Tạp chí KHLN Số 5/2020
©: Viện KHLNVN - VAFS
ISSN: 1859 - 0373 Đăng tải tại: www.vafs.gov.vn

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN MẬT ĐỘ TẾ BÀO CỦA SÁU CHỦNG VI KHUẨN SINH MÀNG NHẦY

Vũ Văn Định, Phạm Văn Nhật, Nguyễn Thị Loan, Trần Nhật Tân

Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

Từ khóa: Điều kiện nuôi cấy, mật độ tế bào, vi khuẩn sinh màng nhầy

TÓM TẮT

Vi khuẩn sinh màng nhầy (polysacarit) có vai trò quan trọng trong việc giữ ẩm đất và vật liệu cháy dưới tán rừng. Trong quá trình sinh trưởng phát triển, vi khuẩn sinh màng nhầy tiết ra polysacarit sinh học có khả năng giữ ẩm cho đất. Màng nhầy của vi sinh vật có vai trò rất quan trọng trong cải tạo đất và giữ ẩm cho đất. Nghiên cứu này xác định một số điều kiện thích hợp để nuôi cấy các chủng vi khuẩn sinh màng nhầy; đây là cơ sở khoa học nhằm mục đích nghiên cứu sản xuất chế phẩm giữ ẩm đất và vật liệu cháy dưới tán rừng thông. 6 chủng vi khuẩn sinh màng nhầy gồm P08, P16.1, P09, P36 (*Bacillus aryabhattai*), P54.1 (*Paenibacillus polymyxa)* và chủng P73 (*Paenibacillus jamilae*) sinh trưởng và phát triển phù hợp nhất trên môi trường AT lỏng, pH = 7, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 72 giờ ở nhiệt độ 25^{o}C; mật độ tế bào đạt 10^{9} (cfu/ml).

Keywords: Submerged culture condition, cell density, polysaccharide synthesized bacteria

Research on affects of submerged culture condition to cell density of six strains polysaccharide synthesized bacteria

Polysaccharide synthesized bacteria play an important role in moisturizing of soil and burning materials under forest canopy. In the process of growth and development, polysaccharide synthesized bacteria secrete biological polysaccharides that hold moisture in the soil. Mucous membranes of microorganisms play an important role in soil improvement and soil moisture. This study has identified appropriate submerged culture condition of polysaccharide synthesized bacteria. This is the scientific basis for the purpose of researching and manufacturing inoculants to keep humidity of soil and flammable materials under the canopy of pine forests. Six strains of polysaccharide synthesized bacteria include P08, P16.1, P09, P36 (*Bacillus aryabhattai*), P54.1 (*Paenibacillus polymyxa),* and strain P73 (*Paenibacillus jamilae*) grow and develop most appropriately on liquid AT medium, pH = 7, shaking speed of 150 rpm for 72 hours at 25^{o}C, cell density reaches 10^{9} (cfu/ml).

I. MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam giai đoạn từ năm 2014 đến tháng 12/2019 xảy ra 2.160 vụ cháy rừng, diện tích cháy là 10.496 ha. Năm 2019 cả nước đã xảy ra 292 vụ cháy rừng diện tích thiệt hại lên đến 1.997 ha. Trong các loại rừng thì rừng thông có nguy cơ cháy cao nhất và khi đã cháy thì rất khó để dập tắt do đặc điểm của vật liệu cháy dưới tán rừng thông nhiều và có hàm lượng nhựa. Theo nghiên cứu của Weitmann (1918) đã xác định được mối quan hệ chặt chẽ giữa hàm lượng nước trong vật liệu cháy (thảm khô, thảm mục và cỏ dại) với khả năng phát sinh cháy rừng. Tăng độ ẩm của vật liệu cháy dưới tán rừng là một trong các biện pháp làm giảm khả năng cháy rừng. Nhóm vi sinh vật (VSV) sinh màng nhầy (polysacarit) có vai trò quan trọng trong việc giữa ẩm đất và vật liệu cháy dưới tán rừng, trong quá trình sinh trưởng phát triển, vi sinh vật đã tiết ra polysacarit sinh học có khả năng giữ nước, chống rửa trôi, làm giảm sự bay hơi do vậy nhóm VSV sinh màng nhầy có khả năng cải tạo đất khô hạn thông qua đó độ phì của đất được cải thiện (Babieva và Gorin, 1975; Nguyễn Kiều Băng Tâm, 2009; Nguyễn Thu Hà, 2012). Quá trình làm tăng kết cấu đất được thực hiện khi VSV sinh màng nhầy phân giải các chất hữu cơ và đồng thời tiết ra chất nhầy polysaccarit (Tống Kim Thuần *et al.*, 2003; Malcom C *et al.*, 1993). Trên thực tế chế phẩm sinh màng nhầy có khả năng giữ ẩm cho đất cao hơn so với đối chứng khoảng 7,3 - 16,6% trong điều kiện có cây trồng sau 60 ngày bón chế phẩm (Nguyễn Kiều Băng Tâm, 2009). Bài báo này trình bày ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến mật độ tế bào của 6 chủng vi khuẩn sinh màng nhầy bao gồm: Chủng vi khuẩn P08, P16.1, P09, P36 (*Bacillus aryabhattai*), chủng vi khuẩn P54.1 (*Paenibacillus polymyxa)* và chủng vi khuẩn P73 (*Paenibacillus jamilae*). Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy như: Môi trường nuôi cấy, pH, tốc độ lắc, thời gian lắc, nhiệt độ nuôi cấy đến sinh trưởng, mật độ tế bào của 6 chủng vi khuẩn sinh màng nhầy.

