



(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)



2-0003410

(51) **C12N 1/20; A01P 3/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00297

(22) 15/07/2021

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/10/2021 403

(73) Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
Nhà E2, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Hiếu Thu (VN); Nguyễn Thị Vân (VN); Nguyễn Thị Mỹ Lệ (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC CHỨA CHỦNG XẠ KHUẨN
STREPTOMYCES GRISEUS VTCC 41724 ỨNG DỤNG TRONG KIỂM SOÁT BỆNH
THỐI THÂN/GỐC LÚA DO DICKEYA ZEA

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 ứng dụng trong kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do *Dickeya zeae*. Chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 thu được từ quy trình theo sáng chế có mật số tế bào $\geq 5 \times 10^8$ CFU/g và hoạt tính kháng *Dz* ổn định (đường kính vòng kháng khuẩn ≥ 10 mm). Chế phẩm đạt hiệu quả kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do *Dickeya zeae* $> 70\%$ ở điều kiện nhà lưới, có tiềm năng triển khai ứng dụng thực tế phục vụ canh tác lúa hữu cơ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học vi sinh vật. Cụ thể, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 ứng dụng trong kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do *Dickeya zeae*. Chủng VTC 41724 có khả năng kháng tốt đối với vi khuẩn *Dickeya zeae* (Dz) gây bệnh thối gốc lúa và một số loài vi khuẩn và nấm gây bệnh khác trên cây trồng. Chế phẩm thu được từ quy trình này (Chế phẩm SGB) có mật số vi sinh vật và hoạt tính kháng Dz ổn định ở điều kiện bảo quản phù hợp, đạt hiệu quả kiểm soát bệnh > 70% trong điều kiện nhà lưới, có tiềm năng triển khai ứng dụng trong sản xuất gạo hữu cơ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chi *Dickeya* thuộc họ vi khuẩn *Enterobacteriaceae* được ghi nhận có khả năng gây bệnh cho 24 loài thực vật hai lá mầm và 22 loài một lá mầm (Hauben *et al.*, 1998; Toth *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2020). *Dickeya zeae* (tên gọi trước đây là *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*) được xác định là nguyên nhân gây bệnh thối gốc lúa, thối thân ngô, thối nhũn chuối, dứa và cây cảnh ở các vùng khác nhau trên thế giới, gây thiệt hại lớn về kinh tế cho các lĩnh vực sản xuất liên quan (Pu *et al.*, 2012; Bertani *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018). Bệnh thối gốc lúa đe dọa nhiều quốc gia, làm giảm từ 10% đến 30%, thậm chí > 60% năng suất ở một số vùng trồng lúa ở Trung Quốc (Li *et al.*, 2020), được ghi nhận ở mức dịch bệnh ở một số nước Đông Nam Á và Châu Âu (Bertani *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2018). Bên cạnh đó, *D. zeae* còn có khả năng gây bệnh ở nhiều loài thực vật khác, bao gồm: cần tây, xả lách xoăn, lô hội, đậu xanh, hành, ổi, cà chua, cà tím... (Aeny *et al.*, 2020).

Bệnh thối gốc do các loài vi khuẩn *Dickeya* thường được kiểm soát nhờ các thuốc hoá học như các chất tẩy kết hợp kháng sinh (streptomycin, terramycin, streptocycline) và thuốc diệt nấm chứa đồng (Thind *et al.*, 1984). Tuy nhiên, lạm dụng thuốc hoá học là nguyên nhân dẫn đến hủy hoại môi trường, thoái hóa đất và gây tác động xấu đến sức khỏe con người. Kiểm soát sinh học các bệnh hại cây trồng là hướng

tiếp cận được quan tâm theo xu hướng phát triển nông nghiệp hữu cơ bền vững (O'Brien *et al.*, 2017).

Vi sinh vật có khả năng đối kháng *Dickeya zeae* (Dz) chưa được công bố nhiều. Năm 2009, Jafra và cs. đã công bố hai chủng vi khuẩn *Rahnella aquatilis* và *Erwinia persicinus* có khả năng kiểm soát tốt bệnh thối nhũn củ cây hoa lan dạ hương do Dz gây ra (Jafra *et al.*, 2009). Một số chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. và *Pseudomonas* spp. phân lập từ vùng rễ và mô thực vật cũng được báo cáo có khả năng ức chế Dz (Li *et al.*, 2020). Năm 2018, Aeny và cs. đã phân lập xạ khuẩn từ thân rễ cây dứa và phát hiện 34/45 chủng có hoạt tính ức chế Dz, trong đó hai chủng có khả năng đối kháng tốt nhất là *Streptomyces parvulus* và *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* (Aeny *et al.*, 2018).

Tại Việt Nam, bệnh thối rễ/thối gốc do vi khuẩn Dz gây ra là một bệnh nghiêm trọng mới được chú ý gần đây ở nhiều loại cây trồng. Trên cây lúa, bệnh được phát hiện đầu tiên ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long như Trà Vinh, An Giang, Vĩnh Long từ năm 2009. Cho đến nay, bệnh đã được phát hiện ở nhiều vùng canh tác, trên nhiều giống lúa như OM 4218, Jasmine 85, OM 1490, IR 50404, đặc biệt trong điều kiện lúa cấy dày và bón thừa đạm. Bệnh thường bắt đầu với triệu chứng lúa bị héo nhưng lá vẫn xanh, bẹ bông nước, sau đó chết vàng từng chồi, nhô lên chồi bị đứt ngay ở gốc, gốc và rễ lúa chuyển màu nâu đen, mùi thối (Trần Hưng Minh và cs., 2016). Thời điểm bệnh lan rộng và gây chết rụi thường vào giai đoạn lúa đẻ nhánh tối đa. Bệnh đặc biệt nguy hiểm khi xảy ra đồng thời với bệnh đạo ôn nhưng không được phát hiện do có biểu hiện bệnh tương tự, dẫn đến nông hộ thường chỉ sử dụng thuốc chống bệnh đạo ôn. Cho đến nay, bệnh được kiểm soát chủ yếu nhờ cải tiến kỹ thuật canh tác, sử dụng vôi bột và các thuốc hoá học diệt vi khuẩn (www.cantho.gov.vn), hoàn toàn chưa có biện pháp đặc hiệu phòng trừ hiệu quả. Một số thuốc hoá học được khuyến cáo sử dụng để phòng trừ bệnh thối gốc lúa như Kasuran, Starner, Sasa, Visen, Fujione, Physan..., tuy nhiên các loại thuốc này không có tính đặc hiệu diệt Dz và hiệu quả kiểm soát bệnh cũng không cao.

