

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH ĐỐI KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH THỐI MỀM TRÊN CÂY LAN HỒ ĐIỆP (*Phalaenopsis*)

Vũ Thị Hoàn¹, Phan Quốc Hưng^{1*}, Nguyễn Văn Tĩnh²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nối tiếp nghiên cứu về phân lập tuyển chọn chủng giống vi khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh thối mềm trên cây hoa lan Hồ điệp nhằm mục đích tạo ra được chế phẩm sinh học phục vụ cho việc sản xuất cây hoa lan Hồ điệp, góp phần tăng giá trị kinh tế và bảo vệ môi trường cũng như sức khỏe người lao động. Kết quả đã xác định được điều kiện nhân giống cấp 1 và cấp 2 cho các đối tượng nghiên cứu bao gồm: pH môi trường thích hợp là 7; tốc độ lắc 150 vòng/phút; thời gian 48 giờ, nhiệt độ 30°C; tỷ lệ tiếp giống 3% và môi trường canh thang thường cho ĐK1, môi trường King B cho ĐK2. Điều kiện lên men sinh khối để sản xuất chế phẩm là môi trường nước chiết giá đỗ cho ĐK1, nước chiết khoai tây cho ĐK2, tốc độ cánh khuấy 150 vòng/phút, thời gian 48 giờ, ở nhiệt độ 30°C, tỷ lệ tiếp giống 10%. Chế phẩm sinh học dùng để phòng, trừ bệnh thối mềm trên cây lan Hồ điệp được sản xuất từ hỗn hợp sinh khối hai chủng là 1:1 (theo thể tích) được bảo quản ở nhiệt độ phòng, nơi thoáng mát, sau 6 tháng mật độ vi sinh vật hữu ích đạt được từ $7,76 - 8,12 \times 10^8$ CFU/mL, mật độ vi sinh vật tạp ở mức $1,5 \times 10^3$ CFU/mL - $2,6 \times 10^3$ CFU/mL, đạt chất lượng theo tiêu chuẩn hiện hành.

Từ khóa: Bệnh thối mềm, hoa lan Hồ điệp, vi khuẩn đối kháng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây hoa lan Hồ điệp (*Phalaenopsis*) đã và đang được trồng, tiêu thụ rất mạnh trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Theo Nguyễn Văn Tĩnh và cs (2020) [1], việc sản xuất và tiêu thụ loài hoa này tăng mạnh trong những năm gần đây, tuy nhiên 80% nguồn hoa đến từ nhập khẩu (số liệu năm 2017), kim ngạch nhập khẩu hoa lan Hồ điệp của Việt Nam năm 2018 đạt khoảng 520 tỷ đồng.

Hiện nay, một số doanh nghiệp và viện nghiên cứu như: Viện Sinh học Nông nghiệp, Viện Nghiên cứu Rau quả, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam... đã bắt đầu quan tâm nghiên cứu và sản xuất hoa lan Hồ điệp phục vụ thị trường trong nước và xuất khẩu. Năm 2019, miền Bắc đã có khoảng 27 doanh nghiệp, hộ nông dân sản xuất hoa lan Hồ điệp,

trong đó tập trung nhiều nhất ở thành phố Hà Nội và tỉnh Quảng Ninh.

Mặc dù nước ta có nhiều thế mạnh về điều kiện tự nhiên và nguồn lực con người so với nhiều nước trong khu vực nhưng việc sản xuất loài hoa này vẫn còn rất khiêm tốn. Hiện chưa có nhiều đề tài nghiên cứu được ứng dụng trong sản xuất lan Hồ điệp, dẫn đến sản xuất hoa lan công nghiệp của nước ta chưa đạt được như kỳ vọng [2]. Các bệnh trên cây lan Hồ điệp nói chung và bệnh thối mềm do vi khuẩn nói riêng đã gây ra những thiệt hại không nhỏ cho sản xuất. Trong các điều kiện tối ưu như thời tiết ẩm, độ ẩm cao, mầm bệnh lây lan rất nhanh từ cây bị bệnh sang cây khỏe. Những cây bị bệnh sẽ bị nhà vườn vứt bỏ để tránh lây nhiễm sang các cây khỏe, điều này gây tổn thất khá lớn cho người trồng lan. Theo Sudarsono và cs (2018) [3], bệnh thối mềm được phát hiện trên nhiều loại hoa lan và các vùng trồng tại Indonesia với tỷ lệ mắc bệnh từ 46 - 100%. Thiệt hại do bệnh thối mềm cũng lên tới trên 30% tại vùng Yogyakarta và Tây Java [4]. Những nghiên cứu về ứng dụng tiến bộ khoa học kỹ thuật trong sản xuất

¹ Khoa Tài nguyên và Môi trường,
Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Nghiên cứu Rau quả

