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 SINH TRƯỞNG CỦA BỐN CHỦNG VI KHUẨN PHÂN GIẢI XENLULO

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

Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

Từ khóa: Vi khuẩn phân giải xenlulo, phòng cháy rừng, mật độ tế bào vi khuẩn, điều kiện nuôi cấy

TÓM TẮT

Tính đến 31/12/2020, tổng diện tích rừng toàn quốc là 14.677.215 ha, trong đó rừng tự nhiên là 10.279.185 ha, rừng trồng là 4.398.030 ha. Tính riêng giai đoạn từ 2015 đến tháng 12/2020 tổng số đã xảy ra 1.928 vụ cháy rừng, diện tích cháy rừng lên đến 8.631 ha. Một trong những nguyên nhân chính gây cháy rừng là do vật liệu cháy dưới tán rừng tích tụ quá nhiều. Giảm vật liệu cháy dưới tán rừng bằng cách sử dụng vi khuẩn có khả năng phân giải xenlulo giúp phân giải nhanh vật liệu cháy góp phần cải thiện độ phì nhiêu của đất và hạn chế khả năng cháy rừng đang được quan tâm ứng dụng và được coi là một giải pháp hiệu quả, ít tốn kém và thân thiện với môi trường. Nghiên cứu này đã lựa chọn được điều kiện nuôi cấy thích hợp cho bốn chủng vi khuẩn (*Bacillus subtilis (*SSK, SSK1.2) và chủng *Bacillus megaterium* (SSK9.1, SSK9.2) có khả năng phân giải xenlulo như sau: môi trường nuôi cấy PD, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nuôi cấy 72 giờ ở nhiệt độ 25± 2^{o}Cvà pH =7; mật độ tế bào vi khuẩn đạt 2,6.10^{8} - 8,9. 10^{8} cfu/mL.

Keywords: Cellulolytic bacteria, forest fire prevention, bacterial cell density, submerged culture condition

Research on affects of submerged culture conditions to growth of four strains of cellulolytic bacteria

As of December 31, 2020, the total forest area of the country is 14,677,215 hectares, of which 10,279,185 hectares are natural forests and 4,398,030 hectares of planted forests. In the period from 2015 to December 2020, there were 1,928 forest fires, covering 8,631 hectares of forest fires. One of the main causes of forest fires is the accumulation of combustible materials under the forest canopy. Reducing combustible materials under the forest canopy by using cellulose-degrading bacteria to quickly decompose combustible materials, contributing to improving soil fertility and limiting the possibility of forest fires is being caried, applied and considered an effective, low-cost and environmentally friendly solution. This paper has selected suitable culture conditions for four strains of bacteria (*Bacillus subtilis* (SSK, SSK1.2) and *Bacillus megaterium* (SSK9.1, SSK9.2) capable of degrading cellulose as follows: PD culture field, shaking speed 150 rpm, culture time 72 hours at độ 25± 2^{o}C and pH = 7; bacterial cell density reached 2.6×10^{8-} 8.9×10^{8} cfu/mL.