Hướng nghiên cứu ứng dụng các tác nhân sinh học như xạ khuẩn, vi khuẩn vùng rễ, thực khuẩn thể v.v. để kiểm soát bệnh thối gốc do các loài *Dickeya* gây ra đang được quan tâm. Năm 2016, Trần Hưng Minh và cs. đã thử nghiệm các dòng thực

khuẩn thể (TKT) để kiểm soát các chủng vi khuẩn *E. chrysanthemi*, và chỉ ra 8 dòng TKT phân bố ở ba tỉnh Cần Thơ, Kiên Giang và Sóc Trăng có khả năng ký sinh và tiêu diệt nhiều chủng *E. chrysanthemi*, trong đó dòng TKT ΦEchKG8b cho đường kính phân giải vi khuẩn cao nhất. Biện pháp kiểm soát bệnh bằng TKT đã có hiệu quả cao khi được thử nghiệm ở điều kiện nhà lưới. Trong nghiên cứu của Trần Vũ Phấn và Phùng Thị Thanh Thảo (2015), một số chủng vi khuẩn *Bacillus* đã được chứng minh có khả năng ức chế vi khuẩn *E. chrysanthemi* gây bệnh thối rễ, kích thước vòng ức chế trong khoảng 7,5 – 8,2 mm. Trong điều kiện nhà lưới, các chủng này có hiệu quả kiểm soát bệnh ngang và cao hơn so với thuốc hoá học Starner 20WP. Các nghiên cứu trên cho thấy tiềm năng ứng dụng của vi sinh vật trong kiểm soát bệnh thối gốc do *Dickeya* spp. gây ra. Tuy nhiên, hiện nay chưa có sản phẩm sinh học nào được sản xuất để phục vụ công tác phòng trừ bệnh này trong nông nghiệp, cụ thể là trong canh tác lúa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ công tác phòng trừ bệnh thối thân/gốc lúa do vi khuẩn *Dickeya zeae* gây ra, trong đó quy trình này sử dụng chủng vi sinh vật được phân lập tại Việt Nam, có tính an toàn cao, giúp tận dụng nguồn tài nguyên vi sinh vật bản địa phong phú.

Chủng vi sinh vật được sử dụng trong quy trình theo sáng chế là chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* được phân lập từ lá mục tại vườn Quốc gia Phong Nha - Kẻ Bàng (Quảng Bình) và hiện được lưu giữ tại Trung tâm nguồn gen vi sinh vật Quốc gia (VTCC) với mã số VTCC 41724. Chủng có khả năng kháng nhiều loài vi khuẩn gây bệnh thực vật bao gồm: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh bạc lá lúa, *Pseudomonas syringae* gây bệnh đốm lá và *Dickeya zeae* (Dz) gây bệnh thối gốc (Phạm Thị Huệ và cs., 2020). Chủng này có nguồn gốc bản địa và nhiều hoạt tính sinh học quý.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 đạt độ ổn định về mật số tế bào và hoạt lực kháng Dz nhằm ứng dụng trong kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do vi khuẩn *Dickeya zeae* gây ra. Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm thu được từ quy trình này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Streptomyces griseus* VTCC 41724 nuôi cấy ở 30°C sau 7 ngày trên các môi trường nuôi cấy khác nhau YS (A), ISP 1 (B), ISP 2 (C), ISP3 (D), ISP 4 (E) và ISP5 (F).

Hình 2 là hình ảnh bào tử của chủng *Streptomyces griseus* VTCC 41724 dưới kính hiển vi có độ phóng đại 1.000× (A) và hình ảnh cấu trúc chuỗi bào tử chụp dưới kính hiển vi điện tử quét có độ phóng đại 5.000× (B).

Hình 3 là hình ảnh kết quả đánh giá hoạt tính kháng các vi sinh vật gây bệnh thực vật của chủng *Streptomyces griseus* VTCC 41724 kháng các loài vi khuẩn gây bệnh thực vật (A) – *Pseudomonas syringae* gây bệnh đốm lá; (B) – *Dickeya zeae* (Dz) gây bệnh thối gốc; (C) – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh bạc lá lúa. (D) – *Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá; (E) – *Phytophthora capsici* gây bệnh thối nhũn gốc; (F) – *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư; (G) *Fusarium proliferatum* gây bệnh thối thân trên cây măng tây.

Hình 4 là hình ảnh kết quả đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy tới sinh trưởng và biểu hiện hoạt tính kháng Dz của chủng *Streptomyces griseus* VTCC 41724. (A) - Ảnh hưởng của các môi trường khác nhau; (B) Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy; (C) Ảnh hưởng của tỷ lệ cấp giống; (D) Ảnh hưởng của chế độ cấp khí và (E) Ảnh hưởng của tốc độ khuấy trong điều kiện lên men chìm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724, đạt độ ổn định về mật số tế bào và hoạt tính kháng Dz để ứng dụng trong kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do vi khuẩn *Dickeya zeae* và chế phẩm thu được từ quy trình này.

Chủng xạ khuẩn VTCC 41724 được cấy rìa 3 pha trên các loại môi trường thạch khác nhau bao gồm: YS, ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 (Bảng 1). Sau 7 ngày nuôi cấy ở 30°C, chủng hình thành khuẩn lạc có màu trắng xám trên môi trường ISP1, ISP2, ISP3 và ISP4, khuẩn lạc có màu trắng ngà trên môi trường YS và ISP5 (Hình 1).

Để quan sát hình thái chuỗi bào tử, một lamên kính được cắm nghiêng 45° lên đĩa YS đã cấy chủng VTCC 41724, ủ đĩa ở 30°C trong 7 – 14 ngày để chủng tạo hệ sợi

và bào tử trên lamên. Quan sát bào tử xạ khuẩn trên lamên dưới vật kính dầu 100× cho thấy chuỗi bào tử chủng 41724 có dạng chuỗi thẳng, bề mặt bào tử nhẵn (Hình 2).

