



HỘI KHOA HỌC KỸ THUẬT PHÂN TÍCH HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC VIỆT NAM  
VIETNAM ANALYTICAL SCIENCES SOCIETY

ISSN - 0868 - 3224

Tạp chí  
**PHÂN TÍCH HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC**  
*Journal of Analytical Sciences*

TẠP CHÍ PHÂN TÍCH HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC

Tạp chí  
**PHÂN TÍCH**  
**HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC**  
*Journal of Analytical Sciences*

**T - 26**

**Số 1**

**2021**

In 500 cuốn, khổ 19 x 27 cm. Giấy phép xuất bản số 445/GP-BTTTT cấp ngày 24/9/2016.  
Chỉ số: ISN 0868 - 3224. In xong và nộp lưu chiểu tháng 12 năm 2021

**HA NOI**

**TỐI ƯU HÓA THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG TRONG QUÁ TRÌNH LÊN MEN  
CHỨNG VI KHUẨN BACILLUS SUBTILIS GB03, TÁC NHÂN SINH HỌC  
TRONG THUỐC TRỪ NẤM HẠI CÂY TRỒNG**

Đến tòa soạn 01-09-2020

**Phạm Trung Hiếu, Đinh Thị Hiền, Lê Đăng Quang**

Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

**Trần Đại Lâm**

Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

**Lê Thế Tâm**

Trường Đại học Vinh

**Vũ Thị Thoa**

Trung tâm Nghiên cứu Triển khai các Hoạt chất Sinh học, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

**Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thúy**

Viện Sinh học Nhiệt đới

**Hồ Tú Cường**

Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

**Vũ Đình Hoàng**

Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

**SUMMARY**

**OPTIMIZATION OF FERMENTATION MEDIUM FOR BACILLUS SUBTILIS GB03,  
A BIOAGENT OF FUNGICIDE**

*Plackett-Burman matrix and response surface methodology – Box-Behnken were used to optimize the fermentation medium of Bacillus subtilis GB03. Based on the analysis of the Plackett-Burman matrix, the result indicated that yeast extract, molasses, and ammonium sulfate were three main impact factors, which affected the yield of B. subtilis GB03. Then, the optimum combination of the three factors was investigated by the Box–Behnken design of response surface methodology (RSM) to increase the spores of B. subtilis GB03. The maximum spores yield of  $8,761 \times 10^9$  spore/ml was predicted when the concentrations of that yeast extract, molasses, and ammonium sulfate were 14,32 g/l, 18,92 g/l, and 0,19 g/l, respectively. The results of preliminary test in vitro on two fungal including Sclerotium rolfsii and Rhizoctonia solani showed that B. subtilis GB03 had a good inhibition on the growth of these fungal.*

**Keywords:** fermentation, Bacillus subtilis GB03, Plackett-Burman, RSM - Box Behnken, Design Expert®

**1. MỞ ĐẦU**

*Bacillus subtilis* hay còn được gọi "lợi khuẩn suptilit" là một chủng vi khuẩn hình que, gram dương và hiếu khí không bắt buộc [1, 2]. *B. subtilis* còn được gọi là trực khuẩn cò hoặc

trực khuẩn rom vì chúng được tìm thấy chủ yếu trong cò, rom và cá đất, thông thường đất trồng trọt có khoảng  $10^6 - 10^7$  triệu CFU/g. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng chúng phát triển nhiều trong đường tiêu

**TỐI ƯU HÓA THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG TRONG QUÁ TRÌNH LÊN MEN  
CHỨNG VI KHUẨN BACILLUS SUBTILIS GB03, TÁC NHÂN SINH HỌC  
TRONG THUỐC TRỪ NẤM HẠI CÂY TRỒNG**

Đến tòa soạn 01-09-2020

**Phạm Trung Hiếu, Đinh Thị Hiền, Lê Đăng Quang**

Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

**Trần Đại Lâm**

Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

**Lê Thế Tâm**

Trường Đại học Vinh

**Vũ Thị Thoa**

Trung tâm Nghiên cứu Triển khai các Hoạt chất Sinh học, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

**Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thúy**

Viện Sinh học Nhiệt đới

**Hồ Tú Cường**

Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

**Vũ Đình Hoàng**

Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

**SUMMARY**

**OPTIMIZATION OF FERMENTATION MEDIUM FOR BACILLUS SUBTILIS GB03,  
A BIOAGENT OF FUNGICIDE**

*Plackett-Burman matrix and response surface methodology – Box-Behnken were used to optimize the fermentation medium of Bacillus subtilis GB03. Based on the analysis of the Plackett-Burman matrix, the result indicated that yeast extract, molasses, and ammonium sulfate were three main impact factors, which affected the yield of B. subtilis GB03. Then, the optimum combination of the three factors was investigated by the Box–Behnken design of response surface methodology (RSM) to increase the spores of B. subtilis GB03. The maximum spores yield of  $8,761 \times 10^9$  spore/ml was predicted when the concentrations of that yeast extract, molasses, and ammonium sulfate were 14,32 g/l, 18,92 g/l, and 0,19 g/l, respectively. The results of preliminary test in vitro on two fungal including Sclerotium rolfsii and Rhizoctonia solani showed that B. subtilis GB03 had a good inhibition on the growth of these fungal.*

**Keywords:** fermentation, Bacillus subtilis GB03, Plackett-Burman, RSM - Box Behnken, Design Expert®

**1. MỞ ĐẦU**

*Bacillus subtilis* hay còn được gọi "lợi khuẩn suptilit" là một chủng vi khuẩn hình que, gram dương và hiếu khí không bắt buộc [1, 2]. *B. subtilis* còn được gọi là trực khuẩn cò hoặc

trực khuẩn rom vì chúng được tìm thấy chủ yếu trong cò, rom và cá đất, thông thường đất trồng trọt có khoảng  $10^6 - 10^7$  triệu CFU/g. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng chúng phát triển nhiều trong đường tiêu

hóa của người và nhiều loài gia súc khác nhau, nhất là các loài động vật nhai lại [3]. Vi khuẩn này có khả năng sinh bào tử nhằm chống chịu các điều kiện nhiệt độ khắc nghiệt và những thay đổi bất lợi của môi trường sống.

*B. subtilis* là vi khuẩn có lợi và nhiều tiềm năng sản xuất các sản phẩm thương mại ứng dụng trong y học, trong nông nghiệp và trong công nghiệp thực phẩm. *B. subtilis* đã được sử dụng cho các nghiên cứu di truyền và sinh hóa trong vài thập kỷ, một số nghiên cứu đã chỉ ra vi khuẩn có một số hoạt tính đáng chú ý như hoạt tính catalase, sử dụng citrate, khử nitrate, phân giải tinh bột, v.v. [4]. Tuy nhiên, ứng dụng đáng quan tâm nhất là tiềm năng sản xuất thuốc kháng sinh của *B. subtilis*, điều này đã được công nhận qua rất nhiều nghiên cứu trong 50 năm trở lại đây. Một số kháng sinh do *B. subtilis* tổng hợp có thể kể đến như: subtilin, subtilosin, tasA, surfactin, bacilysin, v.v [5]. Ngoài ra, *B. subtilis* còn có hoạt tính kháng một số loài vi sinh vật và nấm gây bệnh khác [6, 7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát các thành phần môi trường của quá trình lên men tạo bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 nhằm tối ưu hóa quá trình bằng ma trận Plackett-Burman để sàng lọc các yếu tố chính ảnh hưởng. Sau đó, tìm ra các thông số tối ưu của các yếu tố chính bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) sử dụng thiết kế Box-Behnken nhằm thu được mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 là lớn nhất trong quá trình lên men vi khuẩn. Đồng thời, chúng tôi tiến hành thử nghiệm định tính hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *B. subtilis* GB03.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Chúng vi sinh vật và môi trường nuôi cấy

Chúng vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 được sử dụng trong nghiên cứu đã được tách ra từ rễ cây trồng trên nền đất sạch và không nhiễm hóa chất. Chúng vi khuẩn đã được nghiên cứu và phát triển thành sản phẩm ở dạng sinh khối khô tại Hàn Quốc do TS. Chang Ho Chung

thuộc Viện Vật liệu Sinh học Jeonju, Hàn Quốc.

