

XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN VÀ MÔI TRƯỜNG THAY THẾ ĐỂ NUÔI CẤY *Bacillus* spp. TẠO CHẾ PHẨM VI KHUẨN PHỤC VỤ XỬ LÝ NƯỚC THẢI

Nguyễn Thị Lâm Đoàn¹

TÓM TẮT

Với mục tiêu xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp và môi trường rẻ tiền từ các nguồn nguyên liệu sẵn có để thay thế môi trường thương mại đắt tiền Luria Bentani (LB) trong việc tạo chế phẩm vi khuẩn để xử lý nước thải, hai chủng NTB2.11 và NTB5.7 đã được phân lập từ mẫu nước thải sản xuất bún Phú Đô có một số đặc tính sinh học tốt. Nghiên cứu này bước đầu đã định danh sơ bộ chủng NTB2.11 thuộc loài *Bacillus licheniformis*, NTB5.7 là *Bacillus subtilis* bằng kit API 50 CHB. Cả 2 chủng được xác định đều phát triển tốt ở điều kiện 35°C, NTB2.11 (pH 7, 36 giờ, tỷ lệ tiếp giống 7%); NTB5.7 (pH 8, 48 giờ, tỷ lệ tiếp giống 5%). Đã chọn được môi trường thay thế là dịch chiết đậu nành 20% cho chủng NTB2.11; NTB5.7 là môi trường hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 (v/v) của dịch chiết đậu nành (20%) và dịch chiết khoai tây (20%). Ở môi trường thay thế, NTB2.11 cho mật độ tế bào $8,5 \times 10^{10}$ CFU/mL, NTB5.7 là $1,9 \times 10^{10}$ CFU/mL cao gấp hơn 2 lần so với môi trường thương mại LB thì NTB2.11 cho mật độ tế bào $2,9 \times 10^{10}$ CFU/mL, NTB5.7 là $7,1 \times 10^9$ CFU/mL. Chế phẩm vi khuẩn được tạo riêng rẽ của các chủng sử dụng chất mang là cao lanh, sau khi sấy cho thấy, chủng NTB2.11 có mật độ tế bào là $38,2 \times 10^9$ CFU/mL tỷ lệ sống sót là 93,17%; NTB5.7 là $5,6 \times 10^9$ CFU/mL và tỷ lệ sống sót 88,89%.

Từ khóa: Môi trường thay thế, nuôi cấy, chế phẩm vi khuẩn *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, xử lý nước thải

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, các chủng *Bacillus* đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu để sản xuất chế phẩm vi khuẩn phục vụ xử lý môi trường với những ưu điểm như sản sinh một số loại enzyme ngoại bào; sinh chất kháng khuẩn, tạo màng sinh học... (Nguyễn Quang Huy và Trần Thúy Hằng, 2012; Ngô Tự Thành và *ctv.*, 2009). Ngoài ra, vi khuẩn này còn có ưu điểm là có thể sử dụng được đa dạng nguồn cơ chất để tăng sinh khối và phát triển (Nguyễn Đức Lượng và Nguyễn Thị Thùy Dương, 2003). Ở Việt Nam, theo nghiên cứu của Cao Ngọc Điệp và cộng tác viên (2015) *Bacillus* đã được sử dụng thành công để loại bỏ đạm, lân trong xử lý nước thải giết mổ gia cầm; Vũ Thị Dinh và cộng tác viên (2018) đã phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu nhiệt độ cao, thích nghi dải pH rộng, có hoạt tính cellulase cao và bước đầu ứng dụng xử lý nước thải nhà máy giấy. Chủng *Bacillus* NT1 có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ xylan, cellulose, tinh bột, protein và ứng dụng trong xử lý nước thải làng nghề chế biến tinh bột dong riềng (Nguyễn Như Ngọc và *ctv.*, 2016). Bên cạnh việc phân lập, tuyển chọn những chủng vi khuẩn có những đặc tính sinh học tốt, thì bước xác định điều kiện nuôi cấy cũng là khâu hết sức quan trọng quyết định đến hiệu suất thu hồi sinh khối dẫn đến việc sản xuất chế phẩm hiệu quả hơn

(Đoàn Thị Tuyết Lê và *ctv.*, 2020). Hơn nữa, thành phần môi trường lên men rẻ tiền sẽ giảm chi phí sản xuất nhằm đáp ứng nhu cầu của thị trường và giảm giá thành sản phẩm (Lê Minh Trí và *ctv.*, 2011). Mục đích của nghiên cứu này là bước đầu sơ bộ định danh các chủng NTB2.11 và NTB5.7 được nhóm nghiên cứu xác định có hoạt tính sinh học tốt như sinh một số enzyme ngoại bào, tạo màng biofilm, kháng vi khuẩn gây bệnh được phân lập từ nước thải sản xuất bún. Xác định ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ, pH, thời gian, và tỷ lệ tiếp giống đến sự sinh trưởng và phát triển của hai chủng và khảo sát môi trường thay thế từ các nguồn nguyên liệu rẻ tiền với mục đích thay thế môi trường thương mại đắt tiền Luria Bentani (LB) để tạo chế phẩm vi khuẩn xử lý môi trường nước thải làng nghề chế biến tinh bột ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Chủng vi khuẩn

Chủng *Bacillus* NTB2.11 và NTB5.7 đã được nhóm nghiên cứu phân lập từ nước thải làng nghề sản xuất bún truyền thống Phú Đô và đã xác định một số đặc điểm như trong bảng 1.

