môi trường LB chứa nano titan nồng độ khác nhau. Tiến hành nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C. Cứ sau bốn giờ, lấy 100 µl môi trường pha loãng trong ống đưa lên trên bề mặt các đĩa thạch bằng que thủy tinh vô trùng và tiến hành đo giá trị OD bằng máy đo mật độ quang (OD) cầm tay. Tiến hành khảo sát mật độ vi khuẩn ở các nồng độ nano TiO₂ khác nhau theo thời gian (Bảng 1) để đánh giá tác động của nồng độ nano TiO₂ tới sự phát triển của vi khuẩn.

Bảng 1. Kết quả khảo sát mật độ quang (OD) các mẫu vi khuẩn và nano TiO₂

Nồng độ nano (ppm)	Thời gian (giờ)				
	4	8	12	24	48
30	0,48 ± 0,03	0,61 ± 0,01	0,725 ± 0,025	1,06 ± 0,04	1,22 ± 0,02
40	0,44 ± 0,01	0,605 ± 0,015	0,83 ± 0,03	1,065 ± 0,055	1,195 ± 0,05
50	0,545 ± 0,005	0,59 ± 0,03	0,755 ± 0,015	1,065 ± 0,025	1,305 ± 0,005
60	0,585 ± 0,005	0,625 ± 0,005	0,81 ± 0,05	1,205 ± 0,045	1,62 ± 0,02
100	0,565 ± 0,005	0,625 ± 0,005	0,87 ± 0,04	1,2 ± 0,03	1,65 ± 0,03
0*	0,525 ± 0,005	0,595 ± 0,015	0,8 ± 0,02	1,085 ± 0,005	1,22 ± 0,04

*Đối chứng

Kết quả từ bảng 1 và hình 1 cho thấy ảnh hưởng của các nồng độ nano TiO_2 khác nhau đến sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03. Sự phát triển của vi khuẩn phụ thuộc vào nồng độ nano TiO_2 và thời gian. Trong 48h thử nghiệm, ta thấy vi khuẩn phát triển và sinh trưởng khá ổn định, giá trị mật độ quang OD tăng dần tuyến tính theo thời gian. Đa số các nồng độ nano TiO_2 thử nghiệm đều có giá trị mật độ quang (OD) cao hơn mẫu đối chứng ở tất cả các thời điểm nghiên cứu, trong đó nồng độ nano TiO_2 60 ppm và 100 ppm có đường tăng trưởng cao nhất và gần giống nhau. Ở thời điểm 48h, mẫu thí nghiệm chứa nano TiO_2 giá trị mật độ quang (OD) đạt cao nhất bằng 1,65.

Ví dụ 2: Khảo sát ảnh hưởng của chế phẩm nano TiO_2 - vi khuẩn nội ký sinh thực vật đến khả năng sinh trưởng và phát triển cây dưa lưới

Hạt giống được tuyển chọn (hạt to mẩy chắc) chưa bọc hóa chất đem ngâm với chế phẩm nano-vi khuẩn nội ký sinh thực vật ở nhiệt độ 25 – 30 °C trong vòng 1,5-2,0 h, sau đó ủ cho nứt mầm rồi gieo 1 hạt/ lỗ vào loại 50 lỗ/khay. Sau đó tưới dung dịch chế phẩm lên bề mặt khay giống. Tưới 2 lần vào lúc mọc mầm đều và 5 ngày sau mọc. Khi cây đạt tiêu chuẩn thì đưa ra ruộng sản xuất, bố trí trồng hàng kép trên giá thể với mật độ 2.800 cây/1000 m², tưới gốc theo định kì 1 lần/tuần. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) gồm 4 công thức (CT1: đối chứng, không xử lý; CT2: vi khuẩn nội ký sinh thực vật (10^7 cfu/ml); CT3: nano TiO_2 60 µg/µl- vi khuẩn nội ký sinh thực vật với 3 lần nhắc lại.

Một số chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ và tốc độ nảy mầm (%). Khả năng bám dính vi khuẩn lên rễ cây: lấy rễ cây của các công thức thí nghiệm, sấy khô, sau đó chụp SEM. Sự phát triển của bộ rễ: so sánh bộ rễ của công thức đối chứng với các công thức khác trước khi chuyển ra trồng vào bầu lớn. Động thái tăng trưởng chiều cao cây (cm): chiều cao cây được tính từ gốc đến đỉnh sinh trưởng. Động thái tăng trưởng số lá (lá/cây). Khả năng đẻ nhánh. Kết quả đo 1 lần/tuần

Khả năng bám dính của hạt nano TiO_2 -vi khuẩn lên rễ cây dưa lưới

Hình 2A cho ta thấy nano TiO_2 bám lên bề mặt của vi khuẩn từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho rễ cây hấp thu được Titan trong quá trình vi khuẩn xâm nhập vào sâu qua vỏ rễ (Hình 2B). Quan sát các mẫu ảnh SEM mẫu rễ thí nghiệm có thể thấy tích hợp nano-vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 bám trên bộ rễ từ đó có những tác động tới hoạt động của bộ rễ, ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng.

Tỷ lệ và tốc độ nảy mầm

Ở tất cả các công thức tỉ lệ nảy mầm đạt 100%. Ở công thức 2 và 3 có số lượng rễ và chiều dài rễ lớn hơn so với công thức đối chứng, trong đó ở công thức 3 chứa nano TiO_2 bộ rễ phát triển mạnh nhất, còn công thức chỉ chứa vi khuẩn bộ rễ có sự phát triển nhỉnh hơn mẫu đối chứng không đáng kể (Hình 3A). Bộ rễ là tiền đề sự phát triển của cây trồng, bước đầu ta có thể thấy ở công thức tưới nano TiO_2 , cây trồng có khả năng phát triển tốt hơn so với công thức không chứa nano-vi khuẩn PGPR

Bảng 2. Thời gian sinh trưởng của các mẫu dưa lưới

Đơn vị tính: ngày

Công thức	Thời gian từ gieo đến nảy mầm	Thời gian từ gieo đến trồng	Thời gian từ gieo đến ra hoa cái đầu tiên
1(ĐC)	3	14	35
2	3	14	33
3	3	14	30

Từ kết quả bảng 2 cho thấy: sau từ 3 - 4 ngày, tất cả các hạt trong công thức thí nghiệm đều nảy mầm. Các công thức tham gia thí nghiệm ở giai đoạn cây con đều sinh trưởng tốt, sau 12 ngày đều đạt 1 - 2 lá thật, đáp ứng các yêu cầu xuất vườn. Cây con trước khi trồng ra ruộng sản xuất ở các công thức đã có sự khác biệt khá rõ rệt, ở công thức 3 chứa nano TiO_2 cây phát triển tốt khỏe, thân cây mập mạp hơn, ra hoa cái sớm nhất.

Bảng 3. Tốc độ tăng trưởng của các mẫu dưa lưới

Công thức	Chiều cao trung bình (cm)			Số lá trung bình (số lá)			Số nhánh trung bình (số nhánh)		
	14 NST	21 NST	28 NST	14 NST	21 NST	28 NST	14 NST	21 NST	28 NST
1	21,5	60,7	101,2	5,0	8,7	14,3	Chưa phân nhánh	Chưa phân nhánh	Chưa phân nhánh
2	23,8	65,9	108,3	5,8	9,6	16,5			1,00
3	25,7	67,8	111,9	6,0	10,0	17,0			2,20

Từ kết quả thử nghiệm cho thấy, tốc độ tăng trưởng chiều dài thân chính ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau là khác nhau. Giai đoạn từ trồng đến 14 ngày, các giống dưa thí nghiệm có tốc độ tăng trưởng chiều dài thân chính chậm do cây dưa

phải trải qua quá trình hồi xanh bén rễ 2 - 5 ngày, khả năng hút nước và dinh dưỡng kém.