### 2.2. Nuôi cấy và xác định mật độ bào tử vi khuẩn

Từ môi trường nhân giống dịch thể ban đầu, pha loãng dịch thể đến khi nồng độ OD = 0,5; tiếp giống dịch thể vào các môi trường khảo sát với tỷ lệ tiếp giống 10%, pH đạt 6,5-7 và nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 24h. Sau 24h tiến hành thu canh trường nuôi cấy, tạo bào tử vi khuẩn bằng phương pháp sốc nhiệt, cụ thể là, lấy canh trường nuôi cấy đun ở 80°C trong 20 phút. Mật độ bào tử vi khuẩn được xác định thông qua phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch. Mẫu được pha loãng và cấy 100 µL trên đĩa thạch, số lượng tế bào có trong mẫu theo công thức:  $\text{bào tử/ml} = C \times 10^{n+1}$  với C: số khuẩn lạc trung bình đếm được trên 2 đĩa petri ở nồng độ đã chọn (có số khuẩn lạc nằm trong khoảng từ 25-250 khuẩn lạc/đĩa); n: hệ số pha loãng tương ứng.

### 2.3. Tối ưu hóa điều kiện lên men

#### 2.3.1. Chọn lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng thiết kế Plackett-Burman

Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman với 07 yếu tố trong 12 thí nghiệm (Bảng 1) cho phép đánh giá mức ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình lên men, mỗi yếu tố được kiểm tra ở hai cấp độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1) [8]. Từ kết quả nghiên cứu trước có liên quan, môi trường được chọn có thành phần gồm: 15 g/l ri đường; 15 g/l glucose; 10g/l yeast extract; 0,4 g/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,03 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,175 g/l ammonium sunfat. Chúng tôi chọn các yếu tố sử dụng trong nghiên cứu này là: Ri đường, glucose, magie sunfat (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), kali hydrophosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), nitrogen (yeast extract), kẽm sunfat (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) và amoni sunfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) được liệt kê trong bảng 2. Chương trình "Design Expert® 10.0.8" (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ) được sử dụng để xử lý, phân tích trong nghiên cứu này.

hóa của người và nhiều loài gia súc khác nhau, nhất là các loài động vật nhai lại [3]. Vi khuẩn này có khả năng sinh bào tử nhằm chống chịu các điều kiện nhiệt độ khắc nghiệt và những thay đổi bất lợi của môi trường sống.

*B. subtilis* là vi khuẩn có lợi và nhiều tiềm năng sản xuất các sản phẩm thương mại ứng dụng trong y học, trong nông nghiệp và trong công nghiệp thực phẩm. *B. subtilis* đã được sử dụng cho các nghiên cứu di truyền và sinh hóa trong vài thập kỷ, một số nghiên cứu đã chỉ ra vi khuẩn có một số hoạt tính đáng chú ý như hoạt tính catalase, sử dụng citrate, khử nitrate, phân giải tinh bột, v.v. [4]. Tuy nhiên, ứng dụng đáng quan tâm nhất là tiềm năng sản xuất thuốc kháng sinh của *B. subtilis*, điều này đã được công nhận qua rất nhiều nghiên cứu trong 50 năm trở lại đây. Một số kháng sinh do *B. subtilis* tổng hợp có thể kể đến như: subtilin, subtilosin, tasA, surfactin, bacilysin, v.v [5]. Ngoài ra, *B. subtilis* còn có hoạt tính kháng một số loài vi sinh vật và nấm gây bệnh khác [6, 7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát các thành phần môi trường của quá trình lên men tạo bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 nhằm tối ưu hóa quá trình bằng ma trận Plackett-Burman để sàng lọc các yếu tố chính ảnh hưởng. Sau đó, tìm ra các thông số tối ưu của các yếu tố chính bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) sử dụng thiết kế Box-Behnken nhằm thu được mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 là lớn nhất trong quá trình lên men vi khuẩn. Đồng thời, chúng tôi tiến hành thử nghiệm định tính hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *B. subtilis* GB03.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Chúng vi sinh vật và môi trường nuôi cấy

Chúng vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 được sử dụng trong nghiên cứu đã được tách ra từ rễ cây trồng trên nền đất sạch và không nhiễm hóa chất. Chúng vi khuẩn đã được nghiên cứu và phát triển thành sản phẩm ở dạng sinh khối khô tại Hàn Quốc do TS. Chang Ho Chung

thuộc Viện Vật liệu Sinh học Jeonju, Hàn Quốc.

### 2.2. Nuôi cấy và xác định mật độ bào tử vi khuẩn

Từ môi trường nhân giống dịch thể ban đầu, pha loãng dịch thể đến khi nồng độ OD = 0,5; tiếp giống dịch thể vào các môi trường khảo sát với tỷ lệ tiếp giống 10%, pH đạt 6,5-7 và nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 24h. Sau 24h tiến hành thu canh trường nuôi cấy, tạo bào tử vi khuẩn bằng phương pháp sốc nhiệt, cụ thể là, lấy canh trường nuôi cấy đun ở 80°C trong 20 phút. Mật độ bào tử vi khuẩn được xác định thông qua phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch. Mẫu được pha loãng và cấy 100 µL trên đĩa thạch, số lượng tế bào có trong mẫu theo công thức:  $\text{bào tử/ml} = C \times 10^{n+1}$  với C: số khuẩn lạc trung bình đếm được trên 2 đĩa petri ở nồng độ đã chọn (có số khuẩn lạc nằm trong khoảng từ 25-250 khuẩn lạc/đĩa); n: hệ số pha loãng tương ứng.

### 2.3. Tối ưu hóa điều kiện lên men

#### 2.3.1. Chọn lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng thiết kế Plackett-Burman

Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman với 07 yếu tố trong 12 thí nghiệm (Bảng 1) cho phép đánh giá mức ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình lên men, mỗi yếu tố được kiểm tra ở hai cấp độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1) [8]. Từ kết quả nghiên cứu trước có liên quan, môi trường được chọn có thành phần gồm: 15 g/l ri đường; 15 g/l glucose; 10g/l yeast extract; 0,4 g/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,03 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,175 g/l ammonium sunfat. Chúng tôi chọn các yếu tố sử dụng trong nghiên cứu này là: Ri đường, glucose, magie sunfat (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), kali hydrophosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), nitrogen (yeast extract), kẽm sunfat (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) và amoni sunfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) được liệt kê trong bảng 2. Chương trình "Design Expert® 10.0.8" (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ) được sử dụng để xử lý, phân tích trong nghiên cứu này.