II. ĐỊA ĐIỂM, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam (46 Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội).

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng giống vi khuẩn sử dụng gồm:

- Chủng vi khuẩn P08, P16.1, P09, P36 (*Bacillus aryabhattai*).
- Chủng vi khuẩn P54.1 (*Paenibacillus polymyxa)*
- Chủng vi khuẩn P73 (*Paenibacillus jamilae*)

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Phương pháp xác định môi trường nuôi cấy phù hợp: Thí nghiệm được thực hiện với 3 loại môi trường khác nhau: Môi trường PD (20 g Glucose, 200 g khoai tây, 1.000 ml H_2O); môi trường AT lỏng (20 g $CaCO_3$; 20 g D-Glucose; 0,8 g K_2HPO_4; 0,5 g $MgSO_4.7H_2O$; 0,2g KH_2PO_4; 0,1 $FeCl_3.6\ H_2O$; 0,05 g $Na_2MoO_4.2\ H_2O$; 12g Agar; Nước cất 1.000 ml) và môi trường King'B lỏng (0,15 g K_2HPO_4, 0,15 g $MgSO_4.7H_2O$, 20 g Peptone, 10 g Glycerol, 1000 ml H_2O). Tốc độ lắc (150 vòng/phút), nhiệt độ ở 28^oC, thời gian nhân sinh khối 72 giờ, mỗi thí nghiệm thực hiện với 10 bình tam giác 500 ml, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Dựa trên mật độ vi khuẩn để lựa chọn môi trường nuôi cấy phù hợp.

- Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy

Phương pháp xác định pH nhân sinh khối phù hợp: Được tiến hành với 6 dải pH cụ thể như sau: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 mỗi thí nghiệm thực hiện với 10 bình tam giác 500 ml, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Cấy 3 vòng que cấy VSV vào mỗi bình và nuôi cấy lắc với tốc độ 150 vòng/phút với thời gian nhân sinh khối 72

giờ. Đếm số khuẩn lạc bằng phương pháp pha loãng tới hạn (Nguyễn Lân Dũng và Phạm Văn Ty, 1998).

- Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Phương pháp xác định tốc độ lắc phù hợp: Được thực hiện với 4 công thức ở các tốc độ lắc khác nhau (0, 100, 150, 200 vòng/phút) mỗi tốc độ lắc với 10 bình tam giác 500 ml, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Cấy 3 vòng que cấy VSV vào mỗi bình và nuôi cấy lắc ở các tốc độ khác nhau, nhiệt độ ở 28^{o}C, trong thời gian 72 giờ. Dựa trên mật độ vi khuẩn để lựa chọn tốc độ lắc phù hợp.

- Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Phương pháp xác định thời gian nuôi cấy phù hợp: Được thực hiện với 5 công thức ở các thời gian nuôi cấy khác nhau (24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ) mỗi công thức 10 bình tam giác 500 ml, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Cấy 3 vòng que cấy VSV vào mỗi bình và nuôi cấy lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 28^{o}C. Dựa trên mật độ vi khuẩn để lựa chọn thời gian nuôi cấy phù hợp.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Phương pháp xác định nhiệt độ nuôi cấy phù hợp: Được tiến hành với 5 công thức ở các thang nhiệt độ khác nhau (15^{o}C, 20^{o}C, 25^{o}C, 30^{o}C, 35^{o}C, 40^{o}C) mỗi thí nghiệm 10 bình tam giác 500 ml, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Cấy 3 vòng que cấy VSV vào mỗi bình và nuôi cấy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong thời gian 72 giờ. Dựa trên mật độ vi khuẩn để lựa chọn nhiệt độ nuôi cấy phù hợp.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu

- Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Thí nghiệm được thực hiện với 3 loại môi trường lỏng (PD; AT; King'B) với tốc độ nhân sinh khối (150 vòng/phút), nhiệt độ ở 28^{o}C, thời gian nhân sinh khối 72 giờ kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến mật độ tế bào của vi khuẩn sinh màng nhầy

TT	Chủng VSV	Mật độ tế bào (Log cfu/ml)			Fpr	Lsd
		PD	AT	King'B		
1	P08	9,519	9,813	9,613	<0,001	0,00999
2	P09	9,544	9,820	9,623	<0,001	0,00764
3	P16.1	9,556	9,839	9,653	<0,001	0,00690
4	P36	9,531	9,826	9,633	<0,001	0,00973
5	P54.1	9,447	9,724	9,556	<0,001	0,01186
6	P73	9,556	9,740	9,531	<0,001	0,01113

Kết quả bảng 1 cho thấy mật độ tế bào của cả 6 chủng vi khuẩn sinh màng nhầy trên ở các môi trường khác nhau có sự khác biệt rõ rệt về mặt thống kê (Fpr < 0,001) môi trường AT đều cao hơn so với hai môi trường còn lại (PD và King'B). Mật độ tế bào trên môi trường King'B dao động từ 3,4 × 10^9 - 4,5 × 10^9(cfu/ml) trong khi đó trên môi trường PD mật độ đạt từ 2,6 × 10^9 - 3,6 × 10^9 (cfu/ml). Mật độ tế bào trên môi trường AT lỏng dao động từ 5,3 × 10^9 - 6,9 × 10^9 (cfu/ml). Mật độ tế bào cao nhất là 6,9 × 10^9 (cfu/ml) của chủng

P16.1 (*Bacillus aryabhattai*), sau đó là 6,7 × 10^9 (cfu/ml) và 6,6 × 10^9 (cfu/ml) và 6,5 × 10^9 (cfu/ml) của các chủng P36, P09, P08 (*Bacillus aryabhattai*); 2 chủng còn lại, P73 (*Paenibacillus jamilae*) đạt 5,5 × 10^9 (cfu/ml) và P54.1 (*Paenibacillus polymyxa)* đạt 5,3 × 10^9 (cfu/ml). Từ kết quả thí nghiệm này có thể thấy AT lỏng là môi trường phù hợp để nuôi cấy vi khuẩn sinh màng nhầy.

- Ảnh hưởng của pH môi trường

pH có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn sinh màng nhầy, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH đến mật độ của các chủng vi khuẩn sinh màng nhầy

TT	Chủng VSV	Mật độ tế bào (Log cfu/ml)						Fpr	Lsd
		pH = 4	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9		
1	P08	8,398	9,568	9,716	9,845	9,716	8,505	<0,001	0,01009
2	P09	8,398	9,556	9,708	9,851	9,732	8,491	<0,001	0,01308
3	P16.1	8,415	9,477	9,716	9,857	9,74	8,505	<0,001	0,00949
4	P36	8,380	9,568	9,724	9,851	9,724	8,519	<0,001	0,01162
5	P54.1	8,342	9,531	9,643	9,833	9,690	8,477	<0,001	0,01126
6	P73	8,322	9,505	9,602	9,813	9,663	8,447	<0,001	0,01015

Số liệu bảng 2 cho thấy mật độ của các chủng vi khuẩn sinh màng nhầy thấp nhất khi pH = 4, mật độ tế bào chỉ đạt từ 2,1 - 2,6 × 10^8 (cfu/ml). Mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy tăng dần khi pH = 5 đến pH = 6, khi pH = 5, mật độ tế bào đạt 3,2 - 3,8 × 10^9 (cfu/ml), khi pH = 6, mật độ tế bào đạt 4,0 - 5,3 × 10^9 (cfu/ml). Mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy đạt mức cao nhất khi pH = 7 (đạt 6,5 - 7,2 × 10^9(cfu/ml)), mật độ tế bào cao nhất là 7,2 × 10^9(cfu/ml) của chủng P16.1 (*Bacillus aryabhattai)*. Tuy nhiên mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy lại giảm khi pH = 8 và pH = 9. Khi pH = 8, mật độ tế bào đạt 4,6 - 5,5 × 10^9 (cfu/ml), khi pH = 9, mật độ tế bào đạt 2,8 - 3,3 × 10^8 (cfu/ml). Như vậy, pH = 7 là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn sinh màng nhầy.

- Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Kết quả thí nghiệm về tốc độ lắc ảnh hưởng đến mật độ tế bào vi khuẩn sinh màng nhầy được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến mật độ tế bào vi khuẩn sinh màng nhầy

TT	Chủng VSV	Mật độ tế bào (Log cfu/ml)				Fpr	Lsd
		0 vòng/phút	100 vòng/phút	150 vòng/phút	200 vòng/phút		
1	P08	5,826	7,771	9,799	9,362	<0,001	0,00997
2	P09	5,826	7,833	9,813	9,380	<0,001	0,00994
3	P16.1	5,839	7,869	9,851	9,462	<0,001	0,00788
4	P36	5,833	7,785	9,813	9,447	<0,001	0,00734
5	P54.1	5,785	7,716	9,716	9,230	<0,001	0,01218
6	P73	5,799	7,740	9,748	9,322	<0,001	0,00836

Số liệu bảng 3 cho thấy mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn sinh màng nhầy ở các tốc độ lắc khác nhau có sự biến động rất lớn. Ở tốc độ lắc 150 vòng/phút mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy đạt 5,2 - 7,1 × 10^9 (cfu/ml) và cao hơn rất nhiều so với mật độ ở 3 tốc độ lắc còn lại. Trong khi đó mật độ để tĩnh chỉ đạt 6,1 - 6,9 × 10^5 (cfu/ml). Mật độ tế bào của vi khuẩn sinh màng nhầy khi lắc ở tốc độ 100 vòng/phút đạt từ 5,5 - 7,4 × 10^7 (cfu/ml). Mật độ tế bào của vi khuẩn sinh màng nhầy khi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút đạt từ 1,7 - 2,9 × 10^9 (cfu/ml). Như vậy, 150 vòng/phút là tốc độ lắc phù hợp để nuôi cấy các chủng vi khuẩn sinh màng nhầy.

- Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Kết quả thí nghiệm về ảnh hưởng của thời nuôi cấy đến mật độ tế bào vi khuẩn sinh màng nhầy được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến mật độ tế bào vi khuẩn sinh màng nhầy

TT	Chủng VSV	Mật độ tế bào (Log cfu/ml)					Fpr	Lsd
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	120 giờ		
1	P08	3,556	5,813	9,799	8,826	7,672	<0,001	0,00837
2	P09	3,580	5,826	9,813	8,826	7,672	<0,001	0,00780
3	P16.1	3,580	5,833	9,826	8,833	7,681	<0,001	0,00749
4	P36	3,568	5,820	9,820	8,839	7,690	<0,001	0,00929
5	P54.1	3,531	5,708	9,699	8,633	7,519	<0,001	0,00970
6	P73	3,544	5,732	9,708	8,653	7,544	<0,001	0,00966

Số liệu bảng 4 cho thấy mật độ tế bào của 6 chủng vi khuẩn sinh màng nhầy tăng dần khi thời gian nuôi cấy tăng dần từ 24 giờ đến 48 giờ, mật độ tế bào đạt 3,4 - 3,8 × 10^3 (cfu/ml) sau 24 giờ nuôi cấy và đạt từ 5,1 - 6,8 × 10^5 (cfu/ml) sau 48 giờ nuôi cấy. Các chủng vi khuẩn sinh màng nhầy đạt mật độ cao nhất sau 72 giờ nuôi cấy, mật độ biến động từ 5,0 - 6,7 × 10^9 (cfu/ml). Tuy nhiên, mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn sinh màng nhầy giảm nhẹ sau 96 giờ nuôi cấy (đạt 4,3 - 6,9 × 10^8 (cfu/ml)) và sau 120 giờ nuôi cấy, mật độ chỉ đạt 3,3 - 4,9 × 10^7 (cfu/ml). Như vậy, 72 giờ là thời gian phù hợp nhất để nuôi cấy vi khuẩn sinh màng nhầy.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Nhiệt độ nuôi cấy có vai trò quan trọng trong sự phát triển của vi khuẩn. Nhằm xác định được nhiệt độ nuôi cấy phù hợp đối với 6 chủng vi khuẩn sinh màng nhầy.Thí nghiệm tiến hành với 6 công thức ở các thang nhiệt độ khác nhau (15^{o}C, 20^{o}C, 25^{o}C, 30^{o}C, 35^{o}C, 40^{o}C) kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy

TT	Chủng VSV	Mật độ tế bào (Log cfu/ml)						Fpr	Lsd
		15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C		
1	P08	6,544	8,756	9,799	8,813	7,708	6,380	<0,001	0,00810
2	P09	6,556	8,763	9,820	8,820	7,716	6,380	<0,001	0,00830
3	P16.1	6,568	8,785	9,826	8,839	7,724	6,431	<0,001	0,00831
4	P36	6,556	8,771	9,813	8,833	7,716	6,398	<0,001	0,00806
5	P54.1	6,531	8,740	9,708	8,633	7,672	6,342	<0,001	0,00981
6	P73	6,544	8,748	9,716	8,653	7,690	6,362	<0,001	0,01028

Số liệu bảng 5 cho thấy mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn sinh màng nhầy tăng dần khi nhiệt độ nuôi cấy tăng dần từ 15^{o}C đến 25^{o}C. Khi ở 15^{o}C mật độ tế bào đạt 3,4 - 3,7 × 10^{6} (cfu/ml), khi ở 20^{o}C mật độ tế bào đạt 5,5 - 6,1 × 10^{8} (cfu/ml), và mật độ cao nhất khi ở nhiệt độ 25^{o}C (đạt 5,1 - 6,7 × 10^{9} (cfu/ml)). Tuy nhiên, mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn sinh màng nhầy lại giảm dần khi nhiệt độ tăng dần đến 40^{o}C. Khi ở 30^{o}C mật độ tế bào đạt từ 4,3 - 6,9 × 10^{8} (cfu/ml), khi ở 35^{o}C mật độ tế bào đạt từ 4,7 - 5,3 × 10^{7} (cfu/ml) và mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy chỉ đạt 2,2 - 2,7 × 10^{6} (cfu/ml) ở 40^{o}C. Như vậy, 25^{o}C là nhiệt độ phù hợp nhất để nuôi cấy vi khuẩn sinh màng nhầy.