I. MỞ ĐẦU

Tính đến 31/12/2020, tổng diện tích rừng toàn quốc là 14.677.215 ha, trong đó rừng tự nhiên là 10.279.185 ha, rừng trồng là 4.398.030 ha theo Quyết định số 1558/QĐ-BNN-TCLN ngày 13/4/2021 của Bộ Nông nghiệp và PTNT. Công tác quản lý bảo vệ và phát triển rừng thời gian qua đã đạt được những kết quả quan trọng, diện tích rừng trồng tăng nhanh góp phần nâng cao độ che phủ rừng lên 42,01% năm 2020. Nhưng tính riêng giai đoạn từ 2015 đến tháng 12/2020 tổng số đã có 1.928 vụ cháy rừng, diện tích cháy rừng lên đến 8.631 ha. Trong đó cháy rừng thông chiếm diện tích lớn vì trong lá thông có chứa hàm lượng nhựa từ 2%-12% (Bế Minh Châu, 2001), khi cháy lửa lan nhanh, khó dập tắt nên thường gây nhiều thiệt hại lớn. Một trong những nguyên nhân quan trọng gây cháy rừng là do vật liệu dưới tán rừng tích tụ quá nhiều, việc giảm thiểu vật liệu cháy dưới tán rừng bằng cách sử dụng vi sinh vật phân giải xenlulo đang được quan tâm ứng dụng và được coi là một giải pháp hiệu quả và ít tốn kém (Doerr and Santín, 2016; Vũ Văn Định *et al.,* 2020). Ngoài các chủng nấm thì vi khuẩn cũng là những đối tượng có khả năng phân giải xenlulo rất tốt như: Chủng *Bacillus subtilis* QST713 phân giải xenlulo, tăng cường sự hấp thu phốt pho (Aurora Moreno-Lora *et al.*, 2019). Chủng *Bacillus megaterium* có khả năng phân giải xenlulo, đối kháng với nấm gây bệnh và cố định đạm (De Vos, P. *et al.*,2009). Sử dụng vi khuẩn có khả năng phân giải xenlulo giúp phân giải nhanh vật liệu cháy góp phần cải thiện độ phì nhiêu của đất và hạn chế khả năng cháy rừng. Bài báo này trình bày ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến mật độ tế bào của bốn chủng vi khuẩn phân giải xenlulo: hai chủng *Bacillus subtilis* (SSK, SSK1.2) và 2 chủng *Bacillus megaterium* (SSK9.1, SSK9.2). Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy (môi trường, pH, tốc độ lắc, thời gian lắc, nhiệt độ lắc) đến sinh trưởng của bốn chủng vi khuẩn nhằm tạo cơ sở khoa học phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học mới từ các chủng vi khuẩn phân giải xenlulo.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm, vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm

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).

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng giống vi khuẩn sử dụng gồm: Chủng vi khuẩn phân giải xenlulo SSK, SSK1.2 (*Bacillus subtilis);* chủng SSK9.1, SSK9.2 (*Bacillus megaterium).*

2.2. 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 (khoai tây 200 g, D-Glucose 20 g, H_2O 1.000 mL), CMC lỏng (K_2HSO_4 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g, NaCl 0,001 g, CMC 10 g, H_2O 1.000 mL); Yeast extract lỏng (Yeast extract 10 g, Glucose 20 g, $CaCO_3$ 20 g). Mỗi thí nghiệm 10 bình tam giác 500 mL (mỗi bình có 250 mL môi trường lỏng), thí nghiệm lặp lại 3 lần. Sau khi 3 loại môi trường được hấp khử trùng ở điều kiện nhiệt độ 121^0C, 1 atm trong thời gian 20 phút. Để nguội và sử dụng pipatman hút lấy một lượng như nhau (2 mL dịch khuẩn) cho vào các bình nuôi cấy riêng rẽ từng chủng. Thí nghiệm được thực hiện với tốc độ lắc (150 vòng/phút), nhiệt độ ở 25 ± 2^oC, thời gian lắc 72 giờ. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc theo

phương pháp pha loãng tới hạn của (Huys, G 2002; Phạm Thị Tuyết Ngân *et al.,* 2020).

- Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Phương pháp xác định tốc độ lắc phù hợp: Được thực hiện trên môi trường PD với 5 công thức ở các tốc độ lắc khác nhau (0, 100, 150, 200, 250 vòng/phút), nhiệt độ 25 ± 2^{o}C, thời gian lắc 72 giờ, mỗi tốc độ lắc 10 bình tam giác 500 mL thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Phương pháp xác định thời gian nuôi cấy phù hợp được thực hiện với 4 công thức ở các thời gian nuôi cấy khác nhau (24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ), tốc độ lắc150 vòng/phút ở nhiệt độ 25 ± 2^{o}C. Mỗi công thức 10 bình tam giác 500 mL, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Phương pháp xác định nhiệt độ nuôi cấy phù hợp: Được tiến hành với 6 công thức trên môi trường PD ở các thang nhiệt độ khác nhau (15^{0}C, 20^{0}C, 25^{0}C, 30^{0}C, 35^{0}C, 40^{0}C). Thời gian nuôi cấy 72 giờ, tốc độ lắc (150 vòng/phút). Dựa trên mật độ vi khuẩn để lựa chọn nhiệt độ nuôi cấy phù hợp.