Bảng 1. Thành phần của các loại môi trường nuôi cấy xạ khuẩn (g/L)

TT	Thành phần	YS	ISP1	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5	SKS	2M	301
1	Trypton		5							
2	Cao nấm men	2	3	4					2	5
3	Cao malt			10						
4	Glucose			4				10		1
5	Bột yến mạch				20			10		
6	Bột đậu tương							10	15	
7	Tinh bột	10				10		10	20	20
8	Pepton							5		3
9	Cao thịt									3
10	CaCO ₃					2		3	4	4
11	(NH ₄) ₂ SO ₄					2				
12	K ₂ HPO ₄					1	1			
13	MgSO ₄ .7H ₂ O					1				
14	NaCl					1				
15	Glycerol						10			
16	L-asparagin						1			
17	FeSO ₄ .7H ₂ O				0,001	0,001	0,001			
18	MnCl ₂ .4H ₂ O				0,001	0,001	0,001			
19	ZnSO ₄ .7H ₂ O				0,001	0,001	0,001			
20	Thạch	15	18	18	18	18	18			

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 được hoạt hóa từ ống giữ giống -80°C trên môi trường thạch YS, sau 5 ngày tạo các khuẩn lạc màu trắng ngà, kích thước 1,6 - 1,9 × 1,5 - 1,8 (mm). Chủng có khả năng kháng nhiều loài vi sinh vật gây bệnh thực vật, gồm vi khuẩn (*Pseudomonas syringae* gây bệnh đốm lá, *Dickeya zeae* (Dz) gây bệnh thối gốc, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh bạc lá lúa) và vi nấm (*Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá, *Phytophthora capsici* gây bệnh

thối nhũn gốc, *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư và *Fusarium proliferatum* gây bệnh thối thân trên cây măng tây).

Xác định hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh thực vật của chủng VTCC 41724:

- Chủng xạ khuẩn VTCC 41724 được nuôi cấy trên môi trường thạch YS trong 5 ngày ở 30°C.
- Chuẩn bị dịch nuôi của các chủng vi khuẩn kiểm định bao gồm: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo, gây bệnh bạc lá lúa) (Môi trường PSA: Khoai tây 300 g/L, Na₂HPO₄.12H₂O 2 g/L, Ca(NO₃)₂ 0,5 g/L, pepton 5 g/L, sucroza 15 g/L, agar 15 g/L), *Dickeya zae* (Dz, gây bệnh thối rễ) (Môi trường TSB1/2: trypton 8,5 g/L, soyton 1,5 g/L, glucoza 1,25g/L, NaCl 2,5 g/L) và *Pseudomonas syringae* (Môi trường LB: Trypton 10 g/L, cao nấm men 5 g/L, NaCl 5 g/L).
- Môi trường thạch (phù hợp với từng loại vi khuẩn kiểm định: PSA cho Xoo, TSA1/2 cho Dz, LB cho *P. syringae*) được khử trùng, sau đó để nguội xuống nhiệt độ <50°C rồi bổ sung dịch nuôi chủng vi khuẩn kiểm định theo tỷ lệ 1% (v/v), lắc nhẹ và đổ vào đĩa petri (25 mL/đĩa) rồi để đông. Tiến hành đặt thỏi thạch (đường kính 5 mm) của chủng xạ khuẩn và ủ các đĩa ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ.
- Quan sát, đọc kết quả và chụp ảnh đĩa thử hoạt tính sau 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn của chủng VTCC 41724 được đánh giá theo kích thước vùng kháng khuẩn (ΔD) ở xung quanh lỗ thạch, tính theo công thức: $\Delta D = D - d$

Trong đó: D là đường kính vùng kháng khuẩn (mm)

d là đường kính lỗ thạch (mm)

Xác định hoạt tính kháng nấm gây bệnh thực vật của chủng VTCC 41724:

Chuẩn bị đĩa petri chứa môi trường PDA (khoai tây 200 g, glucoza 20 g, thạch 15 g, nước cất 1 L). Lấy 1 thỏi thạch (đường kính 5 mm) từ khuẩn lạc nấm kiểm định (*Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Phytophthora capsici*) đặt vào giữa đĩa petri theo tư thế úp để sợi nấm và bào tử tiếp xúc với môi trường. Sau đó, một thỏi thạch (đường kính 5 mm) của chủng xạ khuẩn (nuôi cấy trên môi trường thạch YS trong 5 ngày) được đặt vào vị trí cách tâm đĩa 2 cm. Ủ đĩa trong 2 ngày ở 25°C. Tỷ lệ kháng của chủng xạ khuẩn đối với chủng nấm được tính theo công thức:

$$S = \frac{R - r}{R} * 100\%$$

Trong đó:

S: phần trăm ức chế

R: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đối diện vị trí đặt thỏi thạch xạ khuẩn

r: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đặt thỏi thạch xạ khuẩn

Kết quả về hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh thực vật là chủng VTCC 41724 có hoạt tính đối kháng tốt với *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa (đường kính vòng kháng khuẩn là $17 \pm 1,4$ mm); đối kháng tương đối tốt với *Dickeya zea* gây bệnh thối gốc (đường kính vòng kháng khuẩn là $13 \pm 0,5$ mm) và *Pseudomonas syringae* gây bệnh đốm lá (đường kính vòng kháng khuẩn là $11 \pm 0,5$ mm) (Hình 3).

Về hoạt tính kháng nấm gây bệnh thực vật, chủng VTCC 41724 có khả năng ức chế rất mạnh đối với loài *Phytophthora capsici* gây bệnh thối nhũn gốc (tỷ lệ giảm kích thước khuẩn lạc nấm là $75\% \pm 1$) và *Alternaria alternate* gây bệnh đốm lá (tỷ lệ giảm kích thước khuẩn lạc nấm là $50\% \pm 1$); ức chế tốt đối với loài *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư và *Fusarium proliferatum* gây bệnh thối thân trên cây măng tây (tỷ lệ giảm kích thước khuẩn lạc nấm lần lượt là $32\% \pm 0,5$ và $29\% \pm 1,4$) (Hình 3).

Qua các thử nghiệm, có thể thấy chủng xạ khuẩn VTCC 41724 rất có tiềm năng để ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học để kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do *Dickeya zea*. Để thực hiện việc sản xuất chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724, đạt độ ổn định về mật số tế bào và hoạt tính kháng Dz, các tác giả sáng chế đã thực hiện các thử nghiệm nhằm xác định các điều kiện tối ưu để ứng dụng vào quy trình sản xuất chế phẩm này.

Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp đối với chủng VTCC 41724 để tạo sinh khối và biểu hiện hoạt tính kháng Dz cao

Chủng VTCC 41724 được hoạt hóa trên môi trường thạch YS để sử dụng trong các thí nghiệm xác định điều kiện sinh trưởng phù hợp cho tạo sinh khối và thể hiện hoạt tính kháng Dz cao nhất. Các yếu tố khảo sát được chia thành 2 nhóm:

- Nhóm thứ nhất: môi trường dinh dưỡng, thời gian nuôi cấy, tỷ lệ cấp giống được nghiên cứu trong bình tam giác.
- Nhóm thứ hai: tốc độ khuấy, chế độ sục khí được thực hiện trên thiết bị lên men.

Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy được đánh giá thông qua xác định mật số tế bào và hoạt tính kháng *Dz* của mẫu dịch nuôi.