* Email: phanhung68@gmail.com

lan Hồ điệp, đặc biệt là phòng, trị bệnh theo hướng sinh học không chỉ giúp tăng năng suất và hiệu quả kinh tế mà còn nhằm đảm bảo an toàn cho quá trình canh tác và sử dụng sản phẩm hiện chưa được chú trọng đúng mức. Dựa trên kết quả nghiên cứu về “*Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn gây bệnh thối mềm trên cây lan Hồ điệp*” đã được công bố năm 2020, nghiên cứu này thực hiện với mục đích xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh phòng, trị bệnh thối mềm phục vụ cho việc canh tác cây hoa lan Hồ điệp, góp phần tăng giá trị sản xuất và bảo vệ môi trường cũng như sức khỏe người lao động, an toàn trong quá trình sử dụng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Hai chủng vi khuẩn đối kháng ĐK1, ĐK2 (đã giải trình tự gen 16S rDNA và xác định tên nhưng chưa công bố) và vi khuẩn gây bệnh *Erwinia chrysantemi* (Ec) được cung cấp bởi Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Môi trường nước chiết giá đỗ; nước chiết khoai tây; nước chiết đậu tương (200 g nguyên liệu/1.000 ml nước, đun sôi 30 phút, lọc); môi trường rỉ đường: 50 g/1.000 ml nước, đun sôi 15 phút, lọc.

Hệ thống lên men sinh khối vi sinh vật (4 bình thể tích 2,5 lít) và các máy móc thiết bị chính cho nghiên cứu vi sinh vật như tủ ẩm, tủ cấy vô trùng; tủ sấy, máy lắc ổn nhiệt, nồi hấp hơi nước cao áp...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hoạt hóa và nhân giống gốc

Môi trường sử dụng để hoạt hóa và nhân giống gốc là môi trường King B (Pepton: 20 g; glycerin: 10 ml; K_2HPO_4 : 1,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 1,5 g; nước cất 1.000 ml).

Giống gốc đang bảo quản tại điều kiện âm 20°C được đưa ra ủ ở 30°C trong 24 giờ và được tăng sinh trong môi trường dịch thể trên máy lắc ổn nhiệt với tốc độ lắc 150 vòng/phút; dịch vi khuẩn tăng sinh sẽ được kiểm tra độ tạp nhiễm, đạt yêu cầu sẽ được giữ giống cho các nghiên cứu tiếp theo bằng cách cấy chuyển vào ống nghiệm

có chứa môi trường King B đặc và bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ 3 - 5°C.

2.2.2. Lựa chọn điều kiện nhân giống cấp 1 và cấp 2

Chỉ tiêu theo dõi trong các thí nghiệm lựa chọn điều kiện nhân giống cấp 1 và cấp 2 gồm mật độ tế bào (CFU/mL) bằng phương pháp đo OD600 và hoạt tính đối kháng của các chủng dựa trên việc đo đường kính vòng đối kháng (mm) [5].

Thí nghiệm 1: Lựa chọn môi trường thích hợp: Các môi trường thí nghiệm gồm King B; pepton thường (pepton: 20 g; NaCl: 5 g; pH: 7,2 - 7,4; nước cất: 1.000 mL); thạch thường (pepton: 10 g; NaCl: 5 g; cao thịt: 4 g; pH: 7,4 - 7,6; nước cất: 1.000 mL) và môi trường canh thang thường (nước thịt: 1.000 mL; pepton: 10 g; NaCl: 5 g); vi khuẩn được nuôi cấy riêng rẽ trong môi trường lỏng ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, tỷ lệ tiếp giống 3%; trong 48 giờ, môi trường được lựa chọn sẽ là môi trường có mật độ vi khuẩn và đường kính vòng đối kháng tốt nhất.

Thí nghiệm 2: Xác định thời gian nuôi cấy: Theo dõi sự sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn sau 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ với điều kiện thí nghiệm tương tự và môi trường được lựa chọn từ thí nghiệm 1; thời gian nuôi cấy thích hợp sẽ là thời gian có mật độ vi khuẩn và đường kính vòng đối kháng tốt nhất.

Thí nghiệm 3: Xác định nhiệt độ nuôi cấy: Thí nghiệm tiến hành ở các khoảng nhiệt độ: 25°C, 30°C, 35°C và 40°C với điều kiện thí nghiệm tương tự và môi trường, thời gian được lựa chọn từ hai thí nghiệm trên. Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp sẽ là nhiệt độ có mật độ vi khuẩn và đường kính vòng đối kháng tốt nhất.

Thí nghiệm 4: Xác định pH môi trường thích hợp: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong các môi trường có pH đạt giá trị từ 4 - 8; với điều kiện thí nghiệm tương tự và môi trường, thời gian và nhiệt độ được lựa chọn từ 3 thí nghiệm trên; pH nuôi cấy thích hợp sẽ là pH mà ở đó mật độ vi khuẩn và đường kính vòng đối kháng tốt nhất.

Thí nghiệm 5: Xác định tốc độ lắc: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy ở tốc độ 100, 120, 150, 200 và 250 vòng/phút; với tỷ lệ tiếp giống 3% và môi

trường, thời gian, nhiệt độ, pH được lựa chọn từ bốn thí nghiệm trên. Tốc độ lắc được lựa chọn tại công thức mà ở đó mật độ vi khuẩn và đường kính vòng đối kháng tốt nhất.

Thí nghiệm 6: Xác định tỷ lệ tiếp giống: Trong thí nghiệm này tỷ lệ tiếp giống được khảo sát bao gồm 1%, 3%, 5% và 7% với điều kiện môi trường, thời gian, nhiệt độ, pH và tốc độ lắc đã xác định tại năm thí nghiệm trên. Tỷ lệ tiếp giống lựa chọn tại công thức có mật độ vi khuẩn và đường kính vòng đối kháng tốt nhất.