¹ Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Bảng 1. Đặc điểm sinh học của chủng nghiên cứu

Đặc điểm	Ký hiệu chủng vi khuẩn	
	NTB2.11	NTB5.7
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng đục	Trắng sữa
Bề mặt khuẩn lạc	Lồi, không bóng, mép răng cưa	Lồi, nhẵn bóng, mép răng cưa
Nhuộm gram	(+)	(+)
Cách sắp xếp tế bào	Có hình que, sắp xếp dạng chuỗi	Hình que, sắp xếp đơn lẻ hoặc thành chuỗi ngắn
Kích thước tế bào (μm)	1 - 3,0	1 - 2,5
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Khả năng di động	Có	Có
Thủy phân tinh bột (mm)	15,2 \pm 0,35	18,3 \pm 0,58
Thủy phân CMC (mm)	9,8 \pm 0,26	5,9 \pm 0,14
Thủy phân Casein (mm)	7,9 \pm 0,06	4,9 \pm 0,12
Khả năng tạo màng ($\text{OD}_{570\text{nm}}$)	3,78	3,37
Khả năng kháng <i>Salmonella typhimurium</i> (mm)	6,8 \pm 0,04	12,5 \pm 0,48
Khả năng kháng <i>E.coli</i> (mm)	5,2 \pm 0,06	9,8 \pm 0,23

2.1.2. Môi trường nghiên cứu

Môi trường LB (Luria Bentani) (g/L): Cao nấm men - 5,0; Tryptone - 10,0; NaCl - 10,0; pH 7,0 dùng để nuôi cấy vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Môi trường LB agar bao gồm 2% agar được bổ sung vào môi trường (Nguyễn Quang Huy và Trần Thúy Hằng, 2012).

Môi trường thay thế: Nguyên liệu khoai tây và đậu nành được cân 20 g, ngâm trong 100 mL nước và nấu trong 15 phút. Riêng đậu nành được ngâm trong nước nóng khoảng 30 phút để làm mềm hạt đậu và xay nhuyễn với 100 mL nước. Lọc thu dịch chiết, bổ sung nước vừa đủ 100 mL (Lê Minh Trí và *ctv.*, 2011). Môi trường được hấp khử trùng 121°C/15 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định danh sơ bộ chủng *Bacillus*

Nhóm nghiên cứu đã chỉ ra một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào và phản ứng catalase (+), oxidase (+), khả năng di động của chủng NTB2.11 và NTB5.7 như ở bảng 1. Các đặc điểm thu được so sánh với các đặc điểm theo khóa phân loại Bergey's 1986 bước đầu có thể xếp vào chi *Bacillus*.

Định danh sơ bộ chủng bằng kit chuẩn API 50 CHB. Chủng nghiên cứu được nuôi cấy trên môi trường thạch sau 24 giờ nuôi cấy lấy 2 - 3 vòng que cấy hoà tan vào nước muối sinh lý, 2 mL vi khuẩn từ nước

muối sinh lý cho vào môi trường API 50 CHB, lắc đều. Tiếp theo, dịch từ môi trường API 50 CHB cho vào các giếng, nhỏ parafin khoảng 5 - 6 giọt nhằm giữ cho dịch môi trường không bị tràn và tránh bị lây nhiễm. Nuôi cấy được thực hiện ở 37°C rồi đọc kết quả sau 24 giờ và 48 giờ (Nguyễn Thế Trang và *ctv.*, 2012).

2.2.2. Ảnh hưởng của các yếu tố đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Bacillus sp.* NTB2.11 và NTB5.7

a) Ảnh hưởng của nhiệt độ

Thí nghiệm tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy 25, 30, 35, 40, 45, 50°C đến sự sinh trưởng và phát triển các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* trên môi trường LB với tỷ lệ tiếp giống 5%, có pH = 7, tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau 24 giờ nuôi cấy đo $\text{OD}_{620\text{nm}}$ để xác định nhiệt độ nuôi cấy thích hợp nhất cho các chủng (Nguyễn Quang Huy và Trần Thúy Hằng 2012; Đào Thị Hồng Vân và *ctv.*, 2012).

b) Ảnh hưởng của pH

Ảnh hưởng của pH trong môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng cũng được tiến hành như trên nhưng ở đây pH môi trường 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 với nhiệt độ nuôi cấy đã xác định ở thí nghiệm trước (Nguyễn Quang Huy và Trần Thúy Hằng, 2012; Đào Thị Hồng Vân và *ctv.*, 2012).

c) Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của chủng ở các thời gian 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 giờ với nhiệt độ và pH môi trường nuôi cấy đã xác định ở trên (Đào Thị Hồng Vân và *ctv.*, 2012).

d) Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống

Trong thí nghiệm này, các tỷ lệ tiếp giống 3, 5, 7, 10% với nhiệt độ, pH và thời gian tăng sinh đã xác định ở trên (Đào Thị Hồng Vân và *ctv.*, 2012).