Mật số tế bào (CFU/mL) được xác định bằng phương pháp đếm trên đĩa thạch. Dịch nuôi cấy xạ khuẩn được pha loãng theo dãy trong dung dịch NaCl 0,9% và cấy trải trên đĩa thạch YS. Chọn đĩa có số khuẩn lạc dưới 20 - 200 khuẩn lạc ở 2 độ pha loãng liên tiếp và tính mật số tế bào theo công thức:

$$\text{Mật số TB} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right) = \frac{N}{V * d * (n1 + 0,1 * n2)}$$

Trong đó:

N: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa chọn

V: thể tích mẫu cấy trên mỗi đĩa thạch

d: Hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất

n1: số đĩa được chọn ở độ pha loãng thứ nhất

n2: số đĩa được chọn ở độ pha loãng thứ hai.

Các bước xác định hoạt tính kháng vi khuẩn được thực hiện tương tự như trên, chỉ thay thạch chứa xạ khuẩn bằng 50 μL dịch nuôi đã ly tâm loại tế bào được nhỏ vào các giếng đường kính 5 mm đã được đục trên đĩa thạch. Quan sát và đọc kết quả sau 24 giờ.

- Xác định môi trường thích hợp:

Chủng VTCC 41724 được nuôi lắc 160 vòng/phút trong các bình tam giác thể tích 250 mL chứa 75 mL môi trường YS, SKS, ISP2, 2M, và 301 dạng dịch thể (Bảng 1), nhiệt độ nuôi cấy 28 - 30°C, thời gian 5 ngày. Dịch nuôi cấy được lấy mẫu 1 lần/ngày để xác định mật số tế bào và hoạt tính kháng *Dz*. Kết quả cho thấy chủng VTCC 41724 có mật số tế bào cao nhất là $2,4 \times 10^9$ CFU/mL và hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất với đường kính vòng kháng 10,8 mm khi nuôi cấy trên môi trường 2M (Hình 4A).

- Xác định thời gian nuôi cấy thích hợp:

Chủng VTCC 41724 được cấy vào môi trường 2M và nuôi lắc 160 vòng/phút ở 28 - 30°C. Lấy mẫu dịch nuôi 1 lần/ngày từ ngày thứ 3 trở đi để xác định mật số tế bào và hoạt tính kháng *Dz*. Kết quả cho thấy, thời gian nuôi cấy tối ưu cho chủng VTCC 41724 để tạo sinh khối ($2,5 \times 10^9$ CFU/mL) và thể hiện hoạt tính kháng *Dz* cao nhất (11,2 mm) là 5 ngày (Hình 4B).

- Xác định tỷ lệ cấy giống thích hợp

Chủng VTCC 41724 được cấy vào môi trường 2M ở các tỷ lệ cấy giống 1, 3, 5, 7%, nuôi lắc 160 vòng/phút ở 28 - 30°C. Lấy mẫu dịch nuôi ở ngày thứ 5 để xác định mật số tế bào và hoạt tính kháng *Dz*. Kết quả cho thấy, tỷ lệ cấy giống tối ưu cho chủng VTCC 41724 để tạo sinh khối và thể hiện hoạt tính kháng *Dz* cao nhất là 5% ($2,9 \times 10^9$ CFU/mL và 11,5 mm) (Hình 4C).

- Xác định tốc độ khuấy và chế độ cấp khí thích hợp cho lên men chìm

- + Chuẩn bị giống cấp 1: Chủng VTCC 41724 được nuôi lắc 160 vòng/phút trong môi trường 2M dịch thể ở 28 - 30°C trong 72 giờ. Dịch nuôi cấy được lấy mẫu và xác định hoạt tính kháng *Dz*.
- + Cấy giống cấp 1 vào bình lên men 2 lít chứa 1 lít môi trường 2M vô trùng (tỷ lệ cấy giống 5%). Vận hành thiết bị lên men ở các tốc độ khuấy 100, 150, 200, 250, 300 vòng/phút, chế độ cấp khí 1, 2, 3, 4 L/phút. Thu mẫu hàng ngày, xác định mật số tế bào và hoạt tính kháng *Dz* ở thời điểm kết thúc. Kết quả cho thấy, tốc độ khuấy 200 vòng/phút và chế độ cấp khí 3 L/phút cho mật số tế bào và hoạt tính kháng *Dz* cao nhất, đạt $3,6 \times 10^9$ CFU/mL và vòng kháng *Dz* đạt 12,5 mm (Hình 4D, 4E).

Sau khi xác định được các điều kiện tối ưu, các tác giả sáng chế đã thực hiện xây dựng và hoàn chỉnh quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa chủng *Streptomyces griseus* VTCC 41724 ứng dụng trong kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do *Dickeya zeae*.

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 ứng dụng trong kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do *Dickeya zeae* bao gồm các bước như sau:

(i) Hoạt hoá chủng từ điều kiện lạnh sâu:

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 lưu giữ trong điều kiện lạnh sâu -80°C được cấy hoạt hoá trên môi trường thạch YS, nuôi ở 28 - 30°C trong 5 ngày, thu được chủng VTCC 41724 hoạt hóa.

(ii) Nhân giống cấp 1:

Thu sinh khối chủng VTCC 41724 hoạt hóa trên đĩa thạch bằng cách đục các thỏi thạch đường kính 5 mm chứa khuẩn lạc chủng VTCC 41724 và cấy vào bình tam giác 250 mL chứa 75 mL môi trường dinh dưỡng 2M, lắc 160 vòng/ phút ở 28 - 30°C, trong 72 giờ, thu được giống cấp 1.

(iii) Lên men thu dịch nuôi chứa sinh khối:

Cấy chuyển giống cấp 1 vào thiết bị lên men chứa môi trường 2M với tỷ lệ 5% thể tích giống cấp 1. Thực hiện nuôi thu sinh khối ở điều kiện khuấy 200 vòng/phút, sục khí 3 L/phút ở 28 - 30°C, trong 5 ngày, thu được dịch nuôi chứa sinh khối chủng VTCC 41724.

(iv) Phối trộn thu chế phẩm:

Tạo hỗn hợp giá thể bằng cách trộn đều bentonit, than bùn, trấu và diatomit theo tỷ lệ % khối lượng là 25% bentonit, 10% than bùn, 30% trấu và 35% diatomit.

Trộn hỗn hợp giá thể với dịch nuôi chứa sinh khối chủng VTCC 41724 theo tỷ lệ giá thể : dịch nuôi = 1,5 : 1 (khối lượng/thể tích), thu được sản phẩm sau trộn.

Rải mỏng sản phẩm sau trộn trên khay ở độ dày khoảng 3 - 5 cm và sấy ở 37 - 40°C trong 2 ngày tới độ ẩm khoảng 10 %, thu được chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724.

Chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 thu được từ quy trình có mật số tế bào và hoạt tính kháng *Dickeya zeae* cao, và ổn định trong bảo quản. Chế phẩm này rất phù hợp để ứng dụng trong việc kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do *Dickeya zeae*. Chế phẩm sinh học chứa chủng VTCC 41724 với mật số $\geq 5 \times 10^8$ (CFU/g), ổn định trong thời gian ≥ 6 tháng ở điều kiện bảo quản và có khả năng kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do vi khuẩn *Dickeya zeae* ở quy mô nhà lưới đạt hiệu lực phòng trừ 73,56%.

Chế phẩm sinh học SGB chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 thu được từ quy trình có thể được cân vào các túi thiếc trọng lượng 0,5 kg/túi, hút chân không và bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học SGB chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* được phân lập từ lá mục tại vườn Quốc gia Phong Nha - Kẻ Bàng (Quảng Bình) và hiện được lưu giữ tại Trung tâm nguồn gen vi sinh vật Quốc gia (VTCC) với mã số VTCC 41724 ở điều kiện lạnh sâu -80°C.

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 lưu giữ trong điều kiện lạnh sâu -80°C được cấy hoạt hoá trên môi trường thạch YS, nuôi ở 28 - 30°C trong 5 ngày, thu được chủng VTCC 41724 hoạt hóa.

Thu sinh khối chủng VTCC 41724 hoạt hóa trên đĩa thạch bằng cách đục các thoi thạch đường kính 5 mm chứa khuẩn lạc chủng VTCC 41724 và cấy vào bình tam giác 250 mL chứa 75 mL môi trường dinh dưỡng 2M, lắc 160 vòng/ phút ở 28 - 30°C, trong 72 giờ, thu được giống cấp 1.

Cấy chuyển giống cấp 1 vào nồi lên men 2L chứa 1 L môi trường 2M với tỷ lệ 5% thể tích giống cấp 1. Thực hiện nuôi thu sinh khối ở điều kiện khuấy 200 vòng/phút, sục khí 3 L/phút ở 28 - 30°C, trong 5 ngày, thu được dịch nuôi chứa sinh khối chủng VTCC 41724.

Tạo hỗn hợp giá thể bằng cách trộn đều bentonit, than bùn, trấu và diatomit theo tỷ lệ % khối lượng là 25% bentonit, 10% than bùn, 30% trấu và 35% diatomit.

Trộn hỗn hợp giá thể với dịch nuôi chứa sinh khối chủng VTCC 41724 theo tỷ lệ giá thể : dịch nuôi = 1,5:1 (khối lượng/thể tích), thu được sản phẩm sau trộn.

Rải mỏng sản phẩm sau trộn trên khay ở độ dày khoảng 3 - 5 cm và sấy ở 37 - 40°C trong 2 ngày tới độ ẩm khoảng 10 %, thu được chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724.

Chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 thu được được đóng gói 0,5 kg/túi và hút chân không, bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thực hiện xác định mật số tế bào của chế phẩm đạt $7,1 \times 10^8$ CFU/g.

Thực hiện xác định mật số tế bào trong thời gian bảo quản 6 tháng, kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Mật số tế bào xạ khuẩn trong chế phẩm theo thời gian bảo quản

TT	Thời hạn bảo quản	Mật số tế bào (10^8 CFU/g)
1	1 tháng	$6,8 \pm 0,42$
2	2 tháng	$6,5 \pm 0,46$
3	3 tháng	$5,4 \pm 0,85$
4	4 tháng	$5,3 \pm 0,45$
5	5 tháng	$4,9 \pm 0,35$
6	6 tháng	$4,3 \pm 0,65$

Như vậy, sau 06 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng, mật số tế bào đạt $4,3 \times 10^8$ CFU/g. Qua đó có thể thấy được chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 có độ ổn định tốt trong bảo quản.

Ở ví dụ tiếp theo, chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 thu được từ quy trình được gọi là chế phẩm SGB.

Ví dụ 2: Đánh giá hiệu quả của chế phẩm SGB trong việc kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do Dz ở điều kiện nhà lưới

Phương pháp bố trí thí nghiệm

- Thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng bệnh thối gốc lúa được thực hiện trong nhà lưới chống côn trùng trên giống lúa Bắc thơm số 7 (BT7).
- Mỗi công thức thí nghiệm gồm 02 ô (diện tích mỗi ô là 1m^2 , chiều dài $\times$ chiều rộng là $1\text{m} \times 1\text{m}$).
- Giống lúa thí nghiệm được cấy 1 danh với mật độ 30 danh/ m^2 , khoảng cách cây cách cây là 16×16 cm, hàng cách hàng là 20×20 cm.

- Chế độ phân bón, chăm sóc theo quy trình canh tác khuyến cáo đối với giống lúa BT7.
- Thí nghiệm được thực hiện với 2 công thức
 - + CTTN (lô thí nghiệm): Cây được xử lý với chế phẩm
 - + CTĐC (lô đối chứng): Cây không được xử lý với chế phẩm.
- Đối với lô thí nghiệm: hạt lúa được ngâm trong dịch chế phẩm SGB pha loãng 1/5 ($\geq 10^8$ CFU/ml) trong 30 phút trước khi gieo. Trước khi trồng 2 ngày, tưới bổ sung dịch chế phẩm SGB pha loãng 1/5 ($\geq 10^8$ cfu/ml) vào đất. Cây mạ 7 – 10 ngày tuổi được cấy vào các ô thí nghiệm có bón lót chế phẩm SGB vào đất theo tỷ lệ 1 g/m² (mật độ vi sinh vật đạt $\geq 10^6$ CFU/m² đất). Bón chế phẩm bổ sung trước khi nhiễm Dz 02 ngày.

Lây bệnh nhân tạo cho cây: Khi cây lúa 25 ngày tuổi, tiến hành lây nhiễm Dz. Chủng vi khuẩn gây bệnh thối gốc lúa *Dickeya zeae* được nuôi lắc trên môi trường TSB ½ (g/L: trypton 8,5; soyton 1,5; glucose 1,25; NaCl 2,5; K₂HPO₄ 1,25) ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Chính OD₆₀₀ tới 1 bằng cách pha loãng với môi trường TSB ½. Dùng kim tiêm vô trùng nhúng vào dịch nuôi Dz đã pha loãng và chích nhẹ vào thân cây (phần thân sát mặt nước).