Bảng 1. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman

Thí nghiệm	Các biến							Mật độ bào tử vi khuẩn (10 <sup>9</sup> bào tử/ml)	
	X <sub>1</sub> *	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	Thực nghiệm	Mô hình
1	-1	1	1	-1	1	1	1	5,7	5,77
2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,3	1,72
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1,3	0,27
4	-1	-1	-1	1	-1	1	1	3,7	3,73
5	1	-1	1	1	1	-1	-1	5,8	6,8
6	-1	-1	1	-1	1	1	-1	4,3	4,23
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	5,8	6,03
8	1	-1	1	1	-1	1	1	6,5	6,47
9	-1	1	-1	1	1	-1	1	4,7	5,28
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	5,6	5,98
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	10,5	9,47
12	1	1	-1	1	1	1	-1	8,3	8,07

\*X<sub>1</sub>: rỉ đường; X<sub>2</sub>: Glucose; X<sub>3</sub>: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; X<sub>4</sub>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; X<sub>5</sub>: Yeast extract; X<sub>6</sub>: ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; X<sub>7</sub>: Amoni sunfat

Bảng 2. Các biến trong ma trận Plackett-Burman và ảnh hưởng của chúng

Yếu tố	Đơn vị	Kí hiệu	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
			Thấp (-1)	Cao (+1)	Ảnh hưởng	Prob > P
Rỉ đường	g/l	X <sub>1</sub>	10	20	45,54 <sup>a</sup>	0,0025
Glucose	g/l	X <sub>2</sub>	10	20	0,048 <sup>b</sup>	0,8368
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	g/l	X <sub>3</sub>	0,3	0,5	2,56 <sup>b</sup>	0,1847
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g/l	X <sub>4</sub>	4	6	0,83 <sup>b</sup>	0,4142
Yeast extract	g/l	X <sub>5</sub>	5	15	22,46 <sup>a</sup>	0,0090
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	g/l	X <sub>6</sub>	0,01	0,05	2,56 <sup>b</sup>	0,1847
Amoni sunfat	g/l	X <sub>7</sub>	0,1	0,25	9,66 <sup>a</sup>	0,0360

<sup>a</sup>Có nghĩa độ tin cậy α=0,05; <sup>b</sup>Không có ý nghĩa ở độ tin cậy α=0,05

### 2.3.2. Tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt với mô hình Box-Behnken

Trong nghiên cứu này, sau khi xác định được ba yếu tố chính từ kết quả sàng lọc Plackett-Burman. Ba yếu tố trên sẽ được xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu bằng thiết kế Box-Behnken ở 3 mức (-1, 0 và +1) (bảng 3) với 15 thí nghiệm, trong đó có 3 thí nghiệm trung tâm (bảng 4).

Hàm đáp ứng được chọn là số lượng bào tử (Y, Bào tử/ml dịch nuôi cấy). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc hai:  $Y = B_0 + B_1 \times X_1 + B_2 \times X_2 + B_3 \times X_3 + B_{12} \times X_1 \times X_2 +$

$B_{13} \times X_1 \times X_3 + B_{23} \times X_2 \times X_3 + B_{11} \times X_1^2 + B_{22} \times X_2^2 + B_{33} \times X_3^2$ . Trong đó B<sub>0</sub> là hệ số hồi quy bậc 0. B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> và B<sub>3</sub> là các hệ số bậc 1; B<sub>11</sub>, B<sub>22</sub> và B<sub>33</sub> là hệ số bậc 2; B<sub>12</sub>, B<sub>23</sub> và B<sub>13</sub> là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>; X<sub>11</sub>, X<sub>22</sub>, X<sub>33</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>23</sub> và X<sub>13</sub> là các biến độc lập. Số liệu được phân tích bằng chương trình "Design Expert® 10.0.8"(Stat-Ease Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ). Thông qua kết quả phân tích xác định được mức tối ưu của các yếu tố khảo sát ảnh hưởng đến quá trình lên men, số lượng bào tử của vi khuẩn *B. subtilis* GB03.

Bảng 1. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman

Thí nghiệm	Các biến							Mật độ bào tử vi khuẩn (10 <sup>9</sup> bào tử/ml)	
	X <sub>1</sub> *	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	Thực nghiệm	Mô hình
1	-1	1	1	-1	1	1	1	5,7	5,77
2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,3	1,72
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1,3	0,27
4	-1	-1	-1	1	-1	1	1	3,7	3,73
5	1	-1	1	1	1	-1	-1	5,8	6,8
6	-1	-1	1	-1	1	1	-1	4,3	4,23
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	5,8	6,03
8	1	-1	1	1	-1	1	1	6,5	6,47
9	-1	1	-1	1	1	-1	1	4,7	5,28
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	5,6	5,98
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	10,5	9,47
12	1	1	-1	1	1	1	-1	8,3	8,07

\*X<sub>1</sub>: rỉ đường; X<sub>2</sub>: Glucose; X<sub>3</sub>: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; X<sub>4</sub>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; X<sub>5</sub>: Yeast extract; X<sub>6</sub>: ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; X<sub>7</sub>: Amoni sunfat

Bảng 2. Các biến trong ma trận Plackett-Burman và ảnh hưởng của chúng

Yếu tố	Đơn vị	Kí hiệu	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
			Thấp (-1)	Cao (+1)	Ảnh hưởng	Prob > P
Rỉ đường	g/l	X <sub>1</sub>	10	20	45,54 <sup>a</sup>	0,0025
Glucose	g/l	X <sub>2</sub>	10	20	0,048 <sup>b</sup>	0,8368
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	g/l	X <sub>3</sub>	0,3	0,5	2,56 <sup>b</sup>	0,1847
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g/l	X <sub>4</sub>	4	6	0,83 <sup>b</sup>	0,4142
Yeast extract	g/l	X <sub>5</sub>	5	15	22,46 <sup>a</sup>	0,0090
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	g/l	X <sub>6</sub>	0,01	0,05	2,56 <sup>b</sup>	0,1847
Amoni sunfat	g/l	X <sub>7</sub>	0,1	0,25	9,66 <sup>a</sup>	0,0360

<sup>a</sup>Có nghĩa độ tin cậy α=0,05; <sup>b</sup>Không có ý nghĩa ở độ tin cậy α=0,05

### 2.3.2. Tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt với mô hình Box-Behnken

Trong nghiên cứu này, sau khi xác định được ba yếu tố chính từ kết quả sàng lọc Plackett-Burman. Ba yếu tố trên sẽ được xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu bằng thiết kế Box-Behnken ở 3 mức (-1, 0 và +1) (bảng 3) với 15 thí nghiệm, trong đó có 3 thí nghiệm trung tâm (bảng 4).

Hàm đáp ứng được chọn là số lượng bào tử (Y, Bào tử/ml dịch nuôi cấy). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc hai:  $Y = B_0 + B_1 \times X_1 + B_2 \times X_2 + B_3 \times X_3 + B_{12} \times X_1 \times X_2 +$

$B_{13} \times X_1 \times X_3 + B_{23} \times X_2 \times X_3 + B_{11} \times X_1^2 + B_{22} \times X_2^2 + B_{33} \times X_3^2$ . Trong đó B<sub>0</sub> là hệ số hồi quy bậc 0. B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> và B<sub>3</sub> là các hệ số bậc 1; B<sub>11</sub>, B<sub>22</sub> và B<sub>33</sub> là hệ số bậc 2; B<sub>12</sub>, B<sub>23</sub> và B<sub>13</sub> là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>; X<sub>11</sub>, X<sub>22</sub>, X<sub>33</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>23</sub> và X<sub>13</sub> là các biến độc lập. Số liệu được phân tích bằng chương trình "Design Expert® 10.0.8"(Stat-Ease Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ). Thông qua kết quả phân tích xác định được mức tối ưu của các yếu tố khảo sát ảnh hưởng đến quá trình lên men, số lượng bào tử của vi khuẩn *B. subtilis* GB03.