3.2. Thảo luận

Sáu chủng vi khuẩn sinh màng nhầy P08, P16.1, P09, P36 (*Bacillus aryabhattai*), P54.1 (*Paenibacilluspolymyxa) và* P73 (*Paenibacillusjamilae*) đều có điều kiện thích hợp để nuôi cấy là môi trường AT, pH = 7, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 72 giờ ở nhiệt độ 25^{o}C. Kết quả này cũng khá phù hợp với một số nghiên cứu trước đó về điều kiện nuôi cấy, sinh trưởng của một số loài vi sinh vật. Trong thí nghiệm xác định một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn, các chủng vi khuẩn cũng được nuôi trong môi trường lỏng, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 3 ngày để xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào (Trần Bảo Trâm *et al.*, 2016). Chủng *Bacillus aryabhattai* GYC2 - 3, có khả năng tổng hợp EPS (levan) với nhiệt độ tối ưu là 30°C, sản lượng Levan đã tăng ~ 38% (26 g/l) khi được cung cấp sục khí so với nuôi cấy tĩnh. Khi ở nhiệt độ 30°C sau 120 giờ ủ, cả hai chỉ số levan (4,6 g/l) và khối lượng tế bào thu được là tối đa. Khi nhiệt độ thay đổi trong phạm vi rộng từ 20°C đến 45°C, sự giảm nhiệt của levan tăng nhanh từ 20°C cho đến khi đạt được nhiệt độ tối ưu ở 30°C và sau đó giảm dần từ 30°C đến 45°C (Anam Nasira *et al.*, 2020). *Bacillus aryabhattai* BA03 là một chủng có thể phát triển trong nhiều điều kiện, mặc dù việc sản xuất vanillin tự nhiên có thể được tối ưu hóa trong hoạt động cụ thể điều kiện (37°C và 150 vòng/phút) (Alicia Paz *et al.,* 2018). Những kết quả này có sự khác biệt đáng kể về nhiệt độ thích hợp so với kết quả của nghiên cứu. Tuy nhiên, điều này không ảnh hưởng nhiều bởi có thể thấy khoảng nhiệt độ thích hợp cho chủng *Bacillus aryabhattai* là 25 - 30°C. Ở một nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, *Bacillus aryabhattai* GZ03 được phân lập từ nước biển sâu của Biển Đông, có thể sản xuất glucose và fructose bằng cách khử bã mía ở 25°C (Jian Wen *et al.,* 2015). Ảnh hưởng của giá trị pH đến sản xuất levan được nghiên cứu ở nhiệt độ tối ưu (30°C) với các giá trị pH khác nhau dao động từ 5,0 đến 8,0 cho thấy sinh khối tế bào tăng dần khi tăng pH, đạt tối đa ở pH = 7,0 và sau đó giảm nhẹ ở pH = 8,0. Cụ thể, dữ liệu trong nghiên cứu về levan cho thấy rằng sinh khối tế bào của chủng *Bacillus aryabhattai* GYC2 - 3 tăng hai lần khi tăng pH, đạt tối đa ở pH = 7,0 và sau đó giảm nhẹ ở pH = 8,0. Tuy nhiên, năng suất levan cao nhất là 12 g/l thu được ở pH = 8,0. (Anam Nasira *et al.,* 2020). Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả của nghiên cứu về pH tối ưu để nuôi cấy chủng *Bacillus aryabhattai.* Chủng *Paenibacillus polymyxa* tiết ra Arabinofuranosidase với hoạt tính cao, đã được chọn để sản xuất enzyme. Kết quả, điều kiện nuôi cấy được tối ưu hóa bằng cách sử dụng nuôi cấy bình lắc. Sản xuất Arabinofuranosidase đạt 25,2 U/ml trong điều kiện tối ưu hóa, là pH = 7,5; 28°C, và được lắc với tốc độ 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong 36 giờ. Nghiên cứu này cũng chỉ ra, vi khuẩn tạo ra nồng độ tối đa của α-L-

arabinofuranosidase (19,41 U/ml) ở pH trung bình ban đầu là 7,0; sự gia tăng độ pH gây ra sản xuất enzyme thấp hơn (Juan Gao *et al.*, 2018). Thí nghiệm sản xuất exopolysacarit trong quá trình tăng trưởng của chủng *Paenibacillus jamilae* cũng sử dụng điều kiện nuôi cấy trong môi trường lỏng với pH và nhiệt độ tối ưu (pH = 7 và 30°C) (Margarita Aguilera *et al.,* 2008). Một số thí nghiệm về các chủng thuộc chi *Paenibacillus* như loại bỏ chì bằng exopolysacarit từ chủng *Paenibacillus peoriae* TS7, cho thấy tỷ lệ chì loại bỏ tối đa đạt được ở lắc ở 30°C với pH = 6,8 (Samira Fella-Temzi *et al.,* 2018).

IV. KẾT LUẬN

- Điều kiện thích hợp cho nuôi cấy sáu chủng VSV sinh polysaccarit nghiên cứu (Chủng P08, P16.1, P09, P36 (*Bacillus aryabhattai*); chủng vi khuẩn P54.1 (*Paenibacillus polymyxa);* chủng vi khuẩn P73 (*Paenibacillus jamilae*)) như sau:

- Môi trường nuôi cấy: Môi trường AT; mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy đạt 5,3 × 10^9 - 6,9 × 10^9 (cfu/ml).

- pH: 7; mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy đạt 6,5 - 7,2 × 10^9 (cfu/ml).

- Tốc độ lắc: 150 vòng/phút, mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy đạt 5,2 - 7,1 × 10^9cfu/ml.

- Nhiệt độ: 25^{o}C, mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy đạt 5,1 - 6,7 × 10^9(cfu/ml).