2.2.3. Lựa chọn điều kiện lên men sinh khối

Tiến hành 3 thí nghiệm lựa chọn điều kiện lên men sinh khối gồm: Lựa chọn môi trường nhân sinh khối, lựa chọn tốc độ khuấy và lựa chọn tỷ lệ cấp giống.

Thí nghiệm 1: Lựa chọn môi trường nhân sinh khối: Các môi trường thử nghiệm gồm: Môi trường nước chiết giá đỗ; nước chiết khoai tây; nước chiết đậu tương và môi trường rỉ đường. Sau khi pha chế để nguội, các môi trường thử nghiệm được cho vào nồi lên men riêng biệt và bổ sung giống cấp 2 với tỷ lệ 5%, đồng thời điều chỉnh các thông số kỹ thuật của hệ thống lên men cho phù hợp với điều kiện sinh trưởng phát triển của từng giống vi khuẩn đã xác định tại mục 2.2.2. Môi trường được lựa chọn để lên men sinh khối sẽ là môi trường có mật độ vi khuẩn hữu ích cao nhất.

Các thí nghiệm tương tự sẽ được tiến hành để lựa chọn tốc độ khuấy và tỷ lệ cấp giống thích hợp trong quá trình lên men sinh khối các chủng phục vụ sản xuất chế phẩm.

2.2.4. Sản xuất và đánh giá chất lượng chế phẩm

Theo lý lịch chủng gốc, hai chủng ĐK1 và ĐK2 không đối kháng nhau vì vậy chế phẩm sẽ được sản xuất theo phương pháp hợp chủng với tỷ lệ 1 : 1 (theo thể tích) và bảo quản ở nhiệt độ phòng để đánh giá chất lượng theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN) sau 6 tháng sản xuất.

Chỉ tiêu đánh giá: Mật độ vi sinh vật hữu ích và mật độ vi sinh vật tạp được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hoạt hóa chủng giống

Giống gốc tốt phải đảm bảo khả năng sống, thuần chủng, không tạp nhiễm, đảm bảo tính ổn định di truyền và các đặc tính sinh học. Hoạt hóa giống gốc để đảm bảo khả năng sinh trưởng, phát triển tốt đáp ứng được nhu cầu sử dụng. Kết quả đánh giá chất lượng giống gốc sau khi hoạt hóa được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đánh giá chất lượng giống gốc sau tăng sinh 24 giờ

TT	Chủng vi khuẩn	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/ml)	D (mm)
2	ĐK1	7,68	19
3	ĐK2	7,40	20

Ghi chú: D- Đường kính vòng đối kháng.

Sau tăng sinh các chủng đều đạt mật độ từ 7,40 và 7,68 $\times 10^9$ CFU/mL và đường kính vòng đối kháng từ 19 mm và 20 mm (tương đương với giống gốc). So sánh với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Nga và Nguyễn Văn Khởi (2020) [6] về việc tuyển chọn vi khuẩn vùng rễ trong phòng trừ bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *Burkholderia glume* có đường kính đối kháng là 0,6 -11,8 mm thì các vi khuẩn thí nghiệm có đường kính đối kháng lớn hơn nhiều. Điều này cho thấy, các chủng giống gốc vẫn giữ được hoạt tính tốt sau thời gian lưu giữ và là cơ sở tạo ra chế phẩm có chất lượng tốt.

Giống gốc sau khi kiểm tra chất lượng được cấy chuyển trên môi trường thạch nghiêng King B, ủ 30°C trong 48 giờ. Kết quả kiểm tra 100% các ống giống đạt độ thuần khiết được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Lựa chọn điều kiện nhân giống cấp 1 và cấp 2

3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nhân giống

Việc khảo sát các loại môi trường khác nhau nhằm tìm ra môi trường thích hợp sẽ tạo điều kiện để vi khuẩn sinh trưởng và phát triển tốt nhất, từ đó giúp tăng cường chất lượng giống cấp 2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn trong quá trình nhân giống được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nhân giống đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Môi trường nuôi cấy							
	King B		Pepton thường		Thạch thường		Canh thang thường	
	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)
ĐK1	6,78	18	7,76	18	6,12	14	7,80	20
ĐK2	7,87	20	7,01	20	6,61	15	6,49	15

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, cả 2 chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh trưởng và phát triển trên bốn loại môi trường; trong đó chủng ĐK1 đạt mật độ tế bào cũng như đường kính vòng đối kháng khi được nuôi cấy trên môi trường canh thang thường (7,80

x10⁹ CFU/mL và 20 mm); chủng ĐK2 thích hợp với môi trường King B (7,87 x 10⁹ CFU/mL và 20 mm). Vì vậy môi trường canh thang thường và King B được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng của pH

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	pH=4		pH=5		pH=6		pH=7		pH=8	
	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)
ĐK1	5,96	17	6,24	17	6,62	18	6,96	20	6,48	19
ĐK2	5,82	17	6,06	18	6,34	18	6,56	20	6,16	19