Ở giai đoạn tiếp theo từ 14 - 21 ngày sau trồng, sự tăng trưởng của cây đặc biệt là sự kéo dài của các lông tăng nhanh rõ rệt. Lúc này cây vừa sinh trưởng sinh dưỡng vừa sinh trưởng sinh thực nên cần tác động các biện pháp kỹ thuật hợp lý để cây phát triển chiều dài, khối lượng thân lá tối ưu nhằm tích lũy vật chất để cây ra hoa, kết quả. Giai đoạn sau trồng từ 21 - 28 ngày, tốc độ tăng trưởng chiều dài thân của các giống dưa lưới tăng rất mạnh, trong đó ở công thức 3 chiều dài thân chính đạt cao nhất (111,9 cm), công thức đối chứng thấp nhất (101,2 cm) (Hình 3B).

Động thái tăng trưởng số lá dưa lưới ở các giai đoạn khác nhau là khác nhau. Các giống đều có số lá xuất hiện ít ở giai đoạn mới trồng, sau đó số lá tăng dần và tăng nhanh ở giai đoạn 14 - 28 ngày sau trồng. Số lá trên cây tương ứng với sự tăng trưởng chiều dài của cây. Ở công thức 3 có số lá nhiều nhất (17,0 lá), công thức đối chứng có số lá thấp nhất (14,3 lá) (Hình 3B).

Khả năng phân nhánh, giai đoạn từ trồng đến 21 ngày cây chưa có sự phân nhánh, tập trung phát triển chiều dài thân chính, từ 21- 28 ngày, cây bắt đầu phát triển nhánh để chuyển sang giai đoạn ra hoa, hình thành quả, công thức 3 có nhánh nhiều nhất (2,20 nhánh) trong khi đó công thức đối chứng chưa phân nhánh (Hình 3B).

Như vậy, các kết quả thử nghiệm mẫu nano- vi khuẩn nội ký sinh thực vật cho thấy nano TiO_2 có tác động tích cực rõ rệt tới sự tăng trưởng và phát triển của cây dưa lưới.

Ví dụ 3: Khảo sát ảnh hưởng của chế phẩm nano SiO_2 -vi khuẩn nội ký sinh thực vật đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn và cây dưa lưới

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ nano silica đến sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* GB03

Ảnh hưởng của nồng độ nano silica (0; 10; 30 và 50 $\mu\text{g/ml}$) đối với sự phát triển của vi khuẩn theo thời gian đã được thực hiện trong nghiên cứu. Tiến hành lấy nano silica ở các nồng độ khác nhau trộn với 50 ml môi trường LB trong các ống nghiệm. Sau đó, 5 ml vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đạt mật độ 10^5 cfu/ml được thêm vào mỗi môi trường LB chứa nano silica nồng độ khác nhau. Tiến hành nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C . Cứ sau bốn giờ, lấy 100 μl môi trường pha

loãng trong ống đưa lên trên bề mặt các đĩa thạch bằng que thủy tinh vô trùng và tiến hành đếm khuẩn lạc trên đĩa ở 37°C bằng kỹ thuật cấy bề mặt.

Kết quả (Hình 4) cho thấy ảnh hưởng của các nồng độ nano SiO₂ khác nhau đến sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Sự phát triển của vi khuẩn phụ thuộc vào nồng độ nano silica và thời gian. Trong 24h giờ đầu, vi khuẩn phát triển và sinh trưởng bình thường, mật độ vi khuẩn tăng dần tuyến tính theo thời gian. Sau 48h thí nghiệm, mẫu có nồng độ nano SiO₂ (10 µg/ml) thấp nhất trong ba nồng độ thí nghiệm có mật độ vi khuẩn phát triển cao nhất ($1,1 \times 10^9$ cfu/ml) trong tất cả các mẫu thử, trong khi đó vi khuẩn ở mẫu đối chứng chỉ đạt 6×10^7 cfu/ml. Từ 48h đến 72h, mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm ở tất cả các mẫu thí nghiệm. Trong toàn bộ quá trình thí nghiệm, mật độ vi khuẩn *B. subtilis* GB03 ở mẫu chứa nano SiO₂ (10 µg/ml) luôn đạt giá trị cao nhất so với tất cả các mẫu còn lại. Sự thay đổi của mật độ vi khuẩn theo nồng độ nano silica trong nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả Boroumand và cộng sự (2020). Nghiên cứu của nhóm tác giả nói trên đã cho thấy ảnh hưởng của nồng độ nano silica đối với sự phát triển của chủng vi khuẩn endophyte *Pseudomonas stutzeri*. Theo đó, nghiên cứu đã thử nghiệm ảnh hưởng của nano silica có kích thước hạt đạt 30 nm ở các nồng độ là 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 và 0,1 µg/ml trong môi trường Nutrient Broth (NB) với giá trị mật độ vi khuẩn ban đầu là 10^7 cfu/ml. Kết quả quan sát cho thấy xu hướng tăng mật độ phát triển vi khuẩn *P. stutzeri* ứng với sự tăng lên của nồng độ nano silica theo thời gian trong 48h thử nghiệm, sau 48h mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm. Trong số các nồng độ nano silica thử nghiệm, vi khuẩn *P. stutzeri* phát triển có mật độ cao nhất thu được ở 0,07 µg/ml theo sau đó là 0,05 µg/ml tại thời điểm 48h. Trong khi đó, tại nồng độ nano silica là 0,1 µg/ml lại thấy mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* thấp hơn so với hai nồng độ trên ở mọi thời điểm so sánh. Như vậy, vi khuẩn sẽ phát triển tốt nhất ở một nồng độ silica thích hợp, nồng độ silica quá cao có thể gây ra ức chế vi khuẩn.

Khảo sát ảnh hưởng của nano SiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây dưa lưới

Hạt giống dưa F1 Kim Cô Nương được sản xuất bởi công ty trách nhiệm hữu hạn KNOWN-YOU SEED, Đài Loan. Tuyển chọn hạt (hạt to, mẩy chắc) và đem 30 hạt ngâm trong 20 ml nước cất đối với mẫu đối chứng và 30 hạt trong 20 ml hỗn dịch nano SiO₂-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đối với công thức thử nghiệm ở nhiệt độ

25-30°C trong 2 giờ, ủ rễ cho rễ dài 2-3 mm. Tiến hành khảo sát các chỉ tiêu theo dõi: tỉ lệ và tốc độ nảy mầm, khả năng bám dính vi khuẩn lên rễ cây, sự phát triển của bộ rễ, tăng trưởng chiều cao cây (cm), khả năng đẻ nhánh, thời gian từ trồng đến ra hoa cái đầu tiên (ngày).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chọn phương án ngâm ủ trực tiếp hạt giống cây dưa lưới trong tích hợp nano-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 cho đến khi nảy mầm. Sau đó trồng thủy canh có tưới dung dịch tích hợp nano-vi khuẩn để tiến hành chụp SEM và quan sát sự phát triển của bộ rễ (Hình 5). Sau khi trồng vào bầu đất, chúng tôi nuôi trồng sử dụng phân bón bình thường mà không tiếp thêm tích hợp và quan sát sự sinh trưởng của cây. Qua quan sát các mẫu thí nghiệm xử lý hạt giống với nano silica-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 ta thấy sau 48h, tỉ lệ và tốc độ nảy mầm ở tất cả các mẫu thử nghiệm có tỉ lệ nảy mầm đạt 100% trên tổng số hạt được thử nghiệm tương tự như các mẫu đối chứng âm. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy silica hay nano silica có tác dụng kích thích sự nảy mầm của hạt giống do tác dụng sinh hóa có thể làm giảm sản xuất axit abisicic và tăng mức gibberellin. Li và Ma (2002) đã báo cáo rằng khi hàm lượng silica trong đất có nồng độ trong khoảng 55 đến 203 mg/kg, hoạt tính của protease, lipase trong hạt và tốc độ hô hấp tăng lên thúc đẩy quá trình nảy mầm của hạt cây dưa chuột. Sức sống của hạt giống cũng được tăng lên đáng kể. Trong nghiên cứu năm 2015 của Rathinam và cộng sự, tỷ lệ nảy mầm của hạt ngô cao hơn (từ 2-11%) khi chúng được trồng trong đất có trộn với vật liệu nano silica ở nồng độ 100 đến 400 µg/g so với mẫu đối chứng và mẫu đất trộn với silica thông thường.