2.2.3. Thử nghiệm môi trường thay thế

Kế thừa kết quả nghiên cứu của Lê Minh Trí và cộng tác viên (2011) đã cho rằng một số chủng *Bacillus* có khả năng phát triển tốt trong môi trường thay thế là dịch chiết đậu nành, khoai tây 20%. Nghiên cứu này sử dụng 4 môi trường là LB, môi trường dịch chiết đậu nành, dịch chiết khoai tây, hỗn hợp của dịch chiết đậu nành và khoai tây được phối trộn theo tỷ lệ 1:1 (v/v).

Các chủng vi khuẩn được nhân giống trong 10 mL LB, nuôi trong 24 giờ, ở 35°C. Sau đó dịch vi khuẩn được điều chỉnh về mật độ 10^7 CFU/mL và cấy vào môi trường nghiên cứu với tỷ lệ tiếp giống là 5%. Môi trường nghiên cứu là LB, môi trường dịch chiết đậu nành, dịch chiết khoai tây, hỗn hợp của dịch chiết đậu nành và khoai tây phối trộn theo tỷ lệ 1 : 1 (v/v). Các dịch vi khuẩn này được nuôi cấy ở 35°C trong 24 giờ, lắc ở 150 vòng/phút. Sau đó xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (CFU/mL) (Lê Minh Trí và *ctv.*, 2011).

2.2.4. Tạo chế phẩm

Tạo chế phẩm được tiến hành như nghiên cứu của Đào Thị Hồng Vân và cộng tác viên (2012). Với chất mang là cao lanh. Tiến hành lên men riêng từng chủng ở điều kiện nuôi cấy thích hợp và môi trường thay thế của mỗi chủng đã được xác định ở các thí nghiệm trên. Dịch lên men ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Gạn bỏ dịch trong, thu sinh khối tế bào vi khuẩn.

Cao lanh được sấy ở 130°C trong 45 phút để khử trùng và giảm độ ẩm của chất mang. Phối trộn sinh khối vi khuẩn với cao lanh theo tỷ lệ 1 : 2 (w/w), đảo trộn đều và xác định mật độ tế bào trong chế phẩm trước sấy. Sau đó chế phẩm được sấy 40°C đến khi độ ẩm chế phẩm đạt 8 - 9% xác định mật độ tế bào sau sấy.

2.2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Microsoft Excel.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5 năm 2020 đến tháng 01 năm 2021 tại Khoa Công nghệ Thực phẩm - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định danh sơ bộ chủng NTB2.11 và NTB 5.7

Với những đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào và một số đặc điểm khác được nhóm nghiên cứu chỉ ra ở bảng 1 chưa đủ để kết luận chúng thuộc chi *Bacillus* vì vậy bước đầu các chủng sơ bộ được phân loại bằng kit chuẩn sinh hóa API 50 CHB gồm 49 cơ chất. Theo một số nghiên cứu của Mugg và cộng tác viên (2013) cho rằng API có thể được dùng định danh nhóm *Bacillus* spp. đến mức loài ngoại trừ *Bacillus thuringiensis*. Ngoài ra, Aruwa và Olatope (2015) cũng chỉ ra dựa vào hệ thống định danh sinh hoá kết hợp API 50 CHB có thể định danh 80% các chủng vi khuẩn thuộc chi này. Kết quả API 50 CHB chủng NTB 2.11 ở bảng 2.

Các đặc điểm hình thái theo khoá phân loại vi khuẩn của Bergey's, và kết hợp với kết quả API 50 CHB cho thấy chủng NTB2.11 sơ bộ thuộc *Bacillus licheniformis*. Đối với chủng NTB5.7 khi đánh giá khả năng sử dụng các loại cơ chất theo kit API 50 CHB của chủng thì thấy sau 24 và 48 giờ thì có kết quả tương tự như bảng 2, chỉ khác là ở 3 loại cơ chất là cơ chất thứ 15. Rhamoza; 20. α - Methyl-D-mannosit; 47. Gluconat chủng này không có khả năng lên men sau 24 giờ cũng như 48 giờ so sánh với loài trong bảng Index của Kit cho thấy chủng NTB5.7 sơ bộ thuộc *Bacillus subtilis*. *Bacillus licheniformis* NTB2.11 và *Bacillus subtilis* NTB5.7 đã được nhóm nghiên cứu xác định có một số đặc điểm để có thể ứng dụng trong xử lý nước thải làng nghề chế biến tinh bột, như khả năng sinh một số enzyme ngoại bào đặc biệt là enzyme α - amylase với đường kính vòng phân giải cơ chất tinh bột NTB2.11 (15,2mm) và NTB5.7 (18,3 mm), khả năng tạo màng và kháng một số chủng gây bệnh như *Salmonella typhimurium* và *E. coli* (Bảng 1). Đặc biệt, đối với chủng *Bacillus licheniformis* NTB2.11 thường sinh enzyme α - amylase bền nhiệt có nhiệt độ tối ưu lên đến 95 - 105°C khi xử lý nên kết hợp 2 chủng vi khuẩn thu được để xử lý dịch thải làng nghề làm bún hiệu quả.