- Ảnh hưởng của pH nuôi cấy

Phương pháp xác định nhiệt độ nuôi cấy phù hợp: Được thực hiện trên môi trường PD ở 6 dải pH khác nhau: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 và 9,0. Nhiệt độ nuôi cấy 25 ± 2^{o}C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nuôi cấy 72 giờ.

Mật độ vi khuẩn ở tất cả các công thức nghiệm được xác định bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc theo phương pháp pha loãng tới hạn của (Huys, G 2002; Phạm Thị Tuyết Ngân *et al.,* 2020).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu

- Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho vi khuẩn phân giải xenlulo

Môi trường là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng trực tiếp tới sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Để xác định môi trường phù hợp nhất với vi khuẩn phân giải xenlulo, tiến hành thí nghiệm trên 3 loại môi trường lỏng (PD; CMC; Yeast extract) với tốc độ lắc (150 vòng/phút), ở nhiệt độ 25 ± 2^{o}C, thời gian lắc 72 giờ. Kết quả về mật độ khuẩn lạc được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường đến mật độ vi khuẩn phân giải xenlulo

TT	Chủng	Mật độ tế bào (Log cfu/mL)			Fpr	LSD
		PD	CMC	Yeast extract		
1	SSK	8,71	8,64	8,49	< 0,001	0,02828
2	SSK1.2	8,81	8,55	8,46	< 0,001	0,02827
3	SSK9.1	8,42	8,31	8,12	< 0,001	0,02989
4	SSK9.2	8,64	8,61	8,21	< 0,001	0,02913

Số liệu trình bày ở bảng 1 cho thấy mật độ tế bào của 4 chủng vi khuẩn phân giải xenlulo ở các môi trường khác nhau có sự khác biệt rõ rệt về mặt thống kê (Fpr < 0,001). Kết quả mật độ tế bào trên môi trường PD của cả 4 chủng đều cao hơn so với hai môi trường còn lại (CMC, Yeast extract) và dao động từ 2,6.10^{8} - 6,5.10^{8} (cfu/mL). Mật độ tế bào trên môi trường CMC dao động từ 2.10^{8} - 4,4.10^{8} (cfu/mL), trong khi đó trên môi trường Yeast

extract mật độ đạt từ $1,3.10^8$ - $3,1.10^8$ (cfu/mL). Trên môi trường PD, mật độ tế bào cao nhất đạt $6,5.10^8$ (cfu/mL) của chủng *Bacillus subtilis* SSK1.2, tiếp theo là chủng *Bacillus subtilis* SSK1.2 có mật độ tế bào thấp hơn, đạt $5,1.10^8$(cfu/mL). Mật độ 2 chủng SSK 9.1 và SSK 9.2 (*Bacillus megaterium*) đều thấp hơn, đạt $2,6.10^8$ và $4,4.10^8$(cfu/mL). Từ kết quả thí nghiệm này có thể thấy PD là môi trường phù hợp để nuôi cấy vi khuẩn phân giải xenlulo.

- Xác định tốc độ lắc thích hợp cho vi khuẩn phân giải xenlulo

Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của tốc độ lắc tới sự sinh trưởng của vi khuẩn cho thấy mật độ tế bào của 4 chủng vi khuẩn phân giải xenlulo ở các tốc độ lắc khác nhau có sự khác biệt rõ rệt về mặt thống kê (Fpr < 0,001). Kết quả về mật độ tế bào với 5 công thức ở các tốc độ lắc khác nhau (0, 100, 150, 200, 250 vòng/phút) được thực hiện ở nhiệt độ 25± 2^0C, thời gian lắc 72 giờ được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến mật độ vi khuẩn phân giải xenlulo

TT	Chủng	Mật độ tế bào (Log cfu/mL)					Fpr	LSD
		0 vòng/phút	100 vòng/phút	150 vòng/phút	200 vòng/phút	250 vòng/phút		
1	SSK	7,30	8,10	8,75	8,06	7,91	< 0,001	0,02859
2	SSK1.2	7,77	8,18	8,82	8,42	7,82	< 0,001	0,02934
3	SSK9.2	7,74	8,65	8,92	8,52	7,42	< 0,001	0,02744
4	SSK9.1	7,42	8,61	8,95	8,68	7,34	< 0,001	0,02946

