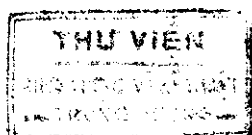


CHƯƠNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SINH HỌC QUỐC GIA KHCN-02
(BỘ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VÀ MÔI TRƯỜNG)
HỘI CÔNG NGHỆ SINH HỌC VIỆT NAM
(HỘI CÁC NGÀNH SINH HỌC VIỆT NAM)
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
(TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA)



BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TOÀN QUỐC, HÀ NỘI 1999
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE, HANOI 1999

(Khách sạn Thăng Lợi, Hà Nội, 9-10 tháng 12 năm 1999)



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI - 1999

VH 435
2003

E16843
H3136

BAN TỔ CHỨC

• CƠ QUAN CHỦ TRÌ

1. BỘ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VÀ MÔI TRƯỜNG, CHƯƠNG TRÌNH NGHIÊN CỨU "CÔNG NGHỆ SINH HỌC" QUỐC GIA
2. HỘI CÁC NGÀNH SINH HỌC VIỆT NAM, HỘI "CÔNG NGHỆ SINH HỌC"
3. TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA, VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

• CƠ QUAN TỔ CHỨC

1. VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC, TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
2. VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ THỰC PHẨM, TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
3. VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP, BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
4. VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM, BỘ CÔNG NGHIỆP
5. VIỆN CÔNG NGHỆ SAU THU HOẠCH, BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
6. TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC, ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
7. VIỆN NGHIÊN CỨU RƯỢU-BIA, BỘ CÔNG NGHIỆP
8. TỔNG CÔNG TY DƯỢC VIỆT NAM

• THÀNH VIÊN BAN TỔ CHỨC

- | | |
|------------------------------|---|
| 1. GS, TS Lê Văn Nhung | Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, Trưởng ban |
| 2. PGS, PTS Lê Trần Bình | Viện Công nghệ Sinh học, Phó Trưởng ban |
| 3. PTS Phạm Hữu Giục | Bộ Khoa học,
Công nghệ và Môi trường, Phó Trưởng ban |
| 4. GS, TS Phạm Thị Trân Châu | Đại học Quốc gia Hà Nội, Ủy viên |
| 5. GS, PTS Nguyễn Lân Dũng | Đại học Quốc gia Hà Nội, Ủy viên |
| 6. GS, TS Trần Phước Đường | Trường Đại học Cần Thơ, Ủy viên |

• BAN BIÊN TẬP

1. PGS, PTS Lê Trần Bình *Trưởng ban*
2. PGS, PTS Nguyễn Thị Đệ
3. PTS Trương Nam Hải
4. PTS Ngô Tiến Hiến
5. GS, TS Nguyễn Tài Lương
6. PGS, TS Lê Thị Muội
7. PGS, TS Trần Duy Quý

THÀNH PHẦN CÁC TIỂU BAN:

1. Tiểu ban Công nghệ Vi sinh

- | | |
|-------------------------------|--|
| <i>PTS Ngô Tiến Hiến</i> | <i>Viện Công nghệ Thực phẩm, Trưởng tiểu ban</i> |
| <i>PGS, PTS Lý Kim Bảng</i> | <i>Viện Công nghệ Sinh học</i> |
| <i>PGS, PTS Từ Minh Koóng</i> | <i>Trường Đại học Dược, Hà Nội</i> |
| <i>PTS Phạm Văn Toàn</i> | <i>Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam</i> |
| <i>PGS, PTS Nguyễn Văn Ty</i> | <i>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội</i> |
| <i>PGS, PTS Nguyễn Kim Vũ</i> | <i>Viện Công nghệ sau thu hoạch</i> |

2. Tiểu ban Công nghệ Enzym và Hoá sinh

- | | |
|--------------------------------|--|
| <i>GS, TS Nguyễn Tài Lương</i> | <i>Viện Công nghệ Sinh học, Trưởng tiểu ban</i> |
| <i>GS, TS Đái Duy Ban</i> | <i>Viện Công nghệ Sinh học</i> |
| <i>TS Võ Thương Lan</i> | <i>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội</i> |
| <i>PTS Nguyễn Thị Hiến</i> | <i>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội</i> |
| <i>PGS, PTS Nguyễn Văn Mùi</i> | <i>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội</i> |
| <i>PGS, PTS Đặng Thị Thu</i> | <i>Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội</i> |

3. Tiểu ban Công nghệ Tế bào

- | | |
|------------------------------------|--|
| <i>PGS, TS Lê Thị Muội</i> | <i>Viện Công nghệ Sinh học, Trưởng tiểu ban</i> |
| <i>TS Bùi Bá Bổng</i> | <i>Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long</i> |
| <i>PGS, PTS Trịnh Đình Đạt</i> | <i>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội</i> |
| <i>PTS Đỗ Năng Vịnh</i> | <i>Viện Di truyền Nông nghiệp</i> |
| <i>TS Bùi Xuân Nguyên</i> | <i>Viện Công nghệ Sinh học</i> |
| <i>PGS, PTS Nguyễn Quang Thạch</i> | <i>Trường Đại học Nông nghiệp I</i> |

4. Tiểu ban Công nghệ Di truyền

PGS, TS Trần Duy Quý	Viện Di truyền Nông nghiệp, Trưởng tiểu ban
PGS, PTS Lê Trần Bình	Viện Công nghệ Sinh học
PTS Nông Văn Hải	Viện Công nghệ Sinh học
GS, PTS Lê Đình Lương	Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.
PTS Vũ Đức Quang	Viện Di truyền Nông nghiệp
PGS, TS Nguyễn Thu Vân	Viện Vệ sinh Dịch tễ, Hà Nội

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
LỜI TỰA	29
P.1. Lê Văn Nhung, Trương Đình Kháng	
• Hoạt động nghiên cứu triển khai của chương trình nhà nước Công nghệ sinh học KHCN-02 năm 1996-1998 và triển vọng năm 1999-2000	31
• R & D activities of government program on biotechnology, khcn 02 in the period of 1996 - 1998 and perspectives of the period of 1999 - 2000.....	36
P.2. Phạm Hữu Giục	
• Định hướng phát triển công nghệ sinh học ở Việt Nam đến năm 2010	37
• Directives for Developemt of Biotechnology in Vietnam.....	66
P.3. Nguyễn Ngọc Kính	
• Chương trình kỹ thuật - kinh tế về công nghệ sinh học đến năm 2010	47
P.4. Lê Trần Bình	
• Hợp tác về công nghệ sinh học của các nước Asean	52
• Asean collaboration on biotechnology	56
P.5. Ngô Tiến Hiến	
• Một vài thành tựu về công nghệ lên men và enzym	57
P.6. Đỗ Năng Vịnh	
• Một số thành tựu và hướng phát triển của công nghệ tế bào thực vật có triển vọng ứng dụng ở nước ta.....	62
• Some achievements and development directives of plant cell biotechnology in Vietnam.....	70
P.7. Lê Trần Bình	
• Tình hình phát triển Công nghệ gene ở Việt Nam.....	71
• Current status of Genetic Engineering Research in Vietnam	75

Phần I. CÔNG NGHỆ VI SINH

1.O.1. Phạm Thu Trang, P.I. Rogers	
• Nghiên cứu sự phát triển, tạo bào tử và tính thể độc tố của chủng BS 2362 trên môi trường sử dụng bột đậu tương thủy phân	79
1.O.2. Võ Thị Thú, Nguyễn Kim Thoa, Nguyễn Thị Hương	
• Phân lập và tuyển chọn chủng <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (BTI) có hoạt lực cao với ấu trùng muỗi <