Đánh giá khả năng bệnh thối gốc lúa: Điều tra vào giai đoạn 7, 11, 15 ngày sau lây nhiễm theo phương pháp 5 điểm chéo góc, mỗi điểm điều tra 1 khóm, không điều tra trên các khóm lúa cạnh mép ô thí nghiệm (tổng số khóm điều tra/1m² là 5 khóm). Đo đếm chiều dài vết bệnh và phân cấp theo cấp bệnh để tính toán tỷ lệ và chỉ số bệnh theo phương pháp điều tra phát bệnh dịch hại lúa QCVN 01-38:2010/BNNPTNT:

Cấp 1: < 1/4 diện tích thân lúa bị hại.

Cấp 3: > 1/4 đến 1/2 diện tích thân lúa bị hại.

Cấp 5: > 1/4 đến 1/2 diện tích thân lúa bị hại, cộng lá thứ 3, thứ 4 bị bệnh nhẹ.

Cấp 7: > 1/2 đến 3/4 diện tích thân lúa bị hại và lá phía trên bị hại.

Cấp 9: Vết bệnh leo tới đỉnh cây lúa, các lá nhiễm nặng, một số cây chết.

Chỉ tiêu theo dõi

- Tỷ lệ bệnh (%) = $\frac{\text{Số thân lúa bị bệnh}}{\text{Số thân lúa điều tra}} * 100$

- Chỉ số bệnh (CSB) được tính theo công thức:

$$\text{CSB (\%)} = \frac{(n * 1 + 3 * n_3 + 5 * n_5 + 7 * n_7 + 9 * n_9)}{N * K} * 100$$

Trong đó:

$n_1, n_3, \dots, n_9$ lần lượt là số thân bị bệnh trên các khóm ở các cấp bệnh

N là tổng số thân điều tra

K là cấp bệnh cao nhất quan sát được

- Hiệu lực ức chế vi khuẩn gây bệnh được tính theo công thức Abbott:

$$H (\%) = \frac{(D_c - D_t)}{D_c} * 100$$

Trong đó:

H là hiệu lực ức chế vi khuẩn gây bệnh.

D_c là chiều dài vết bệnh ở công thức đối chứng

D_t là chiều dài vết bệnh ở công thức thí nghiệm

Chiều dài vết bệnh (màu đen), được đo từ vết chích ban đầu đến điểm cuối của vết bệnh dọc theo thân cây lúa lên phía đầu mút lá sau 7, 11, 15 ngày.

Kết quả thí nghiệm

Kết quả điều tra cho thấy, hiệu lực kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa của chế phẩm đạt cao nhất là 73,56% sau 7 ngày nhiễm bệnh.

Bảng 3. Các chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm nhà lưới

Công thức	Tỷ lệ bệnh (%)	Chỉ số bệnh (%)	Chiều dài vết bệnh (cm)	H (%)
CTTN	45,76 ^b	31,17 ^b	3,26	73,56 ^a
CTĐC	87,09 ^c	72,09 ^c	15,87	0

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Kiểm soát sinh học trong nông nghiệp là cách tiếp cận hướng tới phát triển bền vững nhằm tạo ra các nông sản chất lượng cao, an toàn và giảm thiểu tác động đến môi trường. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 kháng vi khuẩn gây bệnh thối gốc lúa *Dickeya zeae* theo sáng chế cho phép tạo ra chế phẩm có mức ổn định về mật số tế bào và hoạt tính kháng *Dz* trong điều kiện bảo quản. Quy trình sử dụng các thiết bị cơ bản trong lĩnh vực công nghệ sinh học vi sinh vật, nguồn nguyên liệu để nuôi cấy vi sinh vật và tạo chế phẩm đơn giản, dễ tìm, là yếu tố giảm giá thành của chế phẩm. Thử nghiệm chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 ở điều kiện nhà lưới cho hiệu quả bảo hộ > 70%, rất có tiềm năng ứng dụng ngoài đồng ruộng cho sản xuất lúa gạo hữu cơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Phạm Thị Huệ, Đinh Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Vân, Nguyễn Hồng Minh, Nguyễn Kim Nữ Thảo (2020) Nghiên cứu hoạt tính kháng một số vi khuẩn gây bệnh thực vật của các chủng xạ khuẩn phân lập ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 5:60-67.
2. Nguyễn Văn Hoà, Nguyễn Thành Hiếu, Trần Ước, Trần Thị Hoàng Linh (2015) Quy trình quản lý tổng hợp bệnh thối trái thanh long. URL http://thanhlong.binhthuan.gov.vn/index.php?mod=newdetail&id_theloai=33&id_theloaitin=95&id_tintuc=151
3. Trần Hưng Minh, Ngô Văn Chí, Phạm Minh Phú, Nguyễn Thị Thu Nga (2016) Phân lập và bước đầu đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3): 185-192.
4. Trần Vũ Phấn, Phùng Thị Thanh Thảo (2015). Hiệu quả phòng trừ sinh học bệnh thối gốc lúa của vi khuẩn vùng rễ thuộc chi *Bacillus*. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*. 4:20-24.

Tiếng Anh

5. Aeny TN, Prasetyo J, Suharjo R, Dirmawati SR, Efri, Niswati A (2018) Isolation and Identification of actinomycetes potential as the antagonist of *Dickeya zeae* pineapple soft rot in Lampung, Indonesia. *Biodiversitas* 19: 2052-2058.
6. Aeny TN, Suharjo R, Ginting C, Hapsoro D, Niswati A (2020) Characterization and host range assessment of *Dickeya zeae* associated with pineapple soft rot disease in East Lampung, Indonesia *Biodiversitas* 21:587-595.
7. Bertani I, Passos da Silva D, Abbruscato P, Piffanelli P, Venturi V. (2013) Draft genome sequence of the plant pathogen *Dickeya zeae* DZ2Q, isolated from rice in Italy. *Genome Announc.* 1(6):e00905–13.
8. Hauben L, Moore ERB, Vauterin L (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied*

Microbiology 21: 384–97.