Bảng 2. Khả năng sử dụng cơ chất của chủng NTB2.11 theo Kit API 50 CHB so sánh với loài trong bảng Index của Kit

STT	Cơ chất	24 giờ	48 giờ	<i>B. licheniformis</i>	STT	Cơ chất	24 giờ	48 giờ	<i>B. licheniformis</i>
0	Control	-	-	-	26	Salicin	+	+	+
1	Glycerol	+	+	+	27	Cellobioza	+	+	+
2	Erythritol	-	-	-	28	Maltoza	+	+	+
3	D-Arabinosa	-	-	-	29	Lactoza	-	-	-
4	L-Arabinosa	+	+	+	30	Melibioza	-	-	-
5	Riboza	+	+	+	31	Saccaroza	+	+	+
6	D-Xyloza	+	+	+	32	Trehaloza	+	+	+
7	L-Xyloza	-	-	-	33	Trehaloza	+	+	+
8	Adonitol	-	-	-	34	Melezitoza	-	-	-
9	β -Methyl-xylosit	-	-	-	35	D-Raffinoza	+	+	+
10	Galactoza	-	-	-	36	Amidon	+	+	+
11	D-Glucoza	+	+	+	37	Glycogen	+	+	+
12	D-Fructoza	+	+	+	38	Xylitol	-	-	-
13	D-Mannoza	+	+	+	39	β -Gentiobioza	+	+	+
14	L-Sorboza	-	-	-	40	D-Turanoza	-	-	-
15	Rhamnoza	-	-	-	41	D-Lyxoza	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	42	D-Tagatoza	-	-	-
17	Inositol	+	+	+	43	D-Fucoza	-	-	-
18	Mannitol	+	+	+	44	L-Fucoza	-	-	-
19	Sorbitol	+	+	+	45	D-Arabitol	-	-	-
20	α -Methyl-D-mannosit	-	-	-	46	L-Arabitol	-	-	-
21	α Methyl-D-glucosit	+	+	+	47	Gluconat	+	+	+
22	N Acetyl glucosamin	+	+	+	48	2 ceto-gluconat	-	-	-
23	Amygdalin	+	+	+	49	5 ceto-gluconat	-	-	-
24	Arbutin	+	+	+					
25	Esculin	+	+	+					

Ghi chú: (-) không có phản ứng; (+) có phản ứng.

3.2. Xác định điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng nghiên cứu

Nhằm hướng tới mục tiêu tạo chế phẩm vi sinh vật để xử lý nước thải làng nghề chế biến tinh bột, nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát triển của chủng tuyển chọn được tiến hành.

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH

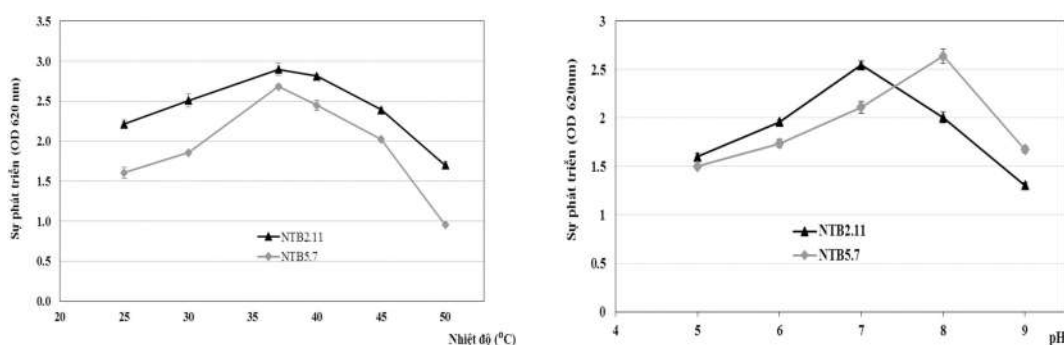
Nhiệt độ là một trong những yếu tố then chốt, tác động trực tiếp đến khả năng sinh trưởng, phát

triển của vi sinh vật. Nhiệt độ quá cao cũng có thể gây chết vi sinh vật do sự biến tính của các protein và vật chất di truyền.

Bên cạnh yếu tố nhiệt độ, độ pH của môi trường cũng có tác động rất lớn đến khả năng sinh trưởng của vi sinh vật. Nghiên cứu của Nguyễn Đức Lượng và Nguyễn Thị Thùy Dương (2003) chỉ ra biến đổi dù nhỏ nồng độ H^+ trong thành phần môi trường cũng làm thay đổi trạng thái điện tích của thành tế bào có thể làm tăng hoặc giảm khả năng thẩm thấu của tế bào. Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ và

pH thu được chỉ ra ở Hình 1 cho thấy, cả hai chủng đều phát triển được trong khoảng nhiệt độ 25 - 50°C và pH từ 5 đến 9, trong đó khoảng nhiệt độ thích

hợp là từ 30 - 40°C. Cả 2 chủng ở 35°C có mật độ tế bào cao nhất. Nhiệt độ này phù hợp với điều kiện khí hậu ở nước ta.