Khi tiến hành nghiên cứu các mẫu rễ cây dưa lưới được xử lý với nano silica-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trong điều kiện nồng độ nano silica 10 µg/mL và ủ hạt nảy mầm, chúng tôi đã quan sát được hiện tượng các phân tử nano SiO₂ bám vào bề mặt vi khuẩn và sự xâm nhập của vi khuẩn vào rễ cây (Hình 5B).

Hình 5A cho ta thấy nano silica bám lên bề mặt của vi khuẩn từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho rễ cây hấp thu được silica trong quá trình vi khuẩn xâm nhập vào sâu qua vỏ rễ (Hình 5B). Quan sát các mẫu ảnh SEM mẫu rễ thí nghiệm có thể thấy tích hợp nano-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 bám trên bộ rễ từ đó có những tác động tới hoạt động của bộ rễ, ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Qua theo dõi, mẫu cây dưa lưới được thử nghiệm với nano silica-vi

khuẩn *B. subtilis* GB03 có số lượng rễ và chiều dài rễ nhỉnh hơn so với công thức đối chứng (Hình 6A).

Kết quả theo dõi sự phát triển chiều cao của các mẫu dưa lưới được thể hiện ở bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Chiều cao trung bình của các mẫu cây dưa lưới theo thời gian

Đơn vị: cm

Công thức	Số ngày sau trồng (ngày)		
	14	21	28
Thí nghiệm	22,9	63,6	107,0
Đối chứng	21,5	60,7	101,2

Bảng 4 cho thấy tốc độ tăng trưởng chiều dài thân chính ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau là khác nhau. Giai đoạn 14 ngày sau trồng, các mẫu dưa thí nghiệm có tốc độ tăng trưởng chiều dài thân chính chậm do cây dưa phải trải qua quá trình hồi xanh bén rễ 2-5 ngày, khả năng hút nước và dinh dưỡng hạn chế. Ở giai đoạn tiếp theo từ 14-21 ngày sau trồng, sự tăng trưởng của cây đặc biệt là sự kéo dài của các lông tăng nhanh rõ rệt. Lúc này cây vừa sinh trưởng sinh dưỡng vừa sinh trưởng sinh thực nên cần tác động các biện pháp kỹ thuật hợp lý để cây phát triển chiều dài, khối lượng thân lá tối ưu nhằm tích lũy vật chất để cây ra hoa, kết quả. Giai đoạn sau trồng từ 21-28 ngày, tốc độ tăng trưởng chiều dài thân của các giống dưa lưới tăng rất mạnh, trong đó ở công thức chứa nano silica có chiều dài thân chính trung bình đạt (107,0 cm) cao hơn khá rõ rệt với công thức đối chứng (101,2 cm) (Hình 6B). Kết quả này cho thấy các cây thử nghiệm phát triển bình thường và tốt hơn mẫu đối chứng.

Qua quan sát các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây dưa lưới được xử lý với nano SiO₂-vi khuẩn *B. subtilis* GB03, chúng tôi thấy rằng sau 3 ngày, tất cả các hạt trong công thức thí nghiệm đều nảy mầm. Thời gian từ gieo đến trồng phản ánh khả năng sinh trưởng của cây con. Cây con đem trồng đạt yêu cầu có từ 1-2 lá thật, cây khỏe, không sâu bệnh. Các công thức tham gia thí nghiệm ở giai đoạn cây con đều sinh trưởng tốt, sau 12 ngày đều đạt 1-2 lá thật, đáp ứng các yêu cầu xuất vườn. Cây con trước khi trồng ra ruộng sản xuất ở các công thức đã có sự khác biệt khá rõ rệt, ở công thức chứa nano SiO₂ cây phát triển tốt khỏe so với mẫu đối chứng. Theo dõi sự phân nhánh của cây dưa lưới, chúng tôi thu thấy rằng vào

giai đoạn từ ngày 14 đến ngày 21 cây chưa có sự phân nhánh ở tất cả các mẫu thử nghiệm, lúc này cây đang tập trung phát triển chiều dài thân chính. Từ ngày 21 đến ngày 28, cây bắt đầu phát triển nhánh để chuyển sang giai đoạn ra hoa, tạo quả, lúc này cây dùng công thức chứa nano silica có số nhánh trung bình là 2,0 trong khi đó cây đối chứng vẫn chưa phân nhánh. Ở công thức chứa nano SiO_2 bắt đầu ra hoa cái sau 34 ngày nhanh hơn 1 ngày so với công thức đối chứng ra hoa vào ngày thứ 35 ngày.

Ví dụ 4: Thử nghiệm về khả năng đối kháng nấm của chế phẩm nano TiO_2 -vi khuẩn nội ký sinh thực vật

Hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 và chủng *Paenibacillus polymyxa* IN937a được lưu trữ tại Viện Vật liệu Sinh học Jeonju (Hàn Quốc) dưới dạng sinh khối khô, tiến hành hoạt hóa trên môi trường nuôi cấy lỏng (TSB), nuôi lắc 150v/p ở nhiệt độ 35-37°C trong 24h, sau đó lấy dịch nuôi cấy chuyển sang môi trường thạch bằng phương pháp cấy rìa giữ trong tủ ẩm 37°C trong 24h để xác định hình thái khuẩn lạc, sau đó tiến hành nhân giống dịch thể, bằng cách chọn những khuẩn lạc tròn đẹp, chuẩn hình thái đặc điểm vi khuẩn nhất cấy truyền sang môi trường TSB, nuôi trên máy lắc 150 vòng/phút ở 35 °C đến 37°C trong 24h. Sau 24h, xác định giá trị OD trong các bình nhân giống dịch thể, pha loãng dịch cho đến khi đạt giá trị OD=0.5. Tiếp giống 10% của từng chủng vi khuẩn sang môi trường MT có chứa nano TiO_2 nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ (nano TiO_2 -vi khuẩn nội ký sinh thực vật), nuôi trên máy lắc 150 v/p ở 35-37°C trong 24h.

Kiểm tra đối kháng giữa hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 và chủng *Paenibacillus polymyxa* IN937a với vật liệu nano và sự phát triển của vi khuẩn trên môi trường PDA bằng phương pháp cấy kép cùng lúc 2 chủng vi khuẩn trên đĩa petri chứa môi trường PDA, có điểm tiếp xúc, sau đó giữ trong tủ ẩm ở 37°C từ 2-3 ngày theo dõi sự phát triển. Nếu tại điểm tiếp xúc không có vùng ức chế nghĩa là các chủng này phát triển cùng nhau trên một môi trường, nếu có sự ức chế thì ngược lại. Kết quả cho thấy, 2 chủng vi khuẩn GB03 và IN937a phát triển tốt, đồng nhất với nhau, không có sự đối kháng. Kết hợp với kết quả lựa chọn nồng độ nano trước đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu chế phẩm vi sinh vật nano TiO_2 -vi khuẩn nội ký sinh thực vật bởi 2 chủng vi khuẩn GB03 và IN937a với vật liệu nano TiO_2 ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ nhằm kích thích sinh trưởng thực vật đồng thời kháng một số

chúng nấm gây bệnh cho thực vật đặc biệt phòng trừ bệnh giả sương trên cây dưa lưới.

Khảo sát khả năng đối kháng nấm *in vivo* của chế phẩm nano TiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật

Khả năng kháng nấm *Sphaerotheca fuliginea* gây bệnh phấn trắng của chế phẩm Nano-PGPR trong phòng thí nghiệm bằng cách pha loãng dung dịch nano TiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật đạt nồng độ 10⁷ cfu/ml, phun ướt đầm lên bề mặt lá bị bệnh phấn trắng. Đối chứng âm chỉ phun bằng nước lã, đối chứng dương được phun bằng thuốc trừ nấm hóa học benlat 0,01%. Mỗi công thức tiến hành với 3 lần lặp lại, phun thuốc một lần/ngày.