9. Hu M, Li J, Chen R, Li W, Feng L, Shi L, Xue Y, Feng X, Zhang L, Zhou J (2018) *Dickeya zeae* strains isolated from rice, banana and clivia rot plants show great virulence differentials. *BMC Microbiol* 18: 136. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1300-y>
10. Jafra S, Przysowa J, Gwizdek-Wisniewska A, van der Wolf JM (2009) Potential of bulb-associated bacteria for biocontrol of hyacinth soft rot caused by *Dickeya zeae*. *J Appl Microbiol* 106: 268–277. □
11. Kumar A, Hunjan M, Kaur H, Dhillon H, Singh P (2017) Biochemical responses associated with resistance to bacterial stalk rot caused by *Dickeya zeae* in maize. *J. Phytopathol.* 165(11-12):822-832.
12. Li, J., Hu, M., Xue, Y., Chen, X., Lu, G., Zhang, L., Zhou, J., 2020. Screening, dentification and efficacy evaluation of antagonistic bacteria for biocontrol of soft rot disease caused by *Dickeya zeae*. *Microorganisms*, 8:697.
13. Magaldi S, Mata-Essayag S, De Capriles CH, Perez C, Colella MT, Olaizola C, Ontiveros Y (2004) Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int J Infect Dis* 8(1): 39-4.
14. Pu, X., Zhou, J., Lin, B. & Shen, H., 2012. First report of bacterial foot rot of rice caused by a *Dickeya zeae* in China. *Plant Dis.*, 96(12): 1818-1818.
15. O'Brien PA (2017) Biological control of plant diseases. *Aust. Plant Pathol.* 46(4): 293 – 304.
16. Thind BS, Randhawa PS, Soni PS (1984) Chemical control of bacterial stalk rot (*Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*) and leaf stripe (*Pseudomonas rubrilineans*) of maize. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 91: 4424-430
17. Toth I, van der Wolf J, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsrer Lahkim L, Elphinstone J (2011) *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol.* 60(3):385-399.
18. Zhang J, Shen H, Pu X, Lin B, Hu J (2014) Identification of *Dickeya zeae* as a causal agent of bacterial soft rot in banana in China. *Plant Disease* 98(4):436-442.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 ứng dụng trong kiểm soát bệnh thối thân/gốc lúa do *Dickeya zeae* bao gồm các bước:

(i) hoạt hoá chủng từ điều kiện lạnh sâu:

chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724 lưu giữ trong điều kiện lạnh sâu -80°C được cấy hoạt hoá trên môi trường thạch YS, nuôi ở 28 - 30°C trong 5 ngày, thu được chủng VTCC 41724 hoạt hóa;

trong đó môi trường thạch YS có thành phần tính theo g/L là:

cao nấm men: 2;

tinh bột: 10; và

thạch: 15;

(ii) nhân giống cấp 1:

thu sinh khối chủng VTCC 41724 hoạt hóa trên đĩa thạch bằng cách đục các thỏi thạch đường kính 5 mm chứa khuẩn lạc chủng VTCC 41724 và cấy vào bình tam giác 250 mL chứa 75 mL môi trường dinh dưỡng 2M, lắc 160 vòng/ phút ở 28 - 30°C, trong 72 giờ, thu được giống cấp 1;

trong đó môi trường dinh dưỡng 2M có thành phần tính theo g/L là:

cao nấm men: 2;

bột đậu tương: 15;

tinh bột: 20; và

CaCO₃: 4;

(iii) lên men thu dịch nuôi chứa sinh khối:

cấy chuyển giống cấp 1 vào thiết bị lên men chứa môi trường 2M với tỷ lệ 5% thể tích giống cấp 1;

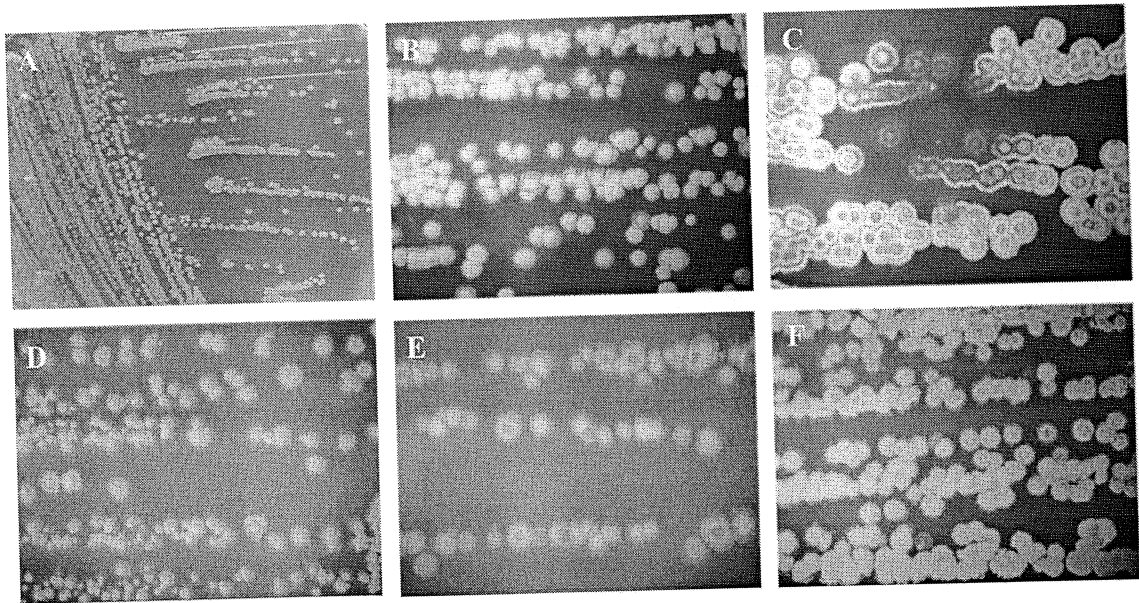
thực hiện nuôi thu sinh khối ở điều kiện khuấy 200 vòng/phút, sục khí 3 L/phút ở 28 - 30°C, trong 5 ngày, thu được dịch nuôi chứa sinh khối chủng VTCC 41724; và

(iv) phối trộn thu chế phẩm:

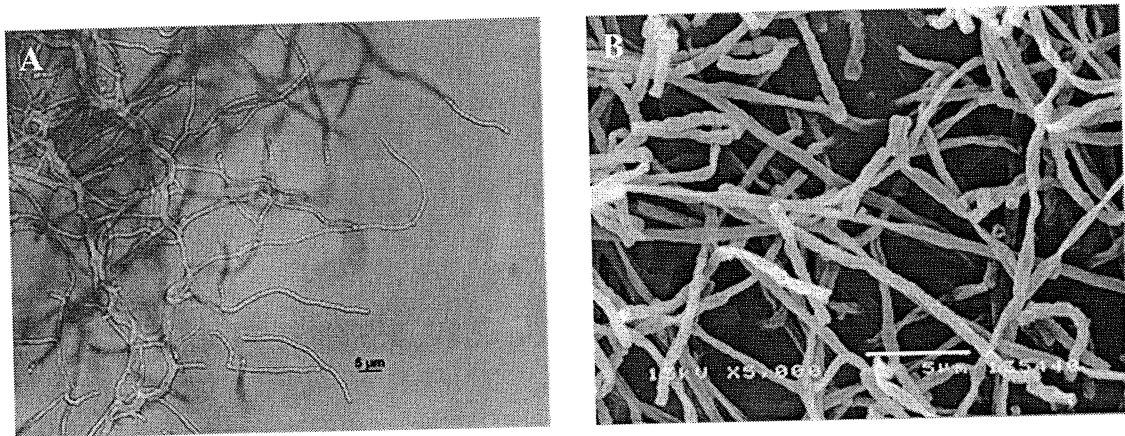
tạo hỗn hợp giá thể bằng cách trộn đều bentonit, than bùn, trấu và diatomit theo tỷ lệ % khối lượng là 25% bentonit, 10% than bùn, 30% trấu và 35% diatomit;

trộn hỗn hợp giá thể với dịch nuôi chứa sinh khối chủng VTCC 41724 theo tỷ lệ giá thể:dịch nuôi = 1,5 : 1 (khối lượng/thể tích), thu được sản phẩm sau trộn;