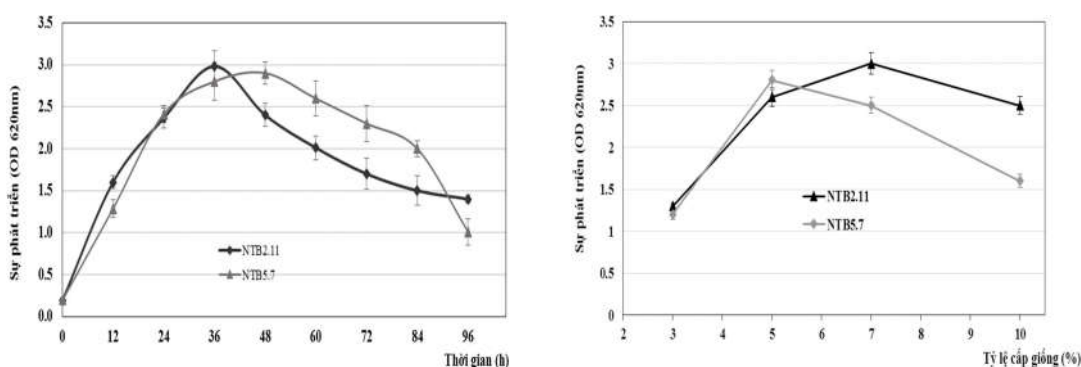
Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến sự phát triển của chủng NTB2.11 và NTB5.7

pH thích hợp với các chủng là trung tính (pH 6 - 8). Đối với chủng NTB2.11 pH 7, đối với NTB5.7 pH 8 là pH tối ưu (Hình 1). Kết quả về nhiệt độ và pH trong nghiên cứu này cũng phù hợp với một số nghiên cứu khác. Nguyễn Quang Huy và Trần Thúy Hằng (2012) khi nghiên cứu các chủng *Bacillus* U1.3 và U3.7 phát triển tốt trong 30 - 40°C, pH từ 6,5 - 7,5; một nghiên cứu khác của Đào Thị Hồng Vân và cộng tác viên (2012) chỉ ra rằng, nhiệt độ tối ưu để chủng *B. licheniformis* A6 và *B. subtilis* L6 phát triển tốt là 30°C, pH 7.

Để xác định được thời gian nuôi cấy thích hợp, các chủng này được nuôi cấy với các điều kiện được xác định ở trên: nhiệt độ 35°C, pH 7 (NTB2.11) pH 8 (NTB5.7). Kết quả ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy thu sinh khối được chỉ ra ở hình 2 cho thấy: ở thời gian nuôi cấy 24 - 48 giờ mật độ tế bào tăng mạnh, tiếp theo mật độ của chúng giảm. Nguyên nhân là do sau 48 giờ hàm lượng các chất dinh dưỡng trong môi trường bị giảm, tế bào tự phân và bị ức chế bởi các sản phẩm trao đổi chất tạo ra trong môi trường (Đào Thị Hồng Vân và *ctv.*, 2012). Chủng NTB2.11 có thời gian nuôi cấy tối ưu là 36 giờ còn chủng NTB5.7 là 48 giờ. Điều này tương đồng với kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của yếu tố thời gian của Đào Thị Hồng Vân và cộng tác viên (2012) khi tác giả xác định hai chủng *Bacillus* A6, L6 thời gian nuôi cấy là 36 giờ là thời điểm thu được sinh khối lên men tối đa.

3.2.2. Thời gian nuôi cấy và tỷ lệ tiếp giống

Ngoài yếu tố về nhiệt độ, pH thì thời gian nuôi cấy phải đảm bảo cho sinh khối thu được với tỷ lệ cao, các tế bào sinh dưỡng trẻ, khỏe.



Hình 2. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy và tỷ lệ tiếp giống đến sự phát triển của chủng NTB2.11 và NTB5.7

Đối với tỷ lệ tiếp giống, kết quả ở hình 2 cho thấy sinh khối vi khuẩn tăng khi tỷ lệ tiếp giống ban đầu tăng và đạt giá trị cao nhất 7% (NTB2.11) và 5% (NTB5.7), tăng tỷ lệ tiếp giống 10% thì lượng sinh

khối lại giảm. Như vậy, tỷ lệ cấy giống quá cao mà lượng dinh dưỡng trong môi trường không thay đổi, thì tốc độ lên men ban đầu có tăng nhanh hơn nhưng về sau có sự cạnh tranh sử dụng dinh dưỡng giữa các

vi khuẩn trong môi trường dẫn đến vi khuẩn có thể nhanh già và chết làm cho sinh khối giảm. Kết quả này cũng gần tương tự như nghiên cứu của Đào Thị Hồng Vân và cộng tác viên (2012) đã lựa chọn tỷ lệ tiếp giống ban đầu của hai chủng *Bacillus* A6, L6 là 7%.

3.4. Thử nghiệm môi trường thay thế

Môi trường thay thế từ các dịch chiết đậu nành và khoai tây, đây là các nguyên liệu phổ biến và có giá thành tương đối thấp ở Việt Nam. Các nguyên liệu này có thành phần đa dạng do đó có thể dùng như nguồn cung cấp carbon, nitơ, vitamin và các khoáng chất (Noah *et al.*, 2005). Sau khi thử nghiệm 04 môi

trường: LB, dịch chiết đậu nành, dịch chiết khoai tây, hỗn hợp dịch chiết đậu nành và khoai tây theo tỷ lệ 1 : 1. Kết quả nghiên cứu chỉ ra ở bảng 3.