Tiến hành lấy mẫu bệnh phẩm bị phấn trắng trên ruộng trồng dưa lưới. Lấy cả phần cuống lá đưa về phòng thí nghiệm, giữ lá dưa tươi và tiến hành thực nghiệm.

Từ kết quả theo dõi đối kháng nấm *Sphaerotheca fuliginea* gây bệnh phấn trắng của nano TiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật lên lá trong phòng thí nghiệm ta có thể thấy, hiệu quả ức chế nấm là rất tốt, hiệu quả tăng rõ rệt sau khi phun 01 ngày và 02 ngày (Hình 7B, 7C). Đến ngày thứ 3, ở công thức xử lý các bào tử nấm gây bệnh mốc sương giảm rõ rệt, không còn những mảng nấm trắng (Hình 7D). Ở công thức đối chứng, được phun bằng nước lã các mảng nấm vẫn còn nguyên như lúc ban đầu (Hình 7A).

Khảo sát khả năng đối kháng nấm *in-vitro* của chế phẩm nano TiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật

5 chủng nấm *Botrytis cineria* (Bệnh mốc xám), *Phytophthora infestans* (Bệnh mốc sương khoai tây), *Fusarium oxysporum* (Bệnh héo rũ chết vàng), *Sclerotinia sclerotiniun* (Bệnh thối hạch bắp cải), *Colletotrichum orbiculare* (Bệnh thán thư) được phân lập lần lượt tương ứng từ trái non của quả ớt, khoai tây, củ khoai tây, cây bắp cải, quả dưa chuột, được cung cấp bởi viện Bảo vệ Thực vật, được giữ ở 4°C bằng ống thạch nghiêng. Tiến hành hoạt hóa các chủng nấm trên môi trường PDA ở nhiệt độ 25 °C đến 28°C từ 2 đến 5 ngày để xác định đặc điểm hình thái hệ sợi nấm và bào tử nấm, đảm bảo không bị lẫn tạp và giống với chủng gốc.

Khả năng kháng các nấm trong điều kiện *in-vitro* của nano TiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật được đánh giá bằng phương pháp cấy kép: 1 đĩa sợi nấm có bán kính khoảng 4 mm được cấy vào giữa đĩa môi trường PDA (Potato Dextrose Agar), ủ 25-28°C trong 1-4 ngày (tùy vào từng chủng nấm tham gia thí nghiệm). Dùng khoan nút chai vô trùng khoan các khối thạch có đường kính 8mm, sau đó lấy 100 µL dịch tăng sinh của nano-vi khuẩn nội ký sinh thực vật cho vào các lỗ khoan, kiểm tra tính đối kháng nấm (mật số 10⁶ CFU/mL) cách tản nấm 3cm. Các đĩa cấy kép này tiếp tục được ủ ở nhiệt độ từ 28-30°C trong 5-7 ngày. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần với từng chủng nấm. Sau mỗi 2 ngày, quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính tỉ lệ ức chế sự phát triển của nấm bởi vi khuẩn theo công thức:

$$I = \frac{R - r}{R} \times 100$$

Trong đó:

I: tỉ lệ ức chế sự phát triển của nấm bởi vi khuẩn

R: bán kính của hệ sợi nấm trên môi trường trong đĩa đối chứng (mm)

r: bán kính của hệ sợi nấm trong đĩa có chủng vi khuẩn (mm)

Các kết quả được thể hiện ở bảng 5:

Bảng 5. Tỷ lệ ức chế nấm (%) của nano TiO₂-vi khuẩn nội ký sinh thực vật

STT	Chủng nấm	R-r (mm)			Tỷ lệ ức chế nấm (%)		
		2 ngày	4 ngày	6 ngày	2 ngày	4 ngày	6 ngày
1	<i>Botrytis cineria</i>	3,97	17,7	23,84	25,16	47,37	51,85
2	<i>Phytophthora infestans</i>	8,37	17,27	44,1	35,45	46,84	71,24
3	<i>Fusarium oxysporium</i>	8,9	25,73	55,7	25,82	49,11	64,57
4	<i>Sclerotinia sclerotiniun</i>	23	58,76		46,25	63,06	
5	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	2,66	15,34	34,1	14,31	41,14	65,24

Kết quả thí nghiệm cho thấy, tỷ lệ kháng nấm của nano TiO₂- vi khuẩn nội ký sinh thực vật cho hiệu quả tương đối tốt, kết quả ức chế (IC₅₀) đạt 50% với tất cả các chủng nấm chỉ sau 4 ngày thử nghiệm (Bảng 5). Khả năng ức chế nấm

Phytophthora infestans của nano- vi khuẩn nội ký sinh thực vật là tốt nhất, đạt 71,24% sau 6 ngày và ở thời điểm này bán kính của hệ sợi nấm trong các đĩa cấy kép hầu như không tăng mà có xu hướng giảm xuống do khuẩn ti nấm vùng tiếp giáp với khuẩn lạc vi khuẩn bị chết đi (Hình 8). Khả năng ức chế nấm *Colletotrichum orbiculare* khá tốt nhưng tương đối chậm (Hình 9). Từ kết quả nghiên cứu, có thể chọn chế phẩm nano TiO_2 - vi khuẩn nội ký sinh thực vật là sản phẩm tối ưu để kháng một số nấm bệnh như *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum orbiculare*,...

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Như đã mô tả ở trên, chế phẩm tích hợp nano-vi khuẩn nội ký sinh thực vật theo giải pháp là chế phẩm có khả năng giúp cho quá trình chuyển hóa và hấp thụ phân bón của cây diễn ra nhanh chóng và hiệu quả giúp giảm lượng phân bón và thuốc tăng trưởng thực vật. Ngoài ra, chế phẩm này có hiệu quả trong phòng và điều trị các bệnh cây trồng do nấm và các vi sinh vật gây hại. Cụ thể, Sự có mặt của hạt nano giúp vi khuẩn bám dính và xâm nhập vào bề mặt rễ cây hiệu quả hơn. Bề mặt tích điện của hạt nano sẽ kết dính các tế bào vi khuẩn tạo thành cụm và cũng đồng thời bám vào bề mặt rễ cây trồng. Đồng thời khi vi khuẩn nội ký sinh thực vật (Endophyt) phát triển mạnh, thì cây trồng sẽ phải tiết ra nhiều hoạt chất phytoalexin (PA) hơn, đây là hoạt chất miễn dịch tự nhiên có trong cây. Hoạt chất này sẽ giúp cây tăng thêm khả năng chống chịu khi gặp những điều kiện bất lợi từ môi trường giúp người nông dân giảm đi việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trong quá trình chăm sóc cây.

Giải pháp đưa ra cho phép khai thác hiệu quả nguồn VSV có ích, phù hợp với điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng, sử dụng nguồn nguyên liệu sẵn có trong nước, hạn chế nhập khẩu VSV ngoại lai. Chế phẩm tạo ra theo giải pháp có thể được sử dụng để thay thế các thuốc có nguồn gốc hóa học nhằm giảm thiểu ô nhiễm môi trường, tồn dư thuốc trong sản phẩm và phần nào đó cải tạo môi trường đất.