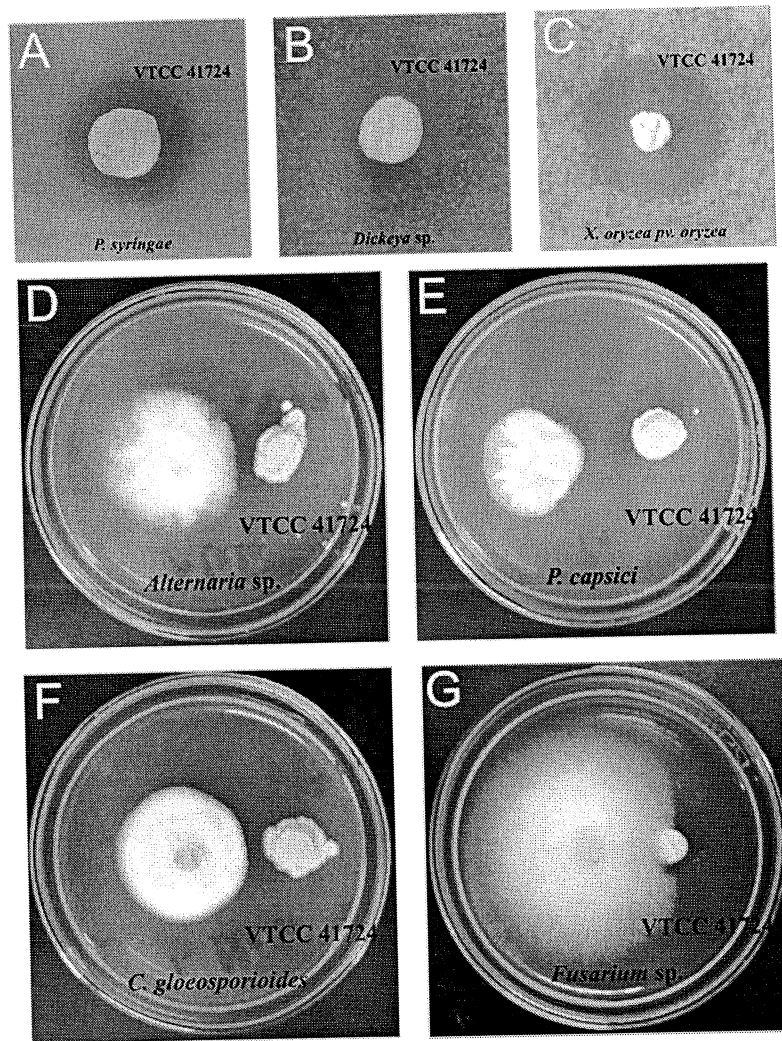
rãi mỏng sản phẩm sau trộn trên khay ở độ dày khoảng 3 - 5 cm và sấy ở 37 - 40°C trong 2 ngày tới độ ẩm khoảng 10 %, thu được chế phẩm sinh học chứa chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* VTCC 41724.



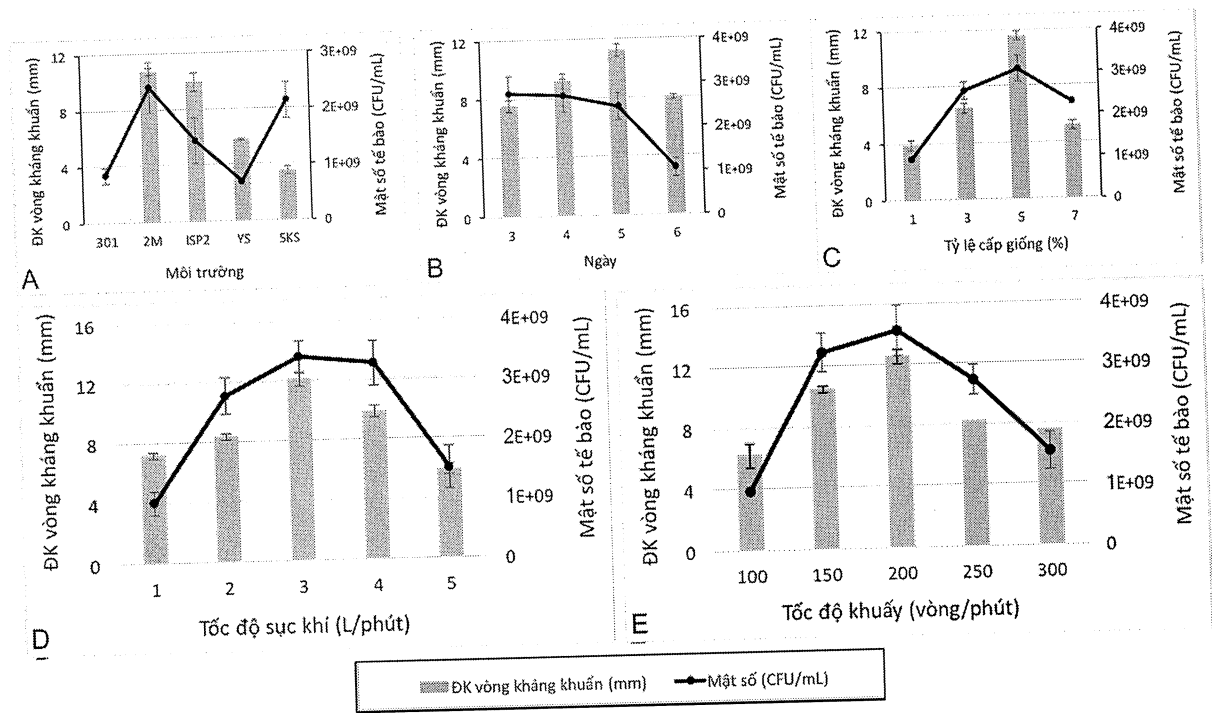
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4