Kết quả cho thấy chủng NTB2.11 và NTB5.7 phát triển trên cả 04 loại môi trường này. Tuy nhiên, chủng NTB2.11 sử dụng dịch chiết đậu nành tốt nhất với mật độ tế bào $8,5 \times 10^{10}$ CFU/mL cao gấp 2,93 lần so với trên môi trường LB $2,9 \times 10^{10}$ CFU/mL; NTB5.7 sử dụng môi trường dịch chiết hỗn hợp đậu nành và khoai tây tốt nhất với mật độ tế bào $1,9 \times 10^{10}$ CFU/mL cao gấp 2,68 lần so với môi trường LB $7,1 \times 10^9$ CFU/mL.

Bảng 3. Môi trường thay thế ảnh hưởng đến sự phát triển của chủng

Chủng	Mật độ tế bào (10^6 CFU/mL)			
	LB	Dịch chiết đậu nành	Dịch chiết khoai tây	Dịch chiết đậu nành và khoai tây
NTB2.11	$2,9 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^2$	$8,5 \times 10^4 \pm 5,4 \times 10^2$	$92 \pm 3,6$	$1,6 \times 10^3 \pm 47,5$
NTB5.7	$7,1 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^2$	$30 \pm 1,3$	$7,6 \pm 0,25$	$1,9 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$

Theo nghiên cứu của Lê Minh Trí và cộng tác viên (2011) các chủng *Bacillus* sử dụng các nguồn nguyên liệu với hiệu quả khác nhau tùy thuộc vào đặc điểm của từng loài. Nhóm tác giả đã tìm ra môi trường thay thế cho một số chủng *Bacillus* DD1.1 và HC28 phát triển tốt dịch chiết đậu nành, cả 2 chủng AT14 và AT22 đều phát triển tốt trong môi trường hỗn hợp dịch chiết đậu nành và khoai tây. Một số nghiên cứu đã chỉ ra môi trường chứa đậu nành với hàm lượng nitơ cao và các khoáng chất cần thiết thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn (Ko *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2003). Dịch chiết khoai tây cung cấp carbon, nitơ, vitamin và khoáng (Thompson & Bala, 2000). Như vậy những nguồn nguyên liệu rẻ tiền này thật sự có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất chế phẩm vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* xử lý nước thải ở quy mô lớn, mang lại hiệu quả kinh tế cao.

3.5. Tạo chế phẩm xử lý nước thải từ các chủng nghiên cứu

Trong xử lý nước thải các chất mang hay được sử dụng trong tạo chế phẩm làm giá bám cho vi sinh vật là cao lanh, than bùn, cám, tinh bột (Nguyễn Thị Hằng Nga và *ctv.*, 2016). Kế thừa kết quả nghiên cứu của Đào Thị Hồng Vân và cộng tác viên (2012) cao lanh với công thức hóa học ($Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$) phổ biến và rẻ tiền, khi cho vào nước chúng có tác dụng keo tụ các phân tử lơ lửng ở trong nước mà không làm tăng mức độ ô nhiễm hữu cơ trong nước thải.

Trong nghiên cứu này cũng sử dụng cao lanh làm chất mang. Chế phẩm từ 2 chủng nghiên cứu được tạo ra như ở mục 2.2.4. trong phần phương pháp nghiên cứu. Kết quả được thể hiện tại bảng 4.

Bảng 4. Sự sống sót của tế bào trước sấy và sau sấy

Chủng	Mật độ tế bào trước sấy và sau sấy (10^9 CFU/g)		Tỷ lệ sống sót (%)
	Trước sấy	Sau sấy	
NTB2.11	$41 \pm 1,53$	$38,2 \pm 1,19$	93,17%
NTB5.7	$6,3 \pm 0,18$	$5,6 \pm 0,14$	88,89 %

Mật độ tế bào trong chế phẩm sau sấy của chủng NTB2.11 là $38,2 \times 10^9$ CFU/mL, tỷ lệ tế bào sống sót 93,17%; chủng NTB5.7 mật độ tế bào sau sấy $5,6 \times 10^9$ CFU/mL, tỷ lệ tế bào sống sót 88,89%. Kết quả này gần tương đồng với kết quả nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh vật của Đào Thị Hồng Vân và cộng tác viên (2012) khi phối trộn sinh khối vào chất mang với tỷ lệ 1 : 2, tỷ lệ tế bào sống sót của các chủng *Bacillus* L6 là 90,2% còn chủng *Bacillus* A6 là 92,8%.