Mật độ tế bào sau 72 giờ nuôi cấy ở tốc độ lắc 150 vòng/phút có giá trị lớn nhất đạt $5,6.10^8$ - $8,9.10^8$ cfu/mL, kết quả này cao hơn so với các tốc độ lắc còn lại. Trong khi đó mật độ để tĩnh chỉ đạt $2,0.10^7$ - $5,8.10^7$(cfu/mL). Mật độ tế bào của vi khuẩn khi lắc ở tốc độ 100 vòng/phút đạt từ $1,2.10^8$ - $4,5.10^8$ (cfu/mL); ở tốc độ 200 vòng/phút đạt từ $1,2.10^8$ - $4,8.10^8$ (cfu/mL); ở tốc độ 250 vòng/phút đạt từ $2,2.10^7$ - $7,9.10^7$ (cfu/mL). Như vậy 150 vòng/phút là tốc độ lắc phù hợp để nuôi cấy các chủng vi khuẩn phân giải xenlulo. Khi ở tốc độ lắc 150 vòng/phút, mật độ tế bào của 2 chủng *Bacillus subtilis* SSK, *Bacillus subtilis* SSK1.2 lần lượt đạt $5,6.10^8$ và $6,6.10^8$ cfu/mL; 2 chủng *Bacillus megaterium* SSK9.1, *Bacillus megaterium* SSK 9.2 mật độ đạt được lần lượt là $8,8.10^8$ và $8,3.10^8$ cfu/mL.

- Xác định thời gian lắc phù hợp cho vi khuẩn phân giải xenlulo

Bốn chủng vi khuẩn phân giải xenlulo, đã tiến hành thí nghiệm với 4 công thức ở các thời gian nuôi cấy khác nhau (24, 48, 72, 96 giờ), nhiệt độ 25± 2^oC, tốc độ lắc 150 vòng/phút, bình tam giác 500 mL (lặp lại 3 lần). Kết quả của thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian lắc đến mật độ vi khuẩn phân giải xenlulo

TT	Chủng	Mật độ tế bào (Log cfu/mL)				Fpr	LSD
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ		
1	SSK	3,52	5,61	8,75	7,65	< 0,001	0,02853
2	SSK1.2	4,01	5,95	8,92	7,72	< 0,001	0,03096
3	SSK9.1	3,65	5,15	8,45	7,92	< 0,001	0,02787
4	SSK9.2	3,68	5,69	8,82	7,24	< 0,001	0,02986

Qua số liệu bảng 3 cho thấy mật độ tế bào của cả 4 chủng vi khuẩn phân giải xenlulo tăng dần khi thời gian nuôi cấy từ 24 giờ đến 48 giờ, mật độ tế bào đạt từ $3,3.10^3$ - 1.10^4 (cfu/mL) sau 24 giờ nuôi cấy và đạt từ $1,4.10^5$ - $8,9.10^5$ (cfu/mL) sau 48 giờ nuôi cấy. Bốn chủng *Bacillus subtilis* SSK, *Bacillus subtilis* SSK1.2, *Bacillus megaterium* SSK9.1 và *Bacillus megaterium* SSK9.2 có mật độ cao nhất tại thời điểm 72 giờ, đạt $2,8.10^8$ - $8,3.10^8$ cfu/mL. Sau 72 giờ mật độ tế bào bắt đầu giảm, ở 96 giờ mật độ của 4 chủng chỉ còn $1,9.10^7$ - $8,3.10^7$cfu/mL. Như vậy, 72 giờ là thời gian phù hợp nhất để nuôi cấy vi khuẩn phân giải xenlulo.