Xác định được khoảng pH phù hợp có ý nghĩa trong việc tạo môi trường thích hợp cho quá trình sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn. Kết quả đánh giá mức độ thích ứng của các chủng vi khuẩn thử nghiệm trên các môi trường có giá trị pH khác nhau được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, cả 2 chủng vi khuẩn đều có thể sinh trưởng phát triển được trong môi trường có giá trị pH từ 4 - 8. Tuy nhiên, khi môi trường nuôi cấy có pH khác nhau thì mật độ tế bào đạt được không giống nhau. Mật độ các chủng đạt tương đối thấp ở pH = 4 với vi khuẩn ĐK1 là 5,96 x

10⁹ CFU/mL và ĐK2 là 5,82 x 10⁹ CFU/mL. Khi pH môi trường nuôi cấy tăng dần đến pH = 7 thì mật độ tế bào của 2 chủng cũng tăng dần và đạt cao nhất ở pH = 7 (ĐK1 và ĐK2 lần lượt là 6,96 x 10⁹ CFU/mL và 6,56 x 10⁹ CFU/mL), cao gấp 1,16 và 1,13 lần so với pH 4. Ở pH = 8, mật độ tế bào của 2 chủng có xu hướng giảm. Như vậy, khi môi trường có pH = 7 mật độ tế bào vi khuẩn và kích thước vòng đối kháng lớn nhất, phù hợp để lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Bảng 4. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Tốc độ lắc (vòng/phút)									
	100		120		150		200		250	
	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ (x10 ⁹ CFU/mL)	D (mm)
ĐK1	6,92	18	7,02	18	10,12	19	10,14	19	8,19	19
ĐK2	6,16	19	7,16	19	10,46	20	10,56	20	8,06	19

Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của tốc độ lắc đến mật độ và kích thước vòng đối kháng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 4.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, mật độ vi khuẩn có sự khác nhau đáng kể khi thay đổi các tốc độ lắc. Mật độ vi khuẩn tăng dần khi tốc độ lắc từ 100 - 200 vòng/phút. Đối với vi khuẩn ĐK1, khi tốc độ lắc tăng từ 100 - 200 vòng/phút thì mật độ cũng tăng từ $6,92 - 10,14 \times 10^9$ CFU/mL. Ở tốc độ lớn hơn 250 vòng/phút mật độ vi khuẩn giảm xuống còn $8,19 \times 10^9$ CFU/mL. Khi nuôi cấy 2 chủng vi khuẩn ở tốc độ 150 vòng/phút mật độ có thấp hơn so với 200 vòng/phút nhưng sự sai khác là không nhiều, tại

hai tốc độ lắc này kích thước vòng đối kháng đều đạt cao nhất. Do vậy, tốc độ lắc là 150 vòng/phút sẽ là tốc độ lắc phù hợp nhất cho quá trình nhân giống, vừa đảm bảo chất lượng giống vừa tiết kiệm chi phí, góp phần tăng hiệu quả kinh tế trong quá trình nhân giống.

3.2.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy thay đổi thì đối mật độ vi khuẩn và đường kính vòng đối kháng cũng thay đổi theo. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Thời gian nuôi cấy							
	24 giờ		48 giờ		72 giờ		96 giờ	
	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)
ĐK1	8,02	18	8,69	19	8,67	19	7,16	18
ĐK2	8,16	19	8,92	21	8,91	20	7,38	20

Kết quả thí nghiệm ở bảng 5 cho thấy, mật độ tế bào vi khuẩn đạt đỉnh sau 72 giờ nuôi cấy; tuy nhiên không có sự khác biệt rõ rệt sau 48 giờ, hơn nữa đường kính vòng đối kháng của cả hai chủng lại đạt cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy. Kết quả này cùng phù hợp với đặc điểm của hai chủng trong điều kiện phân lập là đều mọc nhanh sau 48 giờ. Từ kết quả thí nghiệm trên cho thấy, thời gian nhân giống cấp 2 phù hợp nhất cho các chủng thí nghiệm là 48 giờ.

So sánh với kết quả của Nguyễn Văn Giang và cs (2019) [7] khi khảo sát ảnh hưởng của một số

yếu tố môi trường nuôi cấy *in vitro* tới khả năng đối kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *Bacillus velezensis* YMD1 thì có sự tương đồng; thời gian 48 giờ là thích hợp nhất.

3.2.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Mỗi loại vi khuẩn sẽ phát triển trong một giới hạn nhiệt độ nhất định và sẽ có khoảng nhiệt độ phát triển tối ưu. Việc xác định được nhiệt độ thích hợp sẽ làm tăng hiệu quả kinh tế cho các nhà sản xuất. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ khác nhau đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	20°C		25°C		30°C		35°C		40°C	
	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)
ĐK1	6,28	19	6,69	19	7,92	19	7,90	19	7,11	18
ĐK2	6,12	19	6,72	19	7,96	20	7,95	19	7,05	19

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, hai chủng thí nghiệm đều có thể sinh trưởng, phát triển được ở khoảng nhiệt độ từ 20 - 40°C. Tuy nhiên, ở các nhiệt độ nhân giống khác nhau đã ảnh hưởng không giống nhau đến mật độ tế bào và hoạt tính đối kháng của chúng. Mật độ hai chủng đạt cao nhất khi nuôi cấy ở 30°C, lần lượt là $7,92 \times 10^9$ và $7,96 \times 10^9$ CFU/mL; kích thước vòng đối kháng là 19 mm và 20 mm; sau đó mật độ tế bào giảm dần cho mức

35°C và 40°C. Do vậy, nhiệt độ 30°C sẽ là ngưỡng nhiệt độ phù hợp nhất cho quá trình nhân giống cấp 2. Kết quả thí nghiệm này khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Giang và cs (2019) [7] về vi khuẩn *B. velezensis* đối kháng với nấm *N. dimidiatum* cũng có khoảng nhiệt độ sinh trưởng phát triển là từ 25 - 40°C.