Bảng 3. Nồng độ ba yếu tố sử dụng trong Box-Behnken

Yếu tố	Đơn vị	Kí hiệu	Mức		
			-1	0	+1
Yeast extract	g/l	X <sub>1</sub>	5	10	15
Ri đường	g/l	X <sub>2</sub>	10	15	20
Amoni sunfat	g/l	X <sub>3</sub>	0,1	0,175	0,25

Bảng 4. Kế hoạch thực nghiệm theo mô hình Box-Behnken để tối ưu hóa quá trình lên men

TN	Các biến			Mật độ bào tử vi khuẩn (10 <sup>9</sup> bào tử/ml)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Thực nghiệm	Mô hình
1	-1	-1	0	5,7	5,612
2	+1	-1	0	7,3	7,412
3	-1	+1	0	7,9	7,787
4	+1	+1	0	8,6	8,687
5	-1	0	-1	5,7	5,787
6	+1	0	-1	7,9	7,787
7	-1	0	+1	7,6	7,712
8	+1	0	+1	8,5	8,412
9	0	-1	-1	5,5	5,500
10	0	+1	-1	7,6	7,625
11	0	-1	+1	7,2	7,175
12	0	+1	+1	8,5	8,500
13	0	0	0	8,1	8,133
14	0	0	0	8,2	8,133
15	0	0	0	8,1	8,133

### 2.3.3. Định tính hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *B. subtilis* GB03

Hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *B. subtilis* GB03 được thử trên các đĩa thạch petri với môi trường PDA. Thành phần môi trường gồm: khoai tây 250 g; đường glucose 15 g; agar 15 g ở điều kiện pH: 6.8-7.0. Môi trường trước khi sử dụng được hấp tiệt trùng tại nhiệt độ 121°C và áp suất 1 atm. Que cấy được nhúng vào dịch lên men vi khuẩn *B. subtilis* GB03 thu được tại điều kiện tối ưu, sau đó cấy vi khuẩn lên bề mặt môi trường PDA theo các đường thẳng hoặc ô để quan sát khả năng ức chế hai nấm là *Sclerotium rolfsii* (gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng) và *Rhizoctonia solani* (gây bệnh khô vằn). Nhân thạch chứa nấm giống được đặt vào

bốn điểm cách đều nhau trong đĩa petri. Các đĩa petri đã được cấy giống được nuôi ở nhiệt độ 25°C. Định tính hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn dựa trên đường kính tán nấm của mẫu thí nghiệm so với mẫu đối chứng âm là môi trường PDA không chứa vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Quan sát và chụp ảnh sự phát triển của đường kính tán nấm sau 1 ngày và 2 ngày.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sàng lọc các yếu tố chính ảnh hưởng đến sản lượng vi khuẩn *B. subtilis* GB03

Tiến hành thí nghiệm theo thiết kế ma trận Plackett-Burman với bảy yếu tố được chọn để đánh giá bao gồm: ri đường, glucose, magie sunfat (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), kali hydrophosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), nitrogen (yeast extract), kẽm sunfat (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) và amoni sunfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) với hai mức thấp (-1) và cao (+1). Ma trận Plackett-Burman thu được mật độ bào tử vi khuẩn GB03 từ 0,27 – 9,47 (10<sup>9</sup> bào tử/ml) (Bảng 1). Giá trị ảnh hưởng của từng yếu tố lên sản lượng vi khuẩn GB03 được xử lý bằng phần mềm Design Expert® 10.0.8 (Bảng 2). Yếu tố nào có giá trị ảnh hưởng dương và lớn sẽ ảnh hưởng tới mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Kết quả thu được từ Bảng 2 cho thấy cả bảy yếu tố sàng lọc đều có ảnh hưởng dương (+) tới sự phát triển mật độ bào tử của vi khuẩn. Tuy nhiên, chỉ ba yếu tố ri đường, yeast extract và amoni sunfat có mức ý nghĩa  $\alpha=0,05$  ( $p\text{-value} < 0,05$ ), đồng thời cũng có có giá trị ảnh hưởng lớn nhất. Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn ri đường, yeast extract và amoni sunfat cho thiết kế thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt với mô hình Box-Behnken. Trong một số nghiên cứu tối ưu hóa môi trường lên men vi khuẩn *B. subtilis* trước đây, Zhang Shiwei và cộng sự (2006) đã chọn 3 yếu tố dịch chiết từ ngô (corn steep liquor-CSL), bột ngô và amoni clorua [9]; Zhang Li-xia và cộng sự (2006) chọn bột ngô, bột đậu và CaCO<sub>3</sub> [10].

#### 3.2. Thực nghiệm tối ưu hóa giá trị của các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03

Sau khi sàng lọc được các yếu tố chính ảnh hưởng là ri đường, yeast extract và amoni sunfat. Chúng tôi tiến hành quy hoạch hóa thực nghiệm theo phương pháp bố trí ma trận của

Bảng 3. Nồng độ ba yếu tố sử dụng trong Box-Behnken

Yếu tố	Đơn vị	Kí hiệu	Mức		
			-1	0	+1
Yeast extract	g/l	X <sub>1</sub>	5	10	15
Ri đường	g/l	X <sub>2</sub>	10	15	20
Amoni sunfat	g/l	X <sub>3</sub>	0,1	0,175	0,25

Bảng 4. Kế hoạch thực nghiệm theo mô hình Box-Behnken để tối ưu hóa quá trình lên men

TN	Các biến			Mật độ bào tử vi khuẩn (10 <sup>9</sup> bào tử/ml)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Thực nghiệm	Mô hình
1	-1	-1	0	5,7	5,612
2	+1	-1	0	7,3	7,412
3	-1	+1	0	7,9	7,787
4	+1	+1	0	8,6	8,687
5	-1	0	-1	5,7	5,787
6	+1	0	-1	7,9	7,787
7	-1	0	+1	7,6	7,712
8	+1	0	+1	8,5	8,412
9	0	-1	-1	5,5	5,500
10	0	+1	-1	7,6	7,625
11	0	-1	+1	7,2	7,175
12	0	+1	+1	8,5	8,500
13	0	0	0	8,1	8,133
14	0	0	0	8,2	8,133
15	0	0	0	8,1	8,133

### 2.3.3. Định tính hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *B. subtilis* GB03

Hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *B. subtilis* GB03 được thử trên các đĩa thạch petri với môi trường PDA. Thành phần môi trường gồm: khoai tây 250 g; đường glucose 15 g; agar 15 g ở điều kiện pH: 6.8-7.0. Môi trường trước khi sử dụng được hấp tiệt trùng tại nhiệt độ 121°C và áp suất 1 atm. Que cấy được nhúng vào dịch lên men vi khuẩn *B. subtilis* GB03 thu được tại điều kiện tối ưu, sau đó cấy vi khuẩn lên bề mặt môi trường PDA theo các đường thẳng hoặc ô để quan sát khả năng ức chế hai nấm là *Sclerotium rolfsii* (gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng) và *Rhizoctonia solani* (gây bệnh khô vằn). Nhân thạch chứa nấm giống được đặt vào

bốn điểm cách đều nhau trong đĩa petri. Các đĩa petri đã được cấy giống được nuôi ở nhiệt độ 25°C. Định tính hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn dựa trên đường kính tán nấm của mẫu thí nghiệm so với mẫu đối chứng âm là môi trường PDA không chứa vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Quan sát và chụp ảnh sự phát triển của đường kính tán nấm sau 1 ngày và 2 ngày.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sàng lọc các yếu tố chính ảnh hưởng đến sản lượng vi khuẩn *B. subtilis* GB03