Ngoài ra, chế phẩm tích hợp nano-vi khuẩn nội ký sinh thực vật tạo ra theo giải pháp có thể mở rộng kết hợp với thuốc bảo vệ thực vật thảo mộc chứa anthraquinon có hiệu lực giúp tăng hiệu quả trị bệnh và tính chống chịu cho cây. Đây là điểm độc đáo trong sản phẩm của giải pháp.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Các sản phẩm tạo ra ở dạng tích hợp nano-vi khuẩn nội ký sinh thực vật là sản phẩm khoa học công nghệ cao sẽ góp phần bổ sung vào sự đa dạng của các sản phẩm phân bón trên thị trường, giá trị của sản phẩm là tạo ra nguồn dinh dưỡng sạch cho cây trồng, giúp cây trồng khỏe mạnh và kháng bệnh. Khi kết hợp với thuốc bảo vệ thực vật thảo mộc sẽ tạo ra bộ sản phẩm phòng trừ vi sinh vật gây bệnh và đồng thời cung cấp dinh dưỡng cho cây. Công nghệ tạo ra từ đề tài nghiên cứu sẽ được chuyển giao cho doanh nghiệp sản xuất phân bón và thuốc bảo vệ thực vật trên địa bàn thành phố hoặc lân cận.

Hiện nay nông dân ở nhiều vùng trồng dưa lưới đang mong đợi các tiến bộ KHCN trong phòng bệnh do nấm và vi khuẩn xâm nhiễm qua đất và trên lá để nhằm nâng cao chất lượng sản phẩm, tăng sức cạnh tranh của sản phẩm trên thị trường trong nước và phục vụ xuất khẩu. Đồng thời các địa phương, các doanh nghiệp tại thành phố Hồ Chí Minh và nông dân cũng đang mong đợi có được bộ thuốc và phân bón sinh học, có chất lượng để nâng cao chất lượng cho sản phẩm của họ để thúc đẩy thị trường, cạnh tranh lành mạnh, tạo và bảo vệ thương hiệu. Vì vậy, trước mắt chế phẩm tạo ra theo giải pháp sẽ được ứng dụng trên địa bàn các vùng nông nghiệp công nghệ cao tại Thành phố Hồ Chí Minh. Sau đó, sẽ tiếp tục triển khai rộng ở các khu vực lân cận và lan rộng ra toàn quốc, có thể xuất khẩu sản phẩm sang các thị trường nông nghiệp hữu cơ và đòi hỏi chất lượng sản phẩm tốt.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm kháng nấm, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị dung dịch nano TiO_2 nồng độ 100 ppm bằng phương pháp sol-gel kết hợp vi sóng bằng cách

- định lượng các thành phần: Titanium Isopropoxit (TTIP): $\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$, Polyethylen glycol 400 (PEG 400), H_2O và etanol,

- hòa tan $\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$ trong dung môi etanol theo tỉ lệ 12g/50ml (khối lượng/thể tích) thu được dung dịch A,

- hòa tan nước trong dung môi etanol theo tỉ lệ 2ml/50ml (thể tích/thể tích) thu được dung dịch B,

- hòa tan polyethylen glycol 400 trong etanol theo tỉ lệ 100ml/400ml (thể tích/thể tích) thu được dung dịch C,

- nạp dung dịch C vào bình phản ứng, sau đó nạp từ từ đồng thời dung dịch A và dung dịch B vào bình phản ứng với tỉ lệ 50ml/52ml/500ml (thể tích dung dịch A/thể tích dung dịch B/thể tích dung dịch C), phân tán hỗn hợp có trong bình này bằng siêu âm và duy trì ở 80°C trong thời gian 3 giờ,

- nạp từ từ dung môi etanol trong quá trình siêu âm để đảm bảo thể tích dung dịch không đổi do quá trình bay hơi, sau đó ngừng nạp dung môi etanol và tiếp tục tại nhiệt độ 80°C để loại bỏ hết etanol trong bình phản ứng,

- khuấy đều hỗn hợp này trong thời gian 15 giờ, sau đó làm nguội dung dịch này đến nhiệt độ trong phòng;

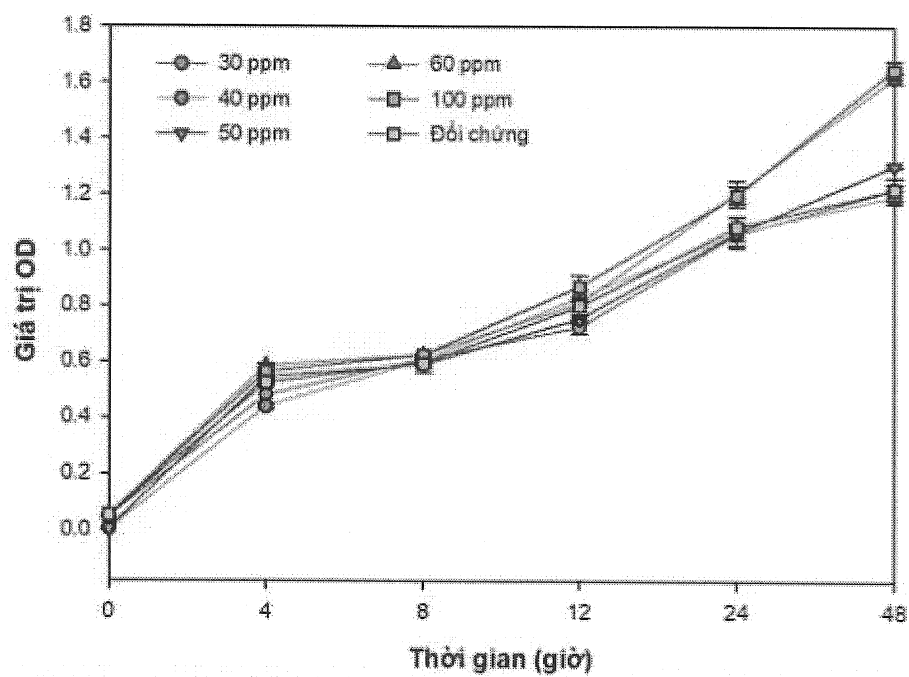
b) chuẩn bị dung dịch vi khuẩn có giá trị mật độ quang (OD) 0,5 bằng cách

- định lượng các thành phần tạo môi trường nuôi cấy lỏng Luria-Bertani (LB) để hoạt hóa vi khuẩn: pepton, cao nấm men và NaCl,

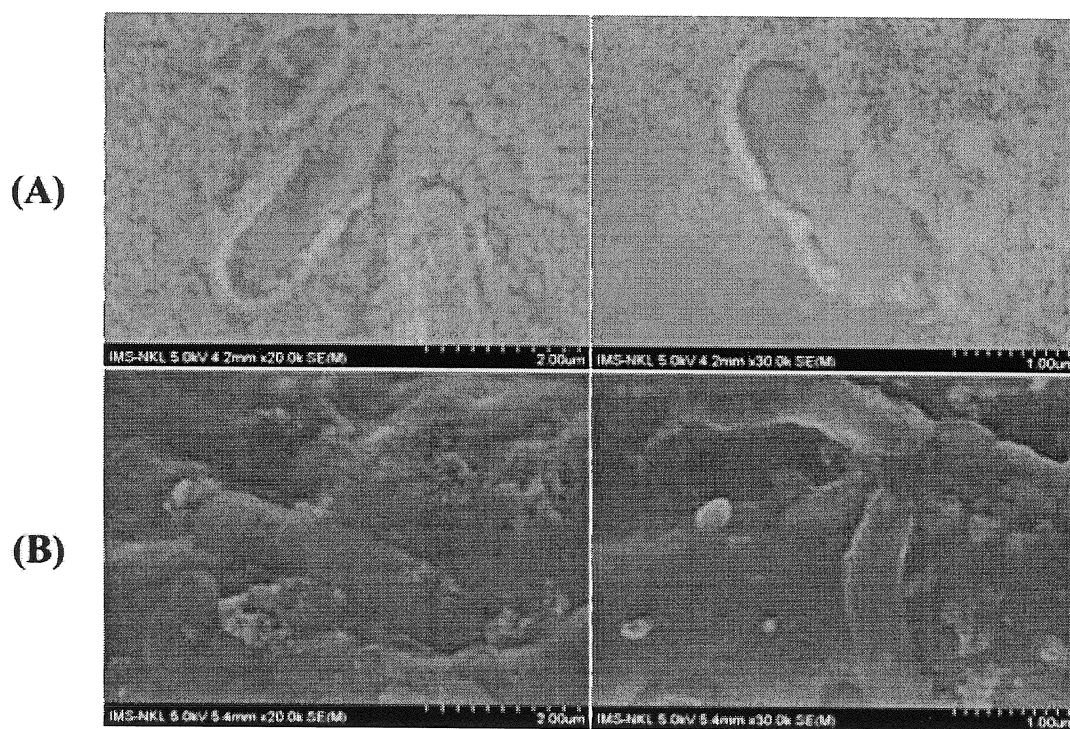
- hoạt hóa chủng vi khuẩn *B. Subtilis* trong môi trường nuôi cấy lỏng LB với điều kiện lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng từ 35°C đến 37°C trong vòng 24 giờ thu được dung dịch nuôi cấy D,