3.2.6. Ảnh hưởng tỷ lệ tiếp giống đến chất lượng giống cấp 1 và cấp 2

Bảng 7. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Tỷ lệ tiếp giống							
	1%		3%		5%		7%	
	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)
ĐK1	6,18	19	10,69	19	10,75	19	10,68	19
ĐK2	6,32	19	11,72	19	11,78	20	11,71	19

Tỷ lệ tiếp giống là một trong các yếu tố có ảnh hưởng khá nhiều đến chất lượng giống cấp 2 cũng như chất lượng và giá thành chế phẩm. Vì vậy, việc xác định được tỷ lệ tiếp giống phù hợp sẽ giúp chỉ ra tỷ lệ giống bổ sung ban đầu trong quá trình nhân giống cấp 2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn được trình bày ở bảng 7.

Kết quả ở bảng 7 cho thấy, mật độ hai chủng tăng tỷ lệ thuận với sự gia tăng của tỷ lệ tiếp giống

trong khoảng từ 1 - 5%, sau đó có xu hướng giảm ở mức 7%, khi đó mật độ của chúng tăng từ $6,18 - 6,32 \times 10^9$ CFU/mL lên $10,75 - 11,78 \times 10^9$ CFU/mL. Tuy nhiên, khi tiếp giống 3% mật độ tế bào có sự sai khác không nhiều so với mức 5%. Trong thí nghiệm này kích thước vòng đối kháng của các chủng khá ổn định khi thay đổi tỷ lệ tiếp giống, chủng ĐK1 là 19 mm, ĐK2 từ 19 - 20 mm. Do vậy, mức tỷ lệ tiếp giống 3% sẽ được lựa chọn cho quá trình nhân giống cấp 2.

Bảng 8. Kết quả xác định điều kiện nhân giống cấp 1 và cấp 2 của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Môi trường nhân giống	pH	Tốc độ lắc (vòng/phút)	Thời gian (giờ)	Nhiệt độ (°C)	Tỷ lệ tiếp giống (%)
ĐK1	Canh thang thường	7	150	48	30	3
ĐK2	King B	7	150	48	30	3

Tổng hợp kết quả các thí nghiệm xác định điều kiện nhân giống cấp 2 của các chủng vi khuẩn trình bày tại bảng 8.

Như vậy ngoại trừ yếu tố môi trường còn lại điều kiện nhân giống cho cả 2 chủng đều tương tự nhau: pH môi trường là 7, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian 48 giờ, ở nhiệt độ 30°C, tỷ lệ tiếp giống 3% (theo thể tích).

3.3. Lựa chọn điều kiện lên men nhân sinh khối

3.3.1. Lựa chọn môi trường

Bốn môi trường được lựa chọn thử nghiệm là các môi trường giàu dinh dưỡng, phổ biến trên thị trường, rẻ tiền, dễ chế tạo và thường được sử dụng trong các nghiên cứu về vi khuẩn bao gồm nước chiết đậu tương, nước chiết giá đỗ, nước chiết khoai

tây và nước rỉ đường. Kết quả thí nghiệm xác định môi trường nhân sinh khối cho các chủng vi khuẩn thu được được thể hiện ở bảng 9.

Kết quả ở bảng 9 cho thấy, các môi trường nhân sinh khối có ảnh hưởng đến mật độ tế bào và hoạt tính đối kháng của vi khuẩn. Chủng ĐK1 trong môi trường nước chiết giá đỗ đạt mật độ vi khuẩn và kích thước vòng ĐK lớn nhất; $5,20 \times 10^8$ CFU/mL và kích thước D đạt 17 mm. Trong khi

đó, chủng vi khuẩn ĐK2 lại phù hợp hơn trên môi trường nước chiết khoai tây, trong đó mật độ đạt $4,72 \times 10^8$ CFU/mL kích thước vòng ĐK là 18 mm. Như vậy, với kết quả của thí nghiệm trên, môi trường nước chiết giá đỗ là môi trường phù hợp với vi khuẩn ĐK1 và nước chiết khoai tây phù hợp nhất với vi khuẩn ĐK2. Đây là những môi trường sẽ được lựa chọn cho quá trình lên men sinh khối để sản xuất chế phẩm.