Tiến hành thí nghiệm theo thiết kế ma trận Plackett-Burman với bảy yếu tố được chọn để đánh giá bao gồm: ri đường, glucose, magie sunfat (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), kali hydrophosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), nitrogen (yeast extract), kẽm sunfat (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) và amoni sunfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) với hai mức thấp (-1) và cao (+1). Ma trận Plackett-Burman thu được mật độ bào tử vi khuẩn GB03 từ 0,27 – 9,47 (10<sup>9</sup> bào tử/ml) (Bảng 1). Giá trị ảnh hưởng của từng yếu tố lên sản lượng vi khuẩn GB03 được xử lý bằng phần mềm Design Expert® 10.0.8 (Bảng 2). Yếu tố nào có giá trị ảnh hưởng dương và lớn sẽ ảnh hưởng tới mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Kết quả thu được từ Bảng 2 cho thấy cả bảy yếu tố sàng lọc đều có ảnh hưởng dương (+) tới sự phát triển mật độ bào tử của vi khuẩn. Tuy nhiên, chỉ ba yếu tố ri đường, yeast extract và amoni sunfat có mức ý nghĩa  $\alpha=0,05$  ( $p\text{-value} < 0,05$ ), đồng thời cũng có có giá trị ảnh hưởng lớn nhất. Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn ri đường, yeast extract và amoni sunfat cho thiết kế thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt với mô hình Box-Behnken. Trong một số nghiên cứu tối ưu hóa môi trường lên men vi khuẩn *B. subtilis* trước đây, Zhang Shiwei và cộng sự (2006) đã chọn 3 yếu tố dịch chiết từ ngô (corn steep liquor-CSL), bột ngô và amoni clorua [9]; Zhang Li-xia và cộng sự (2006) chọn bột ngô, bột đậu và CaCO<sub>3</sub> [10].

#### 3.2. Thực nghiệm tối ưu hóa giá trị của các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03

Sau khi sàng lọc được các yếu tố chính ảnh hưởng là ri đường, yeast extract và amoni sunfat. Chúng tôi tiến hành quy hoạch hóa thực nghiệm theo phương pháp bố trí ma trận của

quy hoạch thực nghiệm kế hoạch bậc hai trực giao Box-Behnken với miền khảo sát ba yếu tố: yeast extract ( $X_1$ ), rỉ đường ( $X_2$ ) và amoni sunfat ( $X_3$ ) nhằm xem xét ảnh hưởng của ba nhân tố này lên sự phát triển của vi khuẩn, đồng thời xác định giá trị tối ưu nhất của ba yếu tố trên cho quá trình lên men. Trong thiết kế Box-Behnken mỗi yếu tố sẽ được đánh giá ở ba mức tương ứng là -1; 0 và +1. Các thí nghiệm lên men thu nhận vi khuẩn được thực hiện trên ba yếu tố gồm 15 công thức, trong đó 3 lần lặp lại của các điểm trung tâm được thể hiện trong bảng 4 với các giá trị hàm đáp ứng. Kết quả phân tích ANOVA (Bảng 5) cho thấy

Bảng 5. Kết quả phân tích ANOVA tối ưu hóa quá trình lên men các yếu tố

Source	Tổng bình phương	Bậc tự do	Sai số chuẩn	Ảnh hưởng	F – Value	Prob > P
Model	15,28	9	0,077	1,70	95,20	< 0,0001
$X_1$	3,64	1	0,047	3,64	204,39	< 0,0001
$X_2$	5,95	1	0,047	5,95	333,71	< 0,0001
$X_3$	3,25	1	0,047	3,25	182,31	< 0,0001
$X_1X_2$	0,20	1	0,067	0,20	11,36	0,0199
$X_1X_3$	0,42	1	0,067	0,42	23,69	0,0046
$X_2X_3$	0,16	1	0,067	0,16	8,97	0,0303
$X_1^2$	0,26	1	0,069	0,26	14,72	0,0122
$X_2^2$	0,89	1	0,069	0,89	50,05	0,0009
$X_3^2$	0,72	1	0,069	0,72	40,39	0,0014
Lack of fit	0,083	3		0,028	8,25	0,1100
Sai số	0,00667	2				
Tổng	15,37	14				

$R^2=0,9942$ ; CV=1,78%;  $R^2$ -điều chỉnh bằng=0,9838;  $R^2$ -dự đoán=0,9131

Từ những kết quả trên thu được phương trình hồi quy như sau: mật độ bào tử vi khuẩn ( $10^9$  bào tử/ml) =  $-9,45463 + 0,635 \times X_1 + 0,94583 \times X_2 + 52,64815 \times X_3 - 0,009 \times X_1 \times X_2 - 0,86667 \times X_1 \times X_3 - 0,53333 \times X_2 \times X_3 - 0,010667 \times X_1^2 - 0,019667 \times X_2^2 - 78,51852 \times X_3^2$   
Trong vùng khảo sát, phương trình hồi quy cho thấy giá trị mật độ bào tử vi khuẩn chịu ảnh

mô hình có giá trị F = 95,20 có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,0001$ ) và Lack of fit = 8,25 không có ý nghĩa thống kê ( $P=0,11 > 0,05$ ), khẳng định sự tương thích của mô hình với điều kiện tiến hành khảo sát thí nghiệm. Hệ số hồi quy  $R^2=0,9942 > 0,75$  khẳng định trên 99% các biến số được phản ánh bởi mô hình bề mặt đáp ứng miêu tả quá trình lên men tạo bào tử vi khuẩn, điều này chứng tỏ mô hình tương thích thực nghiệm. Hơn nữa, giá trị  $R^2$  dự đoán = 0,9131 phù hợp với  $R^2$  điều chỉnh = 0,9838 (độ lệch 0,0707 < 0,2), tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 40,69 > 4 thể hiện tín hiệu đầy đủ.

hưởng bậc 1, bậc 2 của ba yếu tố thành phần yeast extract, rỉ đường, amoni sunfat và chịu ảnh hưởng đồng thời của các cặp nhân tố yeast extract\*rỉ đường, yeast extract\*amoni sunfat, rỉ đường\*amoni sunfat.

quy hoạch thực nghiệm kế hoạch bậc hai trực giao Box-Behnken với miền khảo sát ba yếu tố: yeast extract ( $X_1$ ), rỉ đường ( $X_2$ ) và amoni sunfat ( $X_3$ ) nhằm xem xét ảnh hưởng của ba nhân tố này lên sự phát triển của vi khuẩn, đồng thời xác định giá trị tối ưu nhất của ba yếu tố trên cho quá trình lên men. Trong thiết kế Box-Behnken mỗi yếu tố sẽ được đánh giá ở ba mức tương ứng là -1; 0 và +1. Các thí nghiệm lên men thu nhận vi khuẩn được thực hiện trên ba yếu tố gồm 15 công thức, trong đó 3 lần lặp lại của các điểm trung tâm được thể hiện trong bảng 4 với các giá trị hàm đáp ứng. Kết quả phân tích ANOVA (Bảng 5) cho thấy