IV. KẾT LUẬN

Hai chủng NTB2.11 và NTB5.7 có một số hoạt tính sinh học được phân lập từ nước thải sản xuất bún bước đầu đã sơ bộ định danh NTB2.11 thuộc loài *Bacillus licheniformis*, NTB5.7 là *Bacillus subtilis*. Điều kiện nuôi cấy của *Bacillus licheniformis* NTB2.11 (35°C, pH 7, 36 giờ, tỷ lệ tiếp giống 7%);

Bacillus subtilis NTB5.7 (35°C, pH 8, 48 giờ, tỷ lệ tiếp giống 5%). Đã chọn được môi trường thay thế là dịch chiết đậu nành 20% cho chủng NTB2.11; NTB5.7 là môi trường hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 (v/v) của dịch chiết đậu nành (20%) và khoai tây (20%). Khi nuôi cấy 2 chủng ở môi trường thay thế NTB2.11 cho mật độ tế bào $8,5 \times 10^{10}$ CFU/mL, NTB5.7 là $1,9 \times 10^{10}$ CFU/mL cao gấp hơn 2 lần so với môi trường thương mại LB thì NTB2.11 mật độ tế bào $2,9 \times 10^{10}$ CFU/mL, NTB5.7 là $7,1 \times 10^9$ CFU/mL. Chế phẩm vi khuẩn được tạo riêng rẽ với các chủng sử dụng chất mang là cao lanh, sau sấy ở nhiệt độ 40°C chủng NTB2.11 có mật độ tế bào là $38,2 \times 10^9$ CFU/mL tỷ lệ sống sót là 93,17%; NTB5.7 là $5,6 \times 10^9$ CFU/mL và tỷ lệ sống sót 88,89%. Chế phẩm này có thể sử dụng cho xử lý nước thải làng nghề chứa nhiều tinh bột và nhất là làng nghề sản xuất bún.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Vũ Thị Dinh, Phan Thị Thu Nga, Hoàng Trung Doãn, Trần Liên Hà**, 2018. Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu nhiệt độ cao, thích nghi dải pH rộng, có hoạt tính cellulase cao và bước đầu ứng dụng xử lý nước thải nhà máy giấy. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, (1): 3-10.
- Cao Ngọc Diệp, Trần Thị Thưa, Hà Thanh Toàn**, 2015. Ứng dụng vi khuẩn chuyển hóa nitơ *Pseudomonas stutzeri* và vi khuẩn tích lũy polyphosphate *Bacillus subtilis* để loại bỏ đạm, lân trong quy trình xử lý nước thải giết mổ gia cầm. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*, 37: 18-31.
- Nguyễn Quang Huy, Trần Thúy Hằng**, 2012. Phân lập các chủng *Bacillus* có hoạt tính tạo màng sinh vật (biofilm) và tác dụng kháng khuẩn của chúng. *Tạp chí Sinh học*, 34(1): 99 -106.
- Đoàn Thị Tuyết Lê, Phạm Vũ Bảo, Nguyễn Ngọc Tùng, Đỗ Minh Anh**, 2020. Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men rẽ tiền chủng *Bacillus subtilis* LH1 bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm phục vụ sản xuất probiotic. *Tạp chí Khoa học Lạc Hồng*, 9: 37 - 40.
- Nguyễn Đức Lượng, Nguyễn Thị Thùy Dương**, 2003. *Công nghệ sinh học môi trường Tập 1: Công nghệ xử lý nước thải*. NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Thị Hằng Nga, Nguyễn Lan Hương, Trần Khắc Hiệp, Nguyễn Kiều Bằng Tâm Lương Hữu Thành**, 2016. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật để xử lý phế thải rắn sau chế biến tinh bột sắn làm phân hữu cơ sinh học. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Các Khoa học Trái đất và Môi trường* 32(1S): 282-288.
- Nguyễn Như Ngọc, Nguyễn Văn Cách, Nguyễn Thị Diệp**, 2016. Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa có khả năng phân giải chất hữu cơ trong nước thải làng nghề chế biến tinh bột dong riềng. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn*. 1(2): 1010-107.
- Ngô Tự Thành, Bùi Thị Việt Hà, Vũ Minh Đức, Chu Văn Mẫn**, 2009. Nghiên cứu hoạt tính enzym ngoại bào của một số chủng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 25: 101-106.
- Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Thị Đà, Trần Đình Mẫn**, 2012. Nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn ưa nhiệt sinh α -amylaza bền nhiệt phân lập ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50: 219-229.
- Lê Minh Trí, Trần Hữu Tâm, Trần Thị Thanh Thảo, Trần Cát Đông**, 2011. Khảo sát môi trường nuôi cấy *Bacillus* sinh carotenoid từ các nguồn nguyên liệu rẽ tiền. *Y học TP. Hồ Chí Minh*, 15 (1): 189-194.
- Đào Thị Hồng Vân, Nguyễn Văn Cách, Đặng Thị Thu**, 2012. Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học xử lý nước thải sinh hoạt đô thị Hà Nội. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2 (1): 33 -39.
- Aruwa C. E and Olatope S.O.A.**, 2015. Characterization of *Bacillus* species from convenience foods with conventional and API kit method: A comparative analysis. *Journal of Applied Life Sciences International*, 3(1): 42-48.
- Ko K.S., Oh W.S., Lee M.Y., Lee J.H., Lee H., Peck K.R., Lee N Y and Song J.H.**, 2006. *Bacillus infantis* sp. nov. and *Bacillus idriensis* sp. nov., isolated from a patient with neonatal sepsis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2541-2544.
- Mugg P, Seymour S and Clark S.**, 2013. *A new method for identification of Bacillus spp. and related species involved in food poisoning and spoilage*. Microgen Bioproducts Ltd, Camberley, Surrey, UK.
- Noah K. S., Bruhn D. F. and Bala G. A.**, 2005. Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 122(1): 465-474.
- Thompson D.N.F.S. And Bala G.A.**, 2000. Biosurfactants from potato process effluents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84: 917-930.
- Yoon J.H., Kim I.G., Kang K.H., Kwang O.T., Park Y.H.**, 2003. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1297-1303.