- Thời gian nuôi cấy: 72 giờ, mật độ vi khuẩn sinh màng nhầy đạt 5,0 - 6,7 × 10^9(cfu/ml).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bế Minh Châu, 2001. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện khí tượng đến độ ẩm và khả năng cháy của vật liệu dưới rừng thông góp phần hoàn thiện phương pháp dự báo cháy rừng tại một số vùng trọng điểm thông ở miền Bắc Việt Nam, Luận án tiến sỹ, Trường Đại học Lâm nghiệp Việt Nam.
2. Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2019. Quyết định số 911/QĐ-BNN-TCLN ngày 19/03/2019 về việc công bố hiện trạng rừng toàn quốc năm 2018.
3. Hồng Nhung, 2018. Suy thoái rừng trên thế giới - Thực trạng và giải pháp. Tạp chí Mặt trận. Thứ ba, 18/09/2018.
4. Nguyễn Kiều Băng Tâm, 2009. Luận án tiến sỹ Thổ nhưỡng học. Chuyên ngành Đất và Dinh dưỡng. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm nấm men Lipomyces sinh màng nhầy nhằm giữ ẩm và cải thiện một số tính chất đất dốc tại Mê Linh, Vĩnh Phúc.
5. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 2002. Vi sinh vật học, NXB Giáo dục.
6. Nguyễn Thu Hà, 2012. Nghiên cứu phát triển các giải pháp sinh học nhằm cải tạo đất bạc màu. Báo cáo tổng kết đề tài KHCN.
7. Tống Kim Thuần, Đặng Thị Mai, Trần Thanh Thủy, 2003. Nghiên cứu vi khuẩn sinh màng nhầy polysaccarit để sản xuất chế phẩm vi sinh giữ ẩm cho đất phục vụ phủ xanh đất trồng đồi núi trọc. Báo cáo Hội nghị công nghệ sinh học Toàn Quốc lần thứ 2, Hà Nội 12/2003, tr.384 - 387.
8. Trần Bảo Trâm, Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Hiền, Ngô Thị Hoa, Nguyễn Thu Hiền, Nguyễn Huy Hoàng, 2016. Phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn phân giải cellulose từ đất trồng Sâm ngọc linh tại tỉnh Quảng Nam, Tạp chí Công nghệ Sinh học 14(1): 55 - 61.
9. Alicia Paz, David Outeiriño, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, José Manuel Domínguez, 2018. Fed-batch production of vanillin by *Bacillus aryabhattai* BA03, New Biotechnology 40, p186 - 191.
10. Anam Nasira, Fazal Sattara, Iram Ashfaqa, Stephen R. Lindemannb, Ming-Hsu Chen, Wim Van den Ended, Ebru Toksoy Önere, Onur Kirtele, Shazia Khaliqa, M. Afzal Ghauria, Munir A. Anwara, 2020. Production and

characterization of a high molecular weight levan and fructooligosaccharides from a rhizospheric isolate of *Bacillus aryabhattai.* LWT - Food Science and Technology.

11. Babjeva I.P., Gorin S.E., 1975. Lipomyces anomalus sp.nov, Antonie Van Leeuwenhoek, 41 (2) P.185 - 191.
12. Jian Wen, Chong Ren, Nan Huang, Yang Liu, Runying Zeng, 2015. Draft genome of bagasse-degrading bacteria *Bacillus aryabhattai* GZ03 from deep sea water, Marine Genomics 19, p13 - 14.
13. Juan Gao, Yan Zhao, Guocai Zhang, Yumei Li, Qiang Li, 2018. Production optimization, purification, expression, and characterization of a novel α-L-arabinofuranosidase from *Paenibacillus polymyxa*. Electronic Journal of Biotechnology 36 p23 - 33.
14. Malcom Cresser, Ken Killham, Tony Edward, 1993. Soil chemistry & its application, Cambridge university press.
15. Margarita Aguilera, Maria Teresa Quesada, Vı́ctor Guerra del A´ guila, Jose´ Antonio Morillo, Maria Angustias Rivadeneyra, Alberto Ramos-Cormenzana, Mercedes Monteoliva-Sánchez, 2008. Characterisation of Paenibacillus jamilae strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. Bioresource Technology 99 p5640 - 5644.
16. Samira Fella-Temzi, Drifa Yalaoui-Guellal, Miguel A. Rodriguez-Carvajal, Djellali Belhadi, Khodir Madani, Yahia Kaci, 2018. Removal of lead by exopolysaccharides from Paenibacillus peoriae strainTS7 isolated from rhizosphere of durum wheat, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 16, p425 - 432

Email tác giả liên hệ: vudinhfsiv@gmail.com

Ngày nhận bài: 08/09/2020

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 19/09/2020

Ngày duyệt đăng: 15/10/2020