Bảng 5. Kết quả phân tích ANOVA tối ưu hóa quá trình lên men các yếu tố

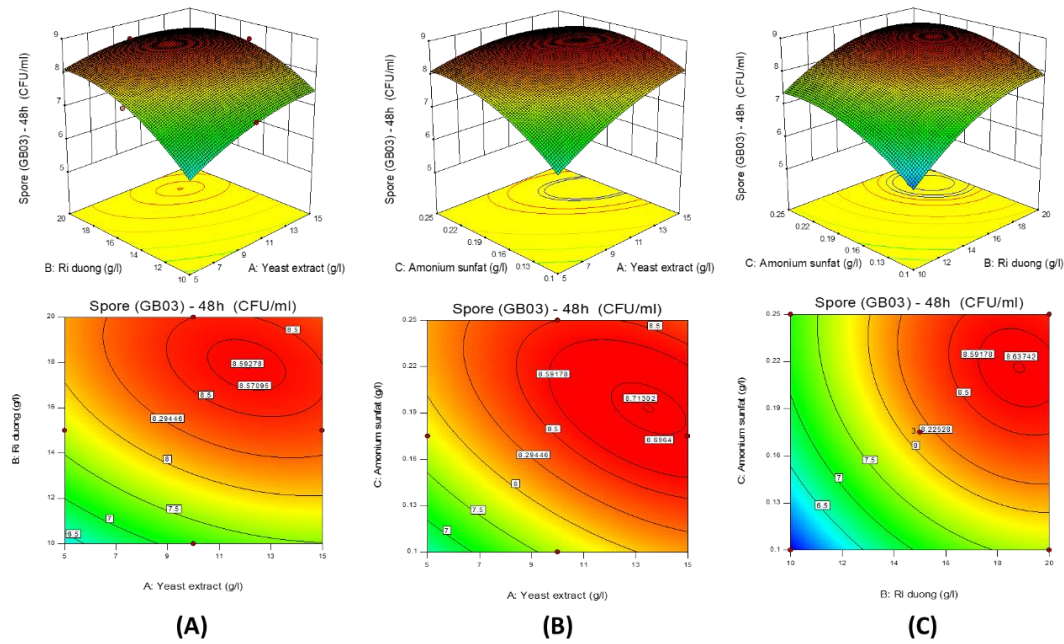
Source	Tổng bình phương	Bậc tự do	Sai số chuẩn	Ảnh hưởng	F – Value	Prob > P
Model	15,28	9	0,077	1,70	95,20	< 0,0001
$X_1$	3,64	1	0,047	3,64	204,39	< 0,0001
$X_2$	5,95	1	0,047	5,95	333,71	< 0,0001
$X_3$	3,25	1	0,047	3,25	182,31	< 0,0001
$X_1X_2$	0,20	1	0,067	0,20	11,36	0,0199
$X_1X_3$	0,42	1	0,067	0,42	23,69	0,0046
$X_2X_3$	0,16	1	0,067	0,16	8,97	0,0303
$X_1^2$	0,26	1	0,069	0,26	14,72	0,0122
$X_2^2$	0,89	1	0,069	0,89	50,05	0,0009
$X_3^2$	0,72	1	0,069	0,72	40,39	0,0014
Lack of fit	0,083	3		0,028	8,25	0,1100
Sai số	0,00667	2				
Tổng	15,37	14				

$R^2=0,9942$ ; CV=1,78%;  $R^2$ -điều chỉnh bằng=0,9838;  $R^2$ -dự đoán=0,9131

Từ những kết quả trên thu được phương trình hồi quy như sau: mật độ bào tử vi khuẩn ( $10^9$  bào tử/ml) =  $-9,45463 + 0,635 \times X_1 + 0,94583 \times X_2 + 52,64815 \times X_3 - 0,009 \times X_1 \times X_2 - 0,86667 \times X_1 \times X_3 - 0,53333 \times X_2 \times X_3 - 0,010667 \times X_1^2 - 0,019667 \times X_2^2 - 78,51852 \times X_3^2$   
Trong vùng khảo sát, phương trình hồi quy cho thấy giá trị mật độ bào tử vi khuẩn chịu ảnh

mô hình có giá trị F = 95,20 có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,0001$ ) và Lack of fit = 8,25 không có ý nghĩa thống kê ( $P=0,11 > 0,05$ ), khẳng định sự tương thích của mô hình với điều kiện tiến hành khảo sát thí nghiệm. Hệ số hồi quy  $R^2=0,9942 > 0,75$  khẳng định trên 99% các biến số được phản ánh bởi mô hình bề mặt đáp ứng miêu tả quá trình lên men tạo bào tử vi khuẩn, điều này chứng tỏ mô hình tương thích thực nghiệm. Hơn nữa, giá trị  $R^2$  dự đoán = 0,9131 phù hợp với  $R^2$  điều chỉnh = 0,9838 (độ lệch 0,0707 < 0,2), tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 40,69 > 4 thể hiện tín hiệu đầy đủ.

hưởng bậc 1, bậc 2 của ba yếu tố thành phần yeast extract, rỉ đường, amoni sunfat và chịu ảnh hưởng đồng thời của các cặp nhân tố yeast extract\*rỉ đường, yeast extract\*amoni sunfat, rỉ đường\*amoni sunfat.



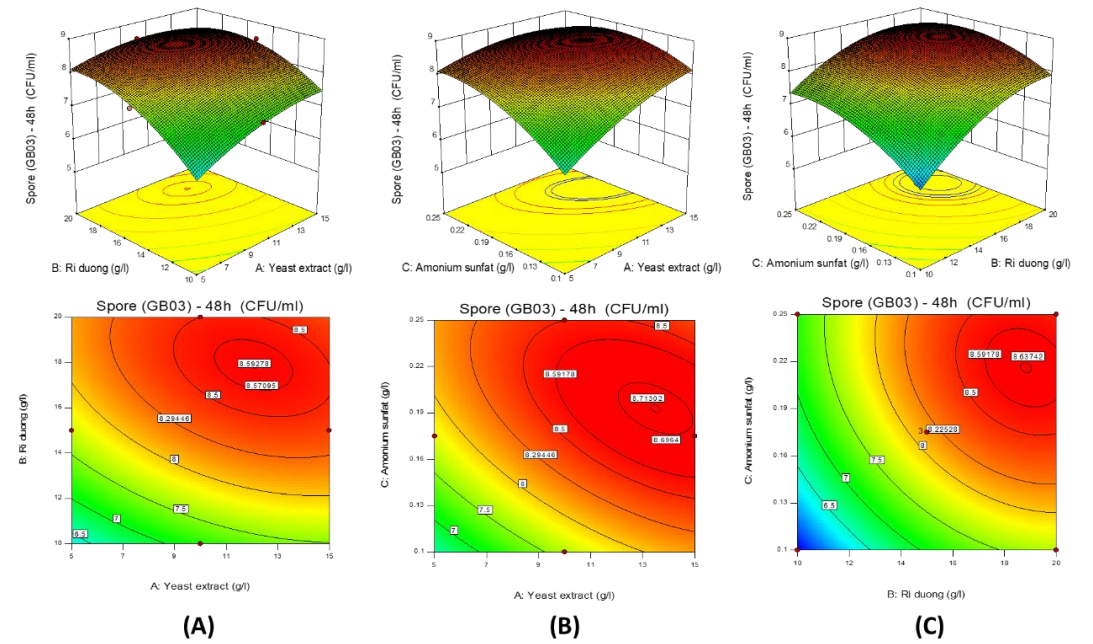
Hình 1. Các bề mặt đáp ứng biểu diễn tương quan các yếu tố ảnh hưởng với mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03: (A). Tương quan giữa yeast extract ( $X_1$ ) và ri đường ( $X_2$ ); (B). yeast extract ( $X_1$ ) và amoni sunfat ( $X_3$ ); (C). Tương quan giữa ri đường ( $X_2$ ) và amoni sunfat ( $X_3$ )