- Xác định nhiệt độ lắc phù hợp cho vi khuẩn phân giải xenlulo

Ảnh hưởng của nhiệt độ lắc tới sự sinh trưởng của vi khuẩn được thực hiện với 6 công thức ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C), tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian lắc 72 giờ. Sự khác biệt khá rõ ràng về sinh trưởng của các chủng vi khuẩn phân giải xenlulo ở các thang nhiệt độ khác nhau được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật độ vi khuẩn phân giải xenlulo

STT	Chủng	Mật độ tế bào (Log cfu/mL)						Fpr	LSD
		15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C		
1	SSK	5,7	6,98	8,84	8,15	7,65	6,62	< 0,001	0,02776
2	SSK1.2	5,75	6,92	8,96	8,22	7,78	6,88	< 0,001	0,02912
3	SSK9.1	5,38	6,85	8,8	8,07	7,58	6,6	< 0,001	0,02977
4	SSK9.2	5,4	6,83	8,76	8,02	7,52	6,56	< 0,001	0,02924

Số liệu ở bảng 4 cho thấy nhiệt độ trong quá trình nhân sinh khối ảnh hưởng lớn đến mật độ tế bào của cả 2 chủng vi khuẩn phân giải xenlulo. Khi nhiệt độ nuôi cấy là 15^0C, mật độ tế bào của 4 chủng vi khuẩn tương đối thấp, chỉ đạt 10^5 cfu/mL. Mật độ tế bào tăng lên khi nhiệt độ tăng ở 20°C, đạt $6,7.10^6$ - $9,5.10^6$ cfu/mL. Mật độ tế bào của 4 chủng *Bacillus subtilis* SSK, *Bacillus subtilis* SSK1.2, *Bacillus megaterium* SSK9.1 và *Bacillus megaterium* SSK9.2 đều đạt cao nhất tại nhiệt độ 25°C, đạt $5,8.10^8$ - $9,2.10^8$ cfu/mL. Tuy nhiên, mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn phân giải xenlulo lại giảm dần khi nhiệt độ tăng dần đến 40^0C. Ở nhiệt độ nuôi cấy 30°C, mật độ tế bào trong dịch nuôi cấy bắt đầu giảm nhẹ và đạt $1,1.10^8$ - $1,7.10^8$ cfu/mL. Khi ở 35^0C mật độ tế bào đạt từ $3,3.10^7$ - 6.10^7(cfu/mL) và mật độ vi khuẩn phân giải xenlulo chỉ đạt $3,6.10^6$ - $7,5.10^6$ (cfu/mL) ở 40^0C. Như vậy, 25^0C là nhiệt độ phù hợp để nuôi cấy vi khuẩn phân giải xenlulo.

- Xác định pH phù hợp cho vi khuẩn phân giảixenlulo

Kết quả thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn phân giải xenlulo được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của pH đến mật độ vi khuẩn phân giải xenlulo

STT	Chủng	Mật độ tế bào (Log cfu/mL)						Fpr	LSD
		pH = 4	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9		
1	SSK	3,80	5,10	7,80	8,82	7,80	5,95	< 0,001	0,02864
2	SSK1.2	3,72	5,05	7,65	8,7	7,92	6,12	< 0,001	0,02890
3	SSK9.1	3,65	4,85	7,31	8,22	7,55	6,25	< 0,001	0,02906
4	SSK9.2	3,59	4,80	7,20	8,14	7,45	6,10	< 0,001	0,02938

Số liệu ở bảng 5 cho thấy pH môi trường có ảnh hưởng rất lớn đến mật độ tế bào của cả bốn chủng vi khuẩn phân giải xenlulo. Cả bốn chủng đều có khả năng phát triển trong khoảng pH từ 4 - 9. Tuy nhiên, ở pH môi trường trung tính, mật độ tế bào của bốn chủng vi khuẩn đạt cao nhất $1,6.10^8$ - $6,6.10^8$ cfu/mL. Mật độ của các chủng vi khuẩn đạt thấp nhất khi pH = 4, mật độ tế bào chỉ đạt từ 3,9 - $6,3.10^3$(cfu/mL). Như vậy, pH = 7 là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn phân giải xenlulo. Khi pH = 7, mật độ tế bào cao nhất là $6,6.10^8$ (cfu/mL) của chủng SSK (*Bacillus subtilis)*, sau đó là 5.10^8 (cfu/mL) của chủng SSK1.2 (*Bacillus subtilis).* Hai chủng *Bacillus megaterium* (SSK9.1, SSK9.2) có mật độ tế bào lần lượt là $1,4.10^8$ và $1,6.10^8$ cfu/mL.