- nạp dịch nuôi cấy D vào bình môi trường nuôi cấy lỏng LB để nhân giống dịch thể ở nhiệt độ khoảng từ 35°C đến 37°C trong 24 giờ, thu được dịch nuôi E,

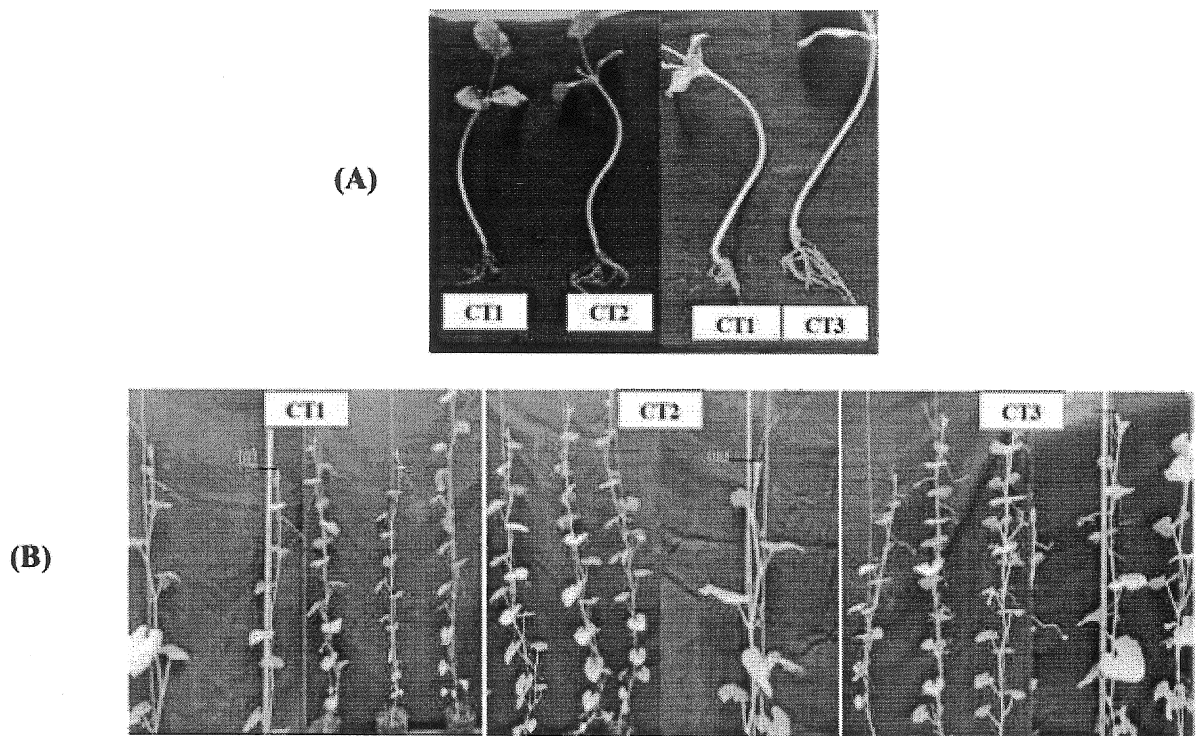
- pha loãng dịch nuôi E bằng môi trường nuôi cấy lỏng LB để giá trị mật độ quang (OD) đạt 0,5 thu được giống dịch thể F,
 - nạp giống dịch thể F vào bình lên men với tỉ lệ 1/10 (thể tích/thể tích),
 - tiến hành lắc bình lên men 150 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng từ 35 °C đến 37 °C trong 24 giờ thu được dịch nuôi cấy G;
- c) phối trộn dung dịch nano TiO₂ và dung dịch vi khuẩn để thu chế phẩm kháng nấm bằng cách
- định lượng các thành phần: dung dịch nano TiO₂ và dung dịch vi khuẩn *B. Subtilis* được nuôi cấy,
 - pha loãng dung dịch chứa nano TiO₂ bằng nước thu được dung dịch H có nồng độ từ 30 đến 100 ppm,
 - nạp dung dịch H vào bình lên men,
 - nạp từ từ dung dịch nuôi cấy vi khuẩn G vào bình lên men trên theo tỉ lệ nằm trong khoảng từ 50ml/ 5ml đến 167ml/5ml (thể tích H/thể tích G),
 - tiến hành lắc bình lên men trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ và ở nhiệt độ từ 35 °C đến 37°C thu được sản phẩm dạng lỏng là chế phẩm kháng nấm, trong đó nồng độ TiO₂ nằm trong khoảng từ 30 µg/ml đến 100 µg/ml; vi khuẩn có giá trị mật độ quang (OD) bằng 0,5.