Biểu đồ đáp ứng bề mặt dạng 3D Surface và Contour tương ứng (Hình 1) thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố và từ biểu đồ này có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố làm cho hàm đáp ứng đạt cực đại. Xác định được mức độ tối ưu của mỗi biến cho mật độ vi khuẩn tối ưu với đồ thị bề mặt ba chiều có trục Z là mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 và hai biến độc lập bất kỳ trong ba yếu tố khảo sát, trong khi duy trì biến còn lại ở mức tối ưu của chúng. Từ đồ thị 1A, nhận thấy khi nồng độ ri đường tăng dần tới 19 g/l và yeast extract tới 14 g/l thì mật độ bào tử vi khuẩn tăng dần đến cực trị. Từ đồ thị 1B cho thấy mật độ bào tử vi khuẩn đạt cực đại khi nồng độ yeast extract trong khoảng 13-15 g/l và amoni sunfat trong khoảng 0,19-0,22 g/l. Tương tự, theo đồ thị 1C, nồng độ amoni sunfat tăng dần đến 0,22 g/l và ri đường đến 19 g/l thì mật độ vi khuẩn đạt cực trị. Hình 1A và 1C cho thấy mật độ vi khuẩn ảnh hưởng nhiều bởi yeast extract và amoni sunfat. Trong khi đó, ri đường ít ảnh hưởng đến mật độ bào tử của vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Từ các dữ liệu thu được bằng phần mềm Design Expert® 10.0.8 và phương

trình hồi quy, chúng tôi xác định được mức tối ưu của các ba yếu tố khảo sát lần lượt như sau: 14,32 g/l yeast extract; 18,92 g/l ri đường và 0,19 g/l amoni sunfat. Mô hình thí nghiệm dự đoán mật độ bào tử vi khuẩn tối ưu đạt được là  $8,761 \times 10^9$  bào tử/ml sau 48 giờ thí nghiệm. Mô hình được kiểm chứng khi thực hiện thí nghiệm với các giá trị tối ưu của ba yếu tố khảo sát cho kết quả mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đạt  $8,7 \times 10^9$  bào tử/ml. Trong nghiên cứu trước đây của Zhang Li-xia và cộng sự (2006) đã tối ưu hóa môi trường lên men vi khuẩn *B. subtilis* đạt mật độ bào tử vi khuẩn từ  $1,18 \times 10^{10}$  bào tử/ml [10].

### 3.3. Bước đầu thử nghiệm hoạt tính kháng nấm

Bào tử của vi khuẩn *B. subtilis* GB03 được thử nghiệm định tính hoạt tính *in vitro* với hai nấm *Sclerotium rolfii* và *Rhizoctonia solani* trên đĩa thạch. Kết quả thể hiện trong hình 2. Quan sát đường kính tán nấm (Hình 2) cho thấy vi khuẩn *B. subtilis* GB03 có khả năng ức chế tốt sự phát triển của cả hai nấm *S. rolfii* và *R. solani*.



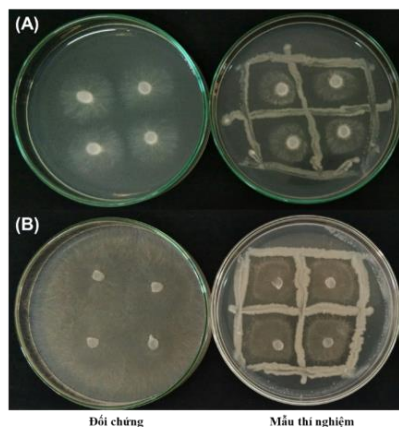
Hình 1. Các bề mặt đáp ứng biểu diễn tương quan các yếu tố ảnh hưởng với mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03: (A). Tương quan giữa yeast extract ( $X_1$ ) và ri đường ( $X_2$ ); (B). yeast extract ( $X_1$ ) và amoni sunfat ( $X_3$ ); (C). Tương quan giữa ri đường ( $X_2$ ) và amoni sunfat ( $X_3$ )

Biểu đồ đáp ứng bề mặt dạng 3D Surface và Contour tương ứng (Hình 1) thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố và từ biểu đồ này có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố làm cho hàm đáp ứng đạt cực đại. Xác định được mức độ tối ưu của mỗi biến cho mật độ vi khuẩn tối ưu với đồ thị bề mặt ba chiều có trục Z là mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 và hai biến độc lập bất kỳ trong ba yếu tố khảo sát, trong khi duy trì biến còn lại ở mức tối ưu của chúng. Từ đồ thị 1A, nhận thấy khi nồng độ ri đường tăng dần tới 19 g/l và yeast extract tới 14 g/l thì mật độ bào tử vi khuẩn tăng dần đến cực trị. Từ đồ thị 1B cho thấy mật độ bào tử vi khuẩn đạt cực đại khi nồng độ yeast extract trong khoảng 13-15 g/l và amoni sunfat trong khoảng 0,19-0,22 g/l. Tương tự, theo đồ thị 1C, nồng độ amoni sunfat tăng dần đến 0,22 g/l và ri đường đến 19 g/l thì mật độ vi khuẩn đạt cực trị. Hình 1A và 1C cho thấy mật độ vi khuẩn ảnh hưởng nhiều bởi yeast extract và amoni sunfat. Trong khi đó, ri đường ít ảnh hưởng đến mật độ bào tử của vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Từ các dữ liệu thu được bằng phần mềm Design Expert® 10.0.8 và phương

trình hồi quy, chúng tôi xác định được mức tối ưu của các ba yếu tố khảo sát lần lượt như sau: 14,32 g/l yeast extract; 18,92 g/l ri đường và 0,19 g/l amoni sunfat. Mô hình thí nghiệm dự đoán mật độ bào tử vi khuẩn tối ưu đạt được là  $8,761 \times 10^9$  bào tử/ml sau 48 giờ thí nghiệm. Mô hình được kiểm chứng khi thực hiện thí nghiệm với các giá trị tối ưu của ba yếu tố khảo sát cho kết quả mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đạt  $8,7 \times 10^9$  bào tử/ml. Trong nghiên cứu trước đây của Zhang Li-xia và cộng sự (2006) đã tối ưu hóa môi trường lên men vi khuẩn *B. subtilis* đạt mật độ bào tử vi khuẩn từ  $1,18 \times 10^{10}$  bào tử/ml [10].

### 3.3. Bước đầu thử nghiệm hoạt tính kháng nấm

Bào tử của vi khuẩn *B. subtilis* GB03 được thử nghiệm định tính hoạt tính *in vitro* với hai nấm *Sclerotium rolfii* và *Rhizoctonia solani* trên đĩa thạch. Kết quả thể hiện trong hình 2. Quan sát đường kính tán nấm (Hình 2) cho thấy vi khuẩn *B. subtilis* GB03 có khả năng ức chế tốt sự phát triển của cả hai nấm *S. rolfii* và *R. solani*.