3.2. Thảo luận

Hai chủng vi khuẩn phân giải xenlulo: chủng SSK, SSK1.2 *(Bacillus subtilis)* đều có mật độ cao trên môi trường PD, pH=7, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 72 giờ, ở nhiệt độ 25 ± 2^0C. Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu về điều kiện nhân sinh khối, sinh trưởng của một số loài *Bacillus subtilis (*Phạm Quang Thu *et al.,* 2010*;* Trần Bảo Trâm *et al.,* 2016). Vi khuẩn *Bacillus subtilis* là một vi khuẩn probiotic đa chức năng. Nghiên cứu về điều kiện sinh trưởng của *Bacillus subtilis* phân lập từ cua biển (*Scylla paramamosain*) cũng cho thấy loài này không thể sinh trưởng ở pH dưới 2 và có khả năng sinh trưởng ở mức pH từ 3 - 7,4 trong đó phát triển tốt nhất ở pH=7,4 với mật độ trung bình 6,48 - 6,72 log cfu/mL (Wu *et al.,* 2014). Cả 2 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* AM2 và *Bacillus subtilis* AM3 đều có khả năng phát triển trong môi trường có pH dao động từ 4 - 9, tuy nhiên ở pH dưới 5, khả năng sinh trưởng của cả 2 chủng đều giảm so với ở các giá trị pH còn lại (Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và Huỳnh Văn Thịnh, 2020). Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra điều kiện tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp protease từ chủng *Bacillus subtilis* Bs04 là pH môi trường 7,5; thu nhận enzyme sau 36 giờ lên men (Nguyễn Hữu Tuyển *et al.,* 2019). Có thể thấy, pH 7 - 8 là tối ưu cho sự phát triển của *Bacillus subtilis.* Bên cạnh đó, các kết quả về điều kiện sinh trưởng như nhiệt độ nuôi cấy, tốc độ lắc, thời gian nhân sinh khối, nhiệt độ nhân sinh khối của các nghiên cứu đã được thực hiện trước cũng thể hiện sự tương đồng với kết quả của nghiên cứu trong bài báo đối với vi khuẩn phân giải xenlulo.

Một số nghiên cứu về chủng *Bacillus megaterium* cho thấy sinh khối tối đa 2,74 g/L PHB khi pH = 7 và thời gian 72 giờ (Mohanrasua *et al.,* 2020). *Bacillus megaterium* STB1 phân lập từ đất estuarine được thu thập từ khu vực Mitrena (Setúbal, Bồ Đào Nha) được nuôi cấy trong Tryptic Soy Agar (TSA) và Broth (TSB), ở 28°C với tốc độ lắc 150 vòng/phút thời gian 72 giờ. Kết quả cho thấy *Bacillus megaterium* STB1 là một loại vi khuẩn bào tử Gram dương, màu vàng nhạt, có thể phát triển từ 7°C đến 45°C (Francisco X. Nascimento *et al.,* 2020). Đây là những kết quả tương đồng với thí nghiệm trong bài báo này về chủng *Bacillus megaterium (*SSK9.1, SSK9.2).

IV. KẾT LUẬN

Mật độ của 4 chủng vi khuẩn phân giải xenlulo trên môi trường PD là tốt nhất, mật độ đạt $2,6.10^8$ - $8,9.10^8$ cfu/mL.

Ở tốc độ lắc 150 vòng/phút sinh khối vi khuẩn phân giải xenlulo đạt cao nhất (5,6 - $8,9.10^8$ cfu/mL).

Mật độ của bốn chủng vi khuẩn đạt cao nhất khi nhân sinh khối trong 72 giờ (đạt 2,8 - $8,3.10^8$ cfu/mL).