Determination of conditions and alternative media to culture *Bacillus* spp. in the production of bacterial preparation for wastewater treatment

Nguyen Thi Lam Doan

Abstract

With the aim of determining culture conditions and alternative media from cheap materials to replace the expensive commercial medium Luria Bentani (LB) in the production of bacterial preparation for wastewater treatment, two strains including NTB2.11 and NTB5.7 isolated from rice vermicelli wastewater in Phu Do village had some good biological properties. The strain NTB2.11 was preliminarily identified belong to species *Bacillus licheniformis* and the strain NTB5.7 belong to *Bacillus subtilis* by API 50 CHB, Both strains were identified to develop well at 35°C, NTB2.11 (pH 7, 36 h, ratio of the original cultivated bacteria 7%); NTB5.7 (pH 8, 48 h, ratio of the original cultivated bacteria 5%). Alternative medium was soybean extract 20% for strain NTB2.11 and the alternative medium for NTB5.7 was a mixed medium in a ratio of 1 : 1 (v/v) of soybean extract (20%) and potatoe extract (20%). In the alternative media, cell density of NTB2.11 was 8.5×10^{10} CFU/mL and of NTB5.7 was 1.9×10^{10} CFU/mL, over 2 times higher than that of commercial LB media, in which NTB2.11 had cell density of 2.9×10^{10} CFU/mL and NTB5.7 had 7.1×10^9 CFU/mL. The result showed that the strain NTB2.11 had cell density of 38.2×10^9 CFU/mL, survival ratio of 93.17% while the strain NTB5.7 had cell density of 5.6×10^9 CFU/mL, survival ratio of 88.89% after drying of separately created preparations from each strain using kaolin carrier.

Keywords: Alternative media, culture, bacterial preparation, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, wastewater treatment

Ngày nhận bài: 07/02/2021

Ngày phản biện: 15/02/2021

Người phản biện: GS. TS. Nguyễn Thị Hiền

Ngày duyệt đăng: 26/02/2021

THÀNH PHẦN LOÀI CỦA LỚP CHÂN BỤNG (Gastropoda) Ở HỆ SINH THÁI RỪNG NGẬP MẶN CÙ LAO DUNG, TỈNH SÓC TRĂNG

Nguyễn Thị Kim Liên¹, Âu Văn Hóa¹,
Dương Văn Ni² và Huỳnh Trường Giang¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu về thành phần loài của lớp chân bụng ở hệ sinh thái rừng ngập mặn Cù Lao Dung được thực hiện từ tháng 9/2019 - 3/2020. Tổng cộng có 24 điểm thu mẫu được chia thành 8 nhóm thủy vực. Trong đó có 5 nhóm thủy vực thuộc vùng nội đồng (VNĐ) và 3 nhóm thủy vực thuộc rừng ngập mặn (RNM) Cù Lao Dung. Kết quả cho thấy, có tổng cộng 20 loài thuộc 14 họ của lớp Gastropoda được ghi nhận. Thành phần loài Gastropoda vào mùa khô có xu hướng cao hơn mùa mưa. Tại mỗi điểm thu mẫu, thành phần loài và mật độ Gastropoda biến động lần lượt từ 1 - 8 loài và 10 - 384 cá thể/m². Mật độ Gastropoda ở VNĐ cao hơn vùng RNM cả trong mùa mưa và mùa khô. Một số loài chiếm ưu thế ở khu vực VNĐ là *Melanoides tuberculata*, *Sermyla riqueti* (Thiaridae) và ở RNM là *Margarya* sp. (Viviparidae).

Từ khóa: Gastropoda, rừng ngập mặn, Cù Lao Dung, thành phần loài

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rừng ngập mặn Cù Lao Dung có hệ sinh thái đa dạng, đây cũng là nơi cư trú, nơi sinh sản của nhiều giống loài động thực vật. Một trong những nhóm sinh vật thích nghi với hệ sinh thái rừng ngập mặn là Gastropoda. Sự phân bố của chúng phụ thuộc vào điều kiện môi trường nước, nguồn thức ăn sẵn có cũng như tính chất nền đáy của thủy vực. Sự thay đổi các yếu tố môi trường như độ mặn và các hàm lượng dinh dưỡng trong nước có thể ảnh hưởng đến

thành phần loài và cấu trúc của quần xã Gastropoda. Một số nghiên cứu cho thấy Gastropoda ăn tảo, ăn mùn bã hữu cơ và xác bã động thực vật, do đó chúng có vai trò quan trọng trong chuỗi thức ăn của thủy vực (Kelaher *et al.*, 2007; Nagelkerken *et al.*, 2008). Ngoài ra, Gastropoda còn là nguồn thực phẩm quan trọng cho người dân địa phương do chúng có hàm lượng protein cao, chất lượng thịt ngon. Chúng cũng có thể sử dụng làm sinh vật chỉ thị trong quan trắc chất lượng nước. Tuy nhiên, các nghiên cứu về

¹ Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Môi Trường và Tài Nguyên Thiên nhiên, Trường Đại học Cần Thơ