Bảng 9. Ảnh hưởng của môi trường đến mật độ và hoạt tính đối kháng của vi khuẩn

Môi trường	Nước chiết giá đỗ		Nước chiết khoai tây		Nước chiết đậu tương		Nước rỉ đường	
Chủng vi khuẩn	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)
ĐK1	5,20	17	4,48	15	4,32	13	1,64	10
ĐK2	3,68	16	4,72	18	3,20	16	1,96	11

3.3.2. Lựa chọn tốc độ khuấy

Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến sinh trưởng, phát triển và hoạt tính đối kháng của vi khuẩn trong quá trình lên men sinh khối thu được được thể hiện ở bảng 10.

Kết quả cho thấy, mật độ vi khuẩn có sự khác nhau đáng kể khi thay đổi tốc độ khuấy. Với tốc độ 150 vòng/phút mật độ vi khuẩn ĐK2 đạt cực đại là $7,60 \times 10^8$ CFU/mL và tại tốc độ 200 vòng/phút với chủng ĐK1 là $7,48 \times 10^8$ CFU/mL. Tuy nhiên, cả hai

chủng đều cho kích thước vòng phân giải lớn hơn khi nuôi cấy ở tốc độ 150 vòng/phút. Vì vậy, tốc độ khuấy là 150 vòng/phút được lựa chọn nhằm tiết kiệm chi phí, góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế trong quá trình nhân sinh khối sản xuất chế phẩm. Kết quả này khác với kết quả của Nguyễn Thị Thu và cs (2018) [8], đã nghiên cứu chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp xenlulaza cao có hoạt tính probiotic cho kết quả giá trị đo OD cao nhất ở tốc độ 75 vòng/phút.

Bảng 10. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến mật độ và hoạt tính đối kháng của vi khuẩn trong quá trình nhân sinh khối

Chủng vi khuẩn	Tốc độ khuấy							
	100 (vòng/phút)		125 (vòng/phút)		150 (vòng/phút)		200 (vòng/phút)	
	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)
ĐK1	6,08	15	5,21	15	7,41	18	7,48	16
ĐK2	4,32	15	5,84	16	7,60	17	7,20	16

3.3.3. Lựa chọn tỷ lệ cấp giống

Tỷ lệ cấp giống cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến thời gian nuôi cấy, đặc biệt là với quy mô công nghiệp do yếu tố này ảnh hưởng đáng kể hiệu quả kinh tế. Nếu tỷ lệ cấp giống quá cao có

thể dẫn đến nguồn thức ăn trong môi trường nuôi cấy nhanh cạn kiệt, quá trình lên men sẽ kết thúc nhanh và lượng sinh khối tạo thành ít. Ngược lại, nếu tỷ lệ cấp giống quá ít sẽ kéo dài thời gian lên men, làm tăng chi phí, đồng thời còn dễ nhiễm vi

sinh vật tạp trong quá trình sản xuất. Kết quả thí trình lên men sinh khối thu được được thể hiện ở nghiệm ảnh hưởng của tỷ lệ cấy giống đến quá bảng 11.

Bảng 11. Ảnh hưởng của tỷ lệ cấy giống đến mật độ và hoạt tính đối kháng của vi khuẩn trong quá trình lên men sinh khối

Chủng vi khuẩn	Tỷ lệ tiếp giống							
	5%		7%		10%		15%	
	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)	Mật độ ($\times 10^9$ CFU/mL)	D (mm)
ĐK1	6,42	14	7,81	14	8,27	16	6,84	16
ĐK2	7,33	11	9,87	12	12,4	14	7,41	12

Bảng 12. Điều kiện tối ưu cho quá trình lên men nhân sinh khối

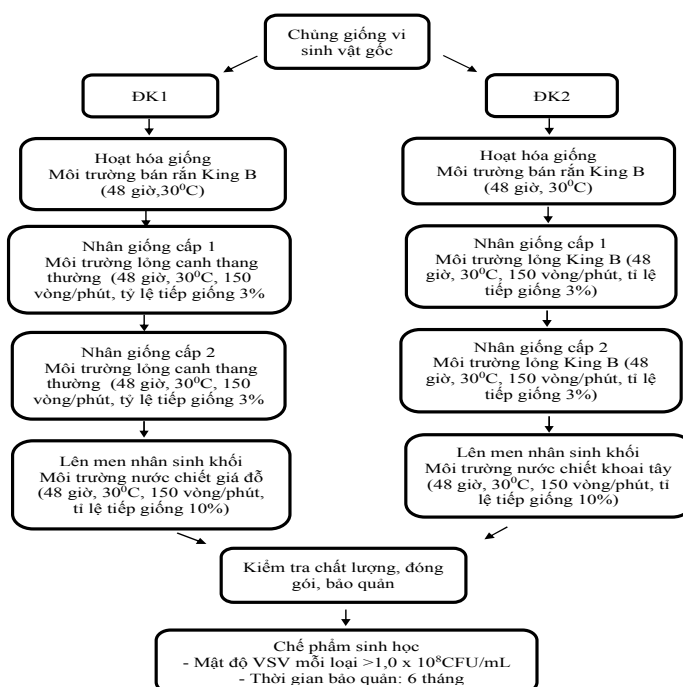
Chủng vi khuẩn	Môi trường nhân sinh khối	Tốc độ khuấy (vòng/phút)	Tỷ lệ tiếp giống (%)
ĐK1	Nước chiết giá đỗ	150	10
ĐK2	Nước chiết khoai tây	150	10

Kết quả thí nghiệm cho thấy mật độ của các chủng vi khuẩn thí nghiệm và kích thước vòng đối kháng đạt cao nhất khi tỷ lệ cấy giống 10% cao hơn kết quả nghiên cứu về tỷ lệ tiếp giống cho quá trình lên men chủng *L.casei* G5 của Nguyễn Thị Thu và cs (2018) [8] là 5%.