Mật độ vi khuẩn đạt cao nhất khi nhiệt độ nhân sinh khối là 25 ± 2^0C biến động từ 5,8 - $9,2.10^8$ cfu/mL với vi khuẩn.

pH =7 là phù hợp cho sự phát triển của các chủng vi khuẩn phân giải xenlulo, mật độ vi khuẩn dao động từ 1,6 - $6,6.10^8$ cfu/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aurora Moreno-Lora, Ramiro Recena, Antonio Delgado, 2019. *Bacillus subtilis* QST713 and cellulose amendment enhance phosphorus uptake while improving zinc biofortification in wheat, Applied Soil Ecology 142, 81 - 89.
2. 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.
3. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2021. Quyết định số 1558/QĐ - BNN -TCLN ngày 13/4/2021.
4. Doerr, S. H., & Santín, C., 2016. Global trends in wildfire and its impacts: perceptions versus realities in a changing world, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 371(1696), 20150345.
5. De Vos, P., 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer.
6. Vũ Văn Định, Nguyễn Thị Loan, Lê Thành Công, Phạm Văn Nhật Trần Nhật Tân, Lê Thị Xuân, Nguyễn Thị Tuyên, Hoàng Văn Dương, 2020. Phân lập tuyển chọn vi khuẩn phân giải cellulose dưới tán rừng thông ở Việt Nam. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, kỳ 1, tháng 7/2020.
7. Huys, G., 2002. Preservation of bacteria using commercial cry preservation systems. Standard Operation Procedure, Asia resist.
8. Kumawat, T. K., Sharma, A., & Bhadauria, S., 2016. Influence of liquid culture media, temperature and hydrogen ion concentration on the growth of mycelium and sporulation of Arthroderma multifidum, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res, 41(2), 136 - 141.
9. Mahmoud, M. A., Al-Othman, M. R., Abd-El-Aziz, A. R. M., Metwaly, H. A., & Mohamed, H. A., 2016. Expression of genes encoding cellulolytic enzymes in some Aspergillus species, Genet. Mol. Res, 15, 15048913.
10. Phạm Quang Thu, 2010. Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật hỗn hợp dạng viên nén cho bạch đàn và thông trên các lập địa thoái hoá, nghèo chất dinh dưỡng. Báo cáo tổng kết đề tài Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
11. Phạm Thị Tuyết Ngân, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên, Nguyễn Thanh Phương, Vũ Ngọc Út, 2020. Biến động mật độ vi khuẩn *Bacillus* spp. trên tuyến sông Mỹ Thanh, Sóc Trăng. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ tập 56, trang 64 - 70.
12. 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.
13. Francisco X. Nascimento, Anabel G. Hernández, Bernard R. Glick, Márcio J. Rossi, 2020. Các hoạt động thúc đẩy tăng trưởng thực vật và phân tích bộ gen của cây kháng stress *Bacillus megaterium* STB1, một loại vi khuẩn quan tâm đến nông nghiệp và công nghệ sinh học. Biotechnology Reports.
14. K. Mohanrasu, R. Guru Raj Rao, G.H. Dinesh, Kunyu Zhang, G. Siva Prakash, Dong-Po Song, Sudhakar Muniyasamy, Arivalagan Pugazhendhi, J. Jeyakanthan, A. Arun, 2020. Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. Fuel 271. 117522.
15. Wu, H. J., Sun, L. B., Li, C. B., 2014. Enhancement of the immune response and protection against *Vibrio parahaemolyticus* by indigenous probiotic *Bacillus* strains in mud crab (*Scylla paramamosain*). Fish & Shellfish Immunology, 41: 156 - 162.
16. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và Huỳnh Văn Thịnh, 2020. Đặc điểm của các dòng lợi khuẩn *Bacillus* spp. từ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở tỉnh Kiên Giang. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ tập 56, Số 2B: 44 - 52
17. Nguyễn Hữu Tuyển, Phạm Tiến Dũng, Phan Thị Kim Ngân, Ngô Võ Kế Thành, 2019. Tối ưu điều kiện sinh tổng hợp protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* Bs04 và xác định đặc tính của enzyme. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam số 68.

Email tác giả liên hệ: vudinhfsiv@gmail.com

Ngày nhận bài: 13/08/2021

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 18/09/2021

Ngày duyệt đăng: 20/09/2021