Hình 2. Hình ảnh vòng kháng nấm trên đĩa thạch của các mẫu chứa vi khuẩn *B. subtilis* GB03 sau 48 giờ thí nghiệm so với mẫu đối chứng: (A): nấm *S. rolfsii*; (B): nấm *R. solani*

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu tìm ra điều kiện tối ưu môi trường lên men vi khuẩn *B. subtilis* GB03 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Nghiên cứu đã sàng lọc từ 7 yếu tố ban đầu chọn ra 3 yếu tố ảnh hưởng là yeast extract, ri đường và amoni sunfat bằng thiết kế ma trận Plackett-Burmen. Sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken đã xác định được các thông số tối ưu cho thành phần môi trường lên men thu nhận được mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 là lớn nhất với 14,32 g/l yeast extract; 18,92 g/l ri đường và 0,19 g/l amoni sunfat. Mật độ bào tử tối đa đạt  $8,761 \times 10^9$  bào tử/ml sau 48 giờ nuôi cấy. Trong thử nghiệm *in vitro* hoạt tính kháng nấm, vi khuẩn *B. subtilis* GB03 cho thấy hiệu quả trong việc phòng trừ nấm *Sclerotium rolfsii* (gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng) và *Rhizoctonia solani* (gây bệnh khô vằn). Kết quả báo cáo là cơ sở cho nghiên cứu lên men vi khuẩn *B. subtilis* GB03 với quy mô pilot để thu lượng bào tử lớn nhất sử dụng cho quá trình bào chế thuốc bảo vệ thực vật sinh học.

#### LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ từ Đề tài “Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm nano-vi khuẩn PGPR nhằm phòng trừ bệnh giả sương mai trên cây dưa lưới”.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (2001), *Bacillus subtilis and Its Closest*

*Relatives. From Genes to Cells*, Washington, DC: American Society for Microbiology Press

2. Moszer I., Jones L.M., Moreira S., Fabry C., Danchin A. (2002), *SubtiList: the reference database for the Bacillus subtilis genome*, *Nucleic Acids Res*, 30, 62–65

3. Nguyễn Dũng Lâm (2010), *Vi sinh vật học*, NXB. Giáo dục Việt Nam

4. Hữu L.K. (2005), *Khảo sát đặc điểm của Bacillus subtilis và tìm hiểu điều kiện nuôi cấy thích hợp sản xuất thử nghiệm chế phẩm probiotic, luận văn tốt nghiệp cử nhân Chăn nuôi Thú y*, Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM.

5. Katz E., Demain, A.L. (1977), *The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions*, *Bacteriol Rev*, 41, 449–474.

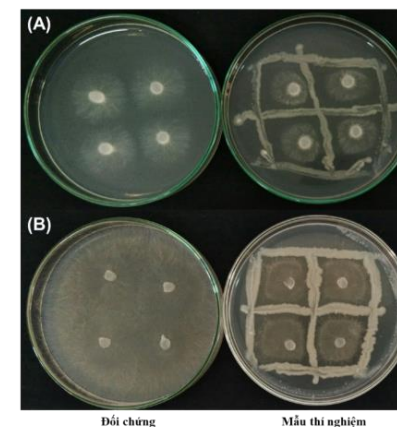
6. Sonia S.F., Ana B., Manuela C., Lina N., Alexandra E., José C.R., Maria J.M.C. (2004), *Antifungal activity of Bacillus subtilis 355 against wood-surface contaminant fungi*, *J Ind Microbiol Biot*, 31, 199–203

7. Ayslu M.M., Guzel F.H., Marat T.L., Irina V.K., Leyla F.M, Adelya G.G., Lidiya M.B., Margarita R.S. (2017), *Bacillus subtilis strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi*, *Agric Sci*, 8, 1-20.

8. Plackett R.L., Burman J.P. (1946) *The design of optimum multifactorial experiments*, *Biometrika*, 33, 305-325.

9. Zhang S., Huang J., Luo L. (2013) *Optimization of fermentation medium for protease production by Bacillus subtilis*, *China Brewing*, 02.

10. Zhang L., Li R., Wang Q., Mei R. (2006) *Optimization of Bacillus subtilis B908 Fermentation Medium*, *Chinese Journal of Biological Control*, S1.



Hình 2. Hình ảnh vòng kháng nấm trên đĩa thạch của các mẫu chứa vi khuẩn *B. subtilis* GB03 sau 48 giờ thí nghiệm so với mẫu đối chứng: (A): nấm *S. rolfsii*; (B): nấm *R. solani*

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu tìm ra điều kiện tối ưu môi trường lên men vi khuẩn *B. subtilis* GB03 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Nghiên cứu đã sàng lọc từ 7 yếu tố ban đầu chọn ra 3 yếu tố ảnh hưởng là yeast extract, ri đường và amoni sunfat bằng thiết kế ma trận Plackett-Burmen. Sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken đã xác định được các thông số tối ưu cho thành phần môi trường lên men thu nhận được mật độ bào tử vi khuẩn *B. subtilis* GB03 là lớn nhất với 14,32 g/l yeast extract; 18,92 g/l ri đường và 0,19 g/l amoni sunfat. Mật độ bào tử tối đa đạt  $8,761 \times 10^9$  bào tử/ml sau 48 giờ nuôi cấy. Trong thử nghiệm *in vitro* hoạt tính kháng nấm, vi khuẩn *B. subtilis* GB03 cho thấy hiệu quả trong việc phòng trừ nấm *Sclerotium rolfsii* (gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng) và *Rhizoctonia solani* (gây bệnh khô vằn). Kết quả báo cáo là cơ sở cho nghiên cứu lên men vi khuẩn *B. subtilis* GB03 với quy mô pilot để thu lượng bào tử lớn nhất sử dụng cho quá trình bào chế thuốc bảo vệ thực vật sinh học.

#### LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ từ Đề tài “Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm nano-vi khuẩn PGPR nhằm phòng trừ bệnh giả sương mai trên cây dưa lưới”.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (2001), *Bacillus subtilis and Its Closest*

*Relatives. From Genes to Cells*, Washington, DC: American Society for Microbiology Press

2. Moszer I., Jones L.M., Moreira S., Fabry C., Danchin A. (2002), *SubtiList: the reference database for the Bacillus subtilis genome*, *Nucleic Acids Res*, 30, 62–65

3. Nguyễn Dũng Lâm (2010), *Vi sinh vật học*, NXB. Giáo dục Việt Nam

4. Hữu L.K. (2005), *Khảo sát đặc điểm của Bacillus subtilis và tìm hiểu điều kiện nuôi cấy thích hợp sản xuất thử nghiệm chế phẩm probiotic, luận văn tốt nghiệp cử nhân Chăn nuôi Thú y*, Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM.

5. Katz E., Demain, A.L. (1977), *The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions*, *Bacteriol Rev*, 41, 449–474.

6. Sonia S.F., Ana B., Manuela C., Lina N., Alexandra E., José C.R., Maria J.M.C. (2004), *Antifungal activity of Bacillus subtilis 355 against wood-surface contaminant fungi*, *J Ind Microbiol Biot*, 31, 199–203

7. Ayslu M.M., Guzel F.H., Marat T.L., Irina V.K., Leyla F.M, Adelya G.G., Lidiya M.B., Margarita R.S. (2017), *Bacillus subtilis strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi*, *Agric Sci*, 8, 1-20.

8. Plackett R.L., Burman J.P. (1946) *The design of optimum multifactorial experiments*, *Biometrika*, 33, 305-325.

9. Zhang S., Huang J., Luo L. (2013) *Optimization of fermentation medium for protease production by Bacillus subtilis*, *China Brewing*, 02.

10. Zhang L., Li R., Wang Q., Mei R. (2006) *Optimization of Bacillus subtilis B908 Fermentation Medium*, *Chinese Journal of Biological Control*, S1.