Từ kết quả của các thí nghiệm trên đã xác định điều kiện tối ưu cho quá trình lên men sinh khối phục vụ cho sản xuất chế phẩm của hai chủng vi khuẩn ĐK1 và ĐK2 được trình bày ở hình 1.

3.4. Sản xuất và đánh giá chất lượng chế phẩm ở quy mô phòng thí nghiệm

3.4.1. Sản xuất chế phẩm



Hình 1. Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh

Mô tả quy trình:

- Bước 1: Hoạt hóa và nhân giống gốc trên môi trường bán rắn King B: Từ ống nghiệm giữ giống, các chủng vi khuẩn được cấy chuyển một cách riêng biệt sang ống nghiệm chứa môi trường thạch nghiêng, nuôi cấy trong 48 giờ ở nhiệt độ 30°C.

- Bước 2: Nhân giống cấp 1: Lấy 1 vòng que cấy giống gốc cho vào bình tam giác chứa 10 mL môi trường lỏng rồi nuôi ở máy lắc ổn nhiệt trong điều kiện nhiệt độ 30°C, thời gian 48 giờ, 150 vòng/phút. Kiểm tra mật độ bằng cách đo OD600 yêu cầu đạt kết quả lớn hơn 10^9 CFU/mL sẽ tiến hành thực hiện bước tiếp theo.

- Bước 3: Nhân giống cấp 2: Tiến hành chuyển giống cấp 1 vào trong môi trường chuyên tính dịch thể đã được chuẩn bị với tỉ lệ cấp giống là 3% (theo thể tích); nuôi ở máy lắc ổn nhiệt trong điều kiện 30°C, thời gian 48 giờ, 150 vòng/phút. Kiểm tra mật độ bằng cách đo OD600 yêu cầu đạt kết quả lớn hơn 10^9 CFU/mL sẽ tiến hành thực hiện bước tiếp theo.

- Bước 4: Lên men sinh khối: Chuyển giống cấp 2 vào môi trường lên men (nước chiết giá đỗ với ĐK1; nước chiết khoai tây với ĐK2 đã chuẩn bị) trong điều kiện vô trùng với tỉ lệ cấp giống là 10% (theo thể tích). Điều chỉnh các thông số kỹ thuật của hệ thống lên men cho phù hợp với điều kiện sinh trưởng phát triển của từng giống vi sinh vật.

- Bước 5: Tạo sản phẩm, kiểm tra chất lượng, đóng gói và bảo quản: Hỗn hợp sinh khối hai chủng vi khuẩn theo tỷ lệ 1 : 1 (theo thể tích). Kiểm tra chất lượng sản phẩm: Mật độ vi khuẩn hữu ích ngay sau khi phối trộn đạt khoảng 10^9 CFU/mL. Đóng chai, bảo quản nơi thoáng mát, tránh ánh nắng trực tiếp từ mặt trời và cách xa nơi để hoá chất độc hại.

3.4.2. Đánh giá chất lượng chế phẩm

Theo lý lịch chủng gốc hai chủng ĐK1 và ĐK2 không đối kháng nhau, vì vậy chế phẩm sẽ được sản xuất theo phương pháp hợp chủng với tỷ lệ 1 : 1 (theo thể tích); ở quy mô phòng thí nghiệm và được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong vòng 60 ngày. Kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm thu được thể hiện ở bảng 13.

Bảng 13. Chất lượng chế phẩm theo thời gian bảo quản

Thời gian bảo quản	Mật độ vi sinh vật hữu ích ($\times 10^8$ CFU/mL)			Mật độ vi sinh vật tạp (CFU/mL)	
	ĐK1	ĐK2	TCVN 6168 : 2002	Chế phẩm	TCVN 6168 : 2002
Ngay sau khi sản xuất	11,35	12,03	$>10^8$	0	$<10^5$
Sau 1 tháng	10,51	11,38		0	
Sau 3 tháng	9,02	10,04		$1,2 - 2,3 \times 10^2$	
Sau 6 tháng	7,76	8,12		$1,5 - 2,6 \times 10^3$	

Kết quả phân tích cho thấy chất lượng chế phẩm sau sản xuất 6 tháng trong điều kiện bảo quản ở nhiệt độ phòng vẫn có mật độ vi sinh vật hữu ích đạt được từ 7,76 - 8,12 $\times 10^8$ CFU/mL và mật độ vi sinh vật tạp ở mức từ $1,5 \times 10^3$ CFU/mL - $2,6 \times 10^3$ CFU/mL, đạt chất lượng theo TCVN 6168 : 2002.