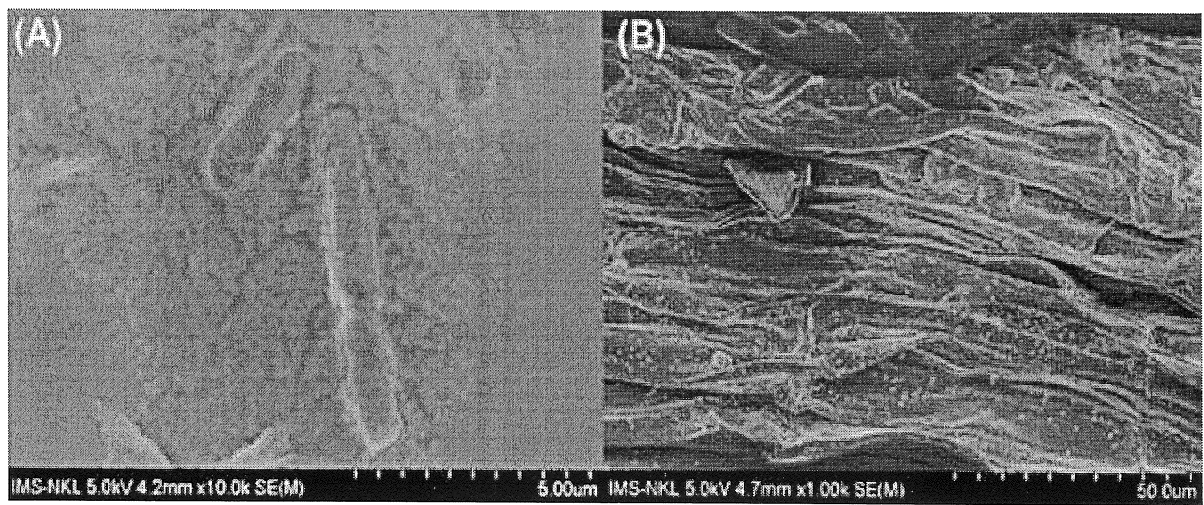
Hình 1



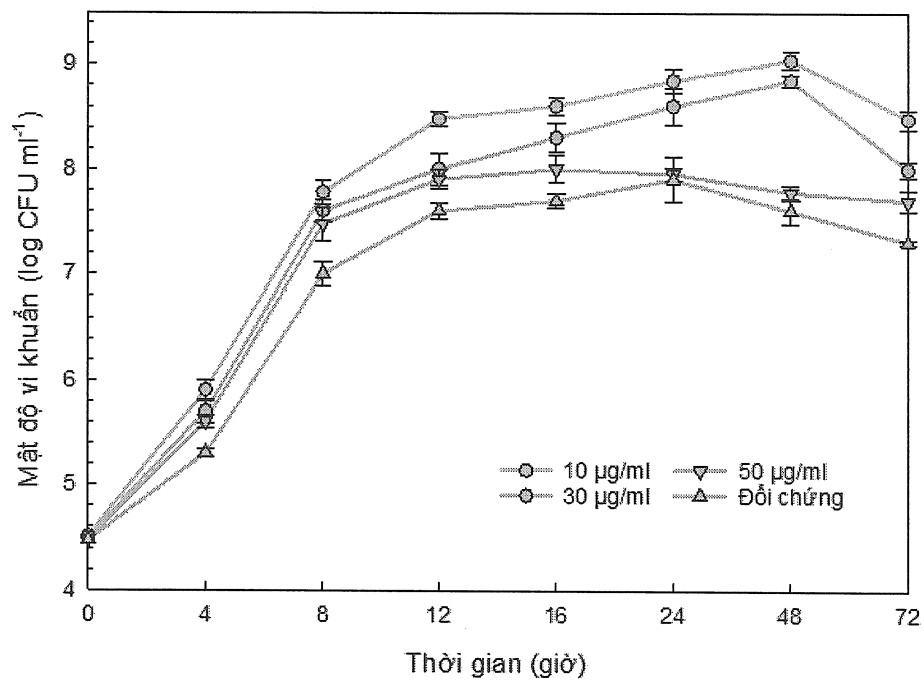
Hình 2



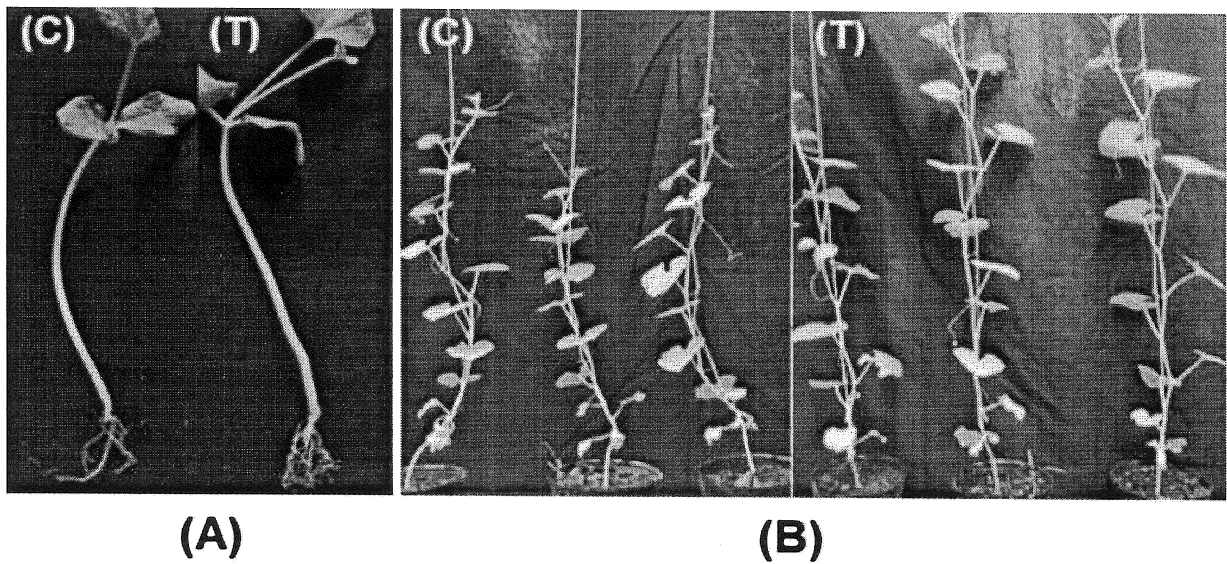
Hình 3



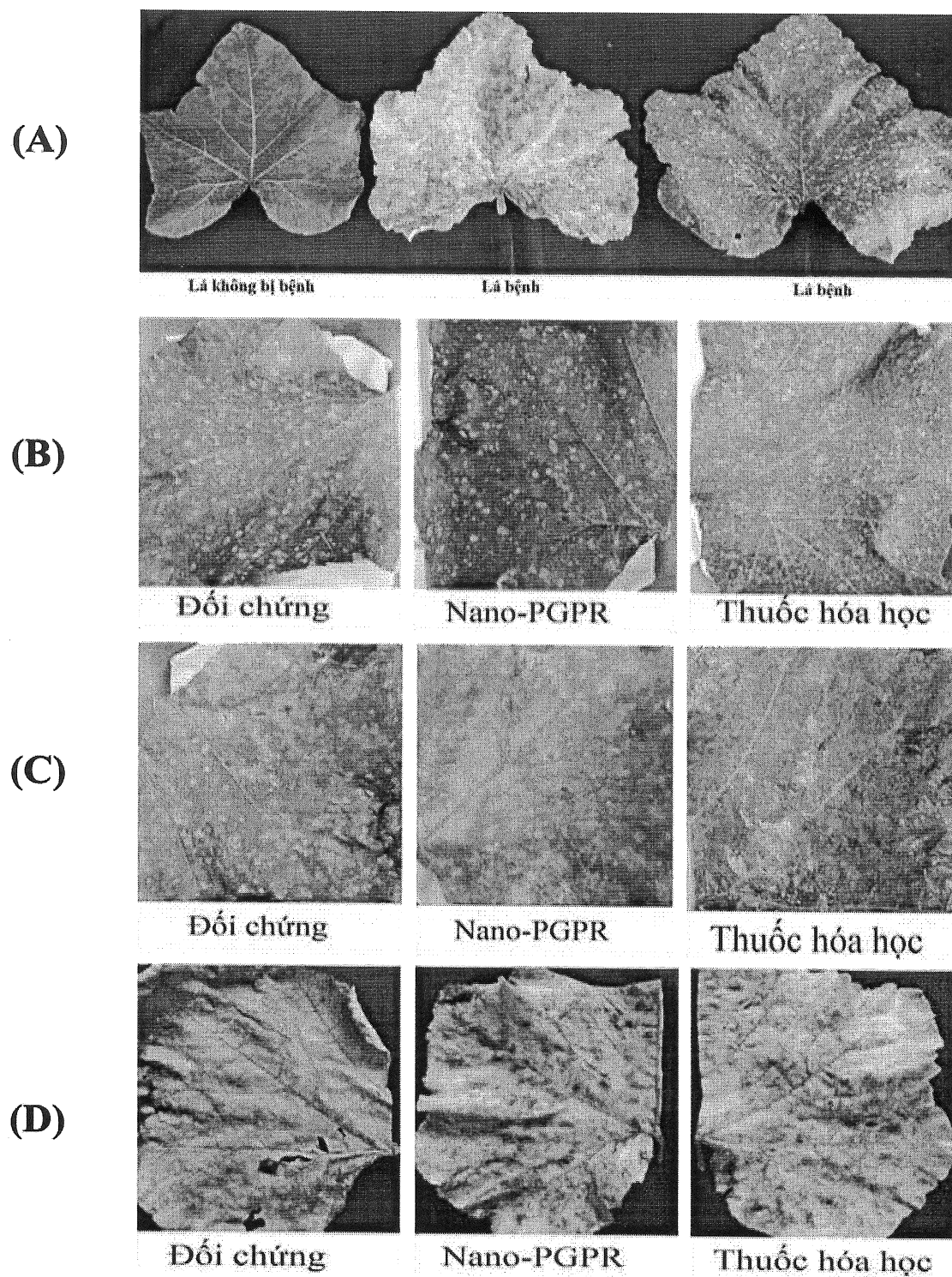
Hình 4



Hình 5

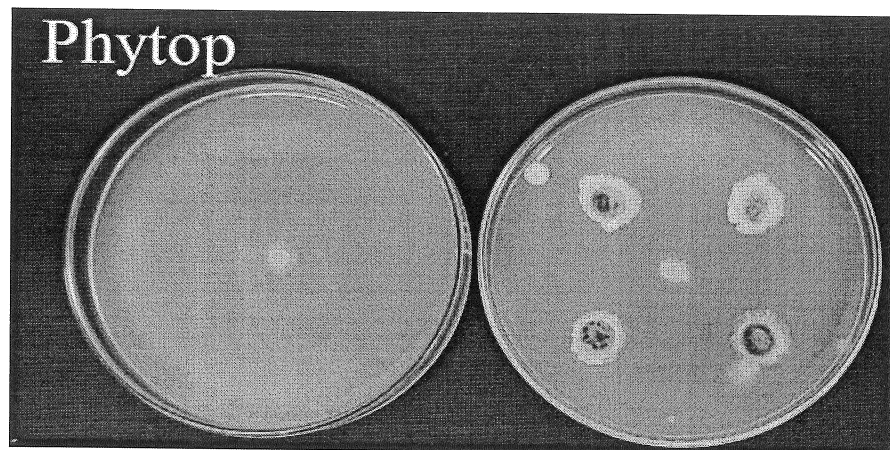


Hình 6



Hình 7

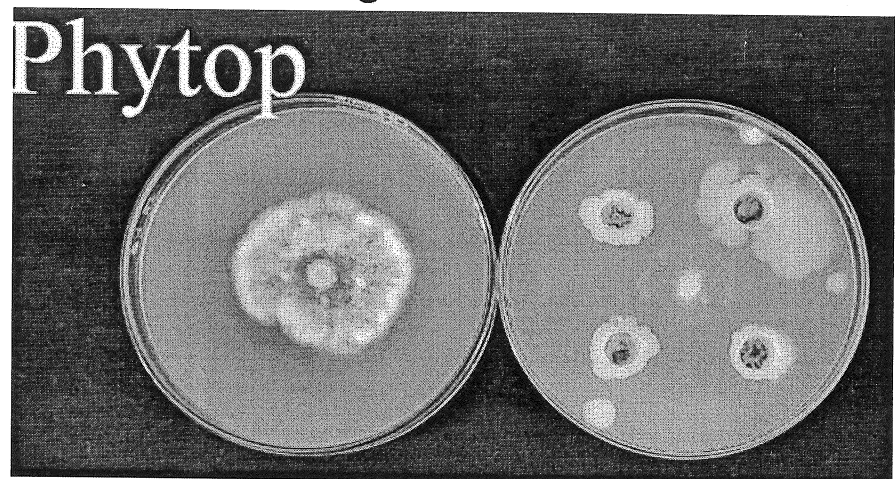
(A)



Đối chứng

Nano-PGPR

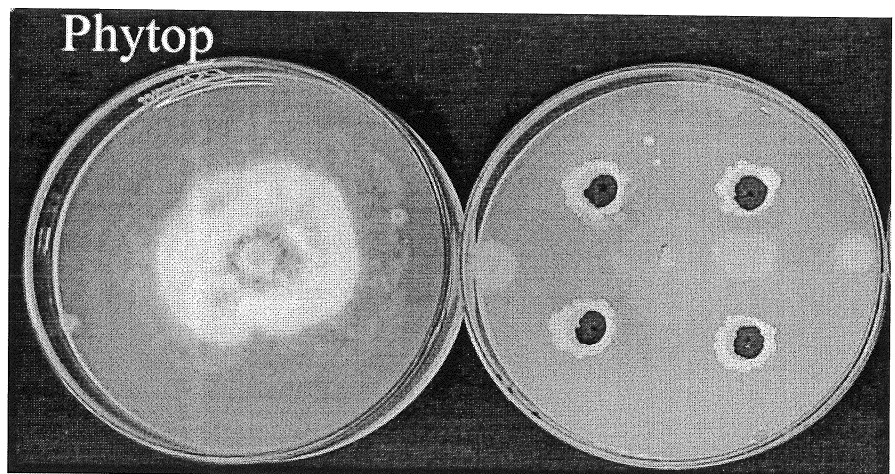
(B)



Đối chứng

Nano-PGPR

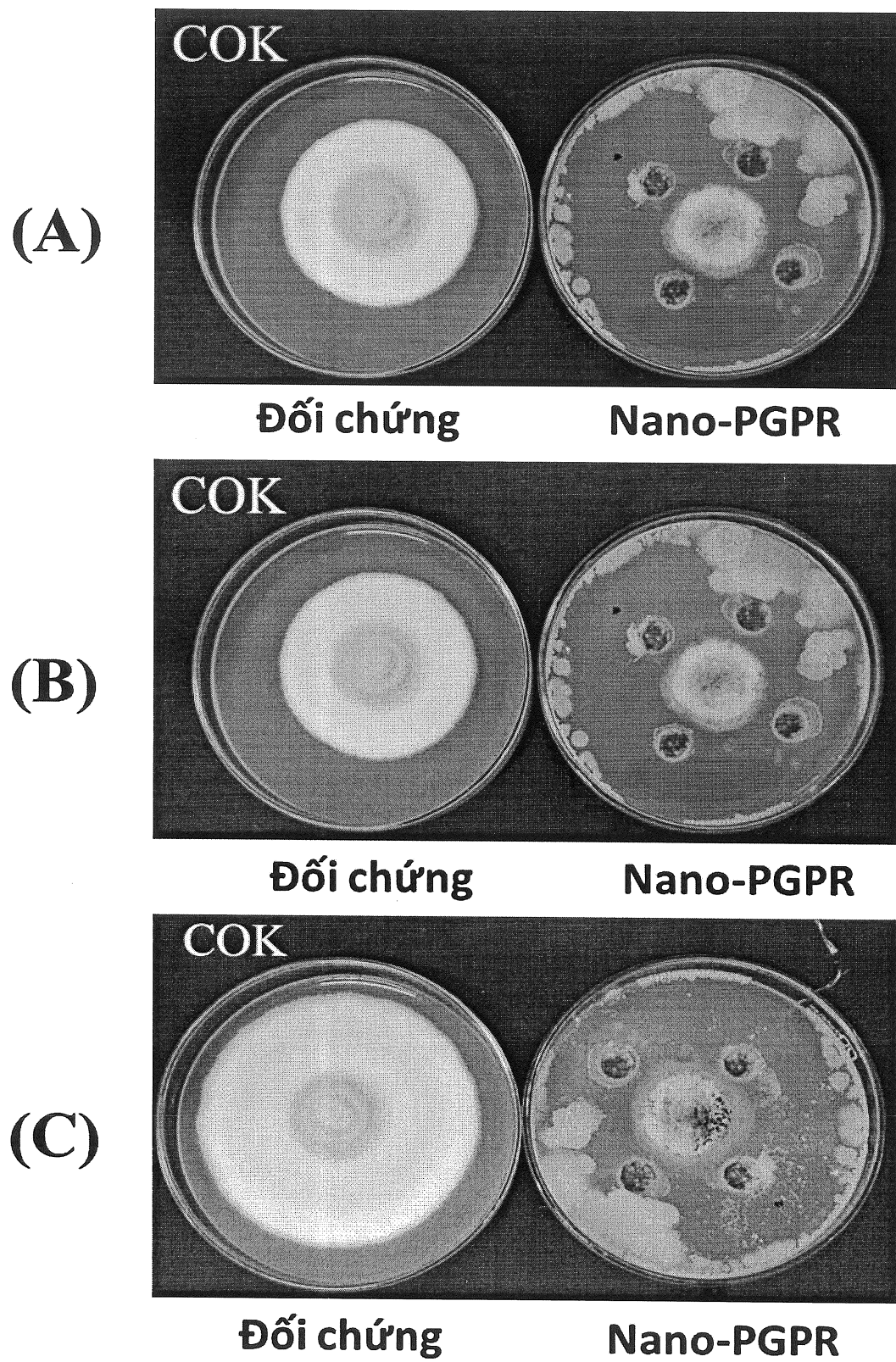
(C)



Đối chứng

Nano-PGPR

Hình 8



Hình 9