4. KẾT LUẬN

Xác định được điều kiện nhân sinh khối hai chủng vi khuẩn đối kháng ĐK1, ĐK2 và quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh: Giai đoạn nhân giống cấp 1 và cấp 2 sử dụng môi trường canh thang thường cho ĐK1 và King B cho ĐK2 với pH môi trường là 7, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian 48

giờ, nhiệt độ 30°C, tỷ lệ tiếp giống 3% (theo thể tích). Giai đoạn nhân sinh khối sử dụng môi trường nước chiết giá đỗ cho ĐK1, nước chiết khoai tây cho ĐK2, tốc độ cánh khuấy 150 vòng/phút, thời gian 48 giờ, ở nhiệt độ 30°C, tỷ lệ tiếp giống 10% (theo thể tích). Chế phẩm sinh học dùng để phòng, trừ bệnh thối mềm trên cây lan Hồ điệp được sản xuất từ hỗn hợp sinh khối hai chủng là 1 : 1 (theo thể tích) được bảo quản ở nhiệt độ phòng, nơi thoáng mát, sau 6 tháng mật độ vi sinh vật hữu ích đạt được từ 7,76 - 8,12 $\times 10^8$ CFU/mL; mật độ vi sinh vật tạp ở mức từ $1,5 \times 10^3$ CFU/mL - $2,6 \times 10^3$ CFU/mL, đạt chất lượng theo tiêu chuẩn hiện hành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Tĩnh, Đặng Văn Đông, Nguyễn Văn Tiến, Bùi Thị Hồng, Đinh Thị Dinh, Nguyễn Thị Hồng Nhung (2020). Thực trạng nghiên cứu, sản xuất và tiêu thụ hoa lan Hồ điệp ở miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, số tháng 3, tr. 147-153.
2. Hoàng Ngọc Thuận (2017). Nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển của một số giống hoa lan Hồ điệp mới nhập nội tại Phú Thọ. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, số 5 (4), tr. 30 - 37.
3. S. Sudarsono, J. Elina, Giyanto and D. Sukma (2018). Pathogen Causing Phalaenopsis Soft Rot Disease - 16S rDNA and Virulence Characterisation. *Plant Protect. Sci*, 54(1) : 1 - 8.
4. I Putu Wirya Suputra, Gusti Ngurah Alit Susanta Wirya, Nyoman Bintang Kartika Sari, I Gede Rai Maya Temaja, Ni Luh Putu Citra Innosensia (2022). Identification and Characterization of Soft Rot Bacterial Pathogens on Phalaenopsis Orchid in Bali. *Journal of Plant Protection*, ISSN: 2621-5756, 5 (1): 1 - 6.
5. Sumathi, V. and D. Reetha (2012). Screening of Lactic Acid Bacteria for Their Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(4): 802 - 808.
6. Nguyễn Thị Thu Nga, Nguyễn Văn Khởi (2020). Nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn vùng rễ trong phòng trừ bệnh thối hạt trên cây lúa do vi khuẩn Burkholderia Glumae. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam năm 2020, tr. 81 - 88.
7. Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Xuân Cảnh, Phùng Thị Lệ Quyên (2019). Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy *in vitro* tới khả năng kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của chủng *Bacillus velezensis* YMĐ1. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, số 61 (2), tr. 42 - 46.
8. Nguyễn Thị Thu, Trần Liên Hà, Nguyễn Chí Dũng (2018). Tuyển chọn, định tên và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp Cellulase cao, có hoạt tính Probiotic. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, số 1, tr. 11-18.

STUDY ON PRODUCTION PROCESS OF MICROORGANISM PRODUCT TO RESISTANT WITH
SOFT ROT BACTERIA ON *Phalaenopsis* ORCHIDS

Vu Thi Hoan¹, Phan Quoc Hung¹, Nguyen Van Tinh²

¹ Vietnam National University of Agriculture (VNUA)

² Fruit and Vegetable Research Institute (FAVRI)

Summary

This study was carried out following the study on isolating and selecting bacterial strains capable of antagonizing the bacteria causing soft rot on *Phalaenopsis* orchids with the aim of creating probiotics for the production of *Phalaenopsis* orchids, contributing to increasing economic value and protecting the environment as well as workers' health. As a result, the breeding conditions for level 1 and 2 were determined for the research subjects, including: the appropriate environmental pH is 7, shaking speed 150 rpm, time 48 hours, temperature 30°C. The rate of seeding was 3% (by volume) and normal broth was for DK1, King B medium was for DK2. The conditions for biomass fermentation to produce inoculants are the water environment for extracting bean sprouts for DK1, potato juice for DK2, stirring speed 150 rpm, 48 hours, at a temperature of 30°C, the rate of follow-up is 10%. Biological products used to prevent and prevent soft rot on *Phalaenopsis* orchids are produced from a mixture of 2 biomass strains of 1 : 1 (by volume) which is stored at room temperature, in a cool place, after 6 months of useful microbial density are obtained from $7.76 - 8.12 \times 10^8$ CFU.mL⁻¹, the density of non-useful microorganism from 1.5×10^3 CFU/mL - 2.6×10^3 CFU/mL, meeting current standards.

Keywords: Soft rot disease, *Phalaenopsis*, antagonistic bacteria.

Người phản biện: PGS.TS. Lê Như Kiều

Ngày nhận bài: 26/5/2023

Ngày thông qua phản biện: 28/6/2023

Ngày duyệt đăng: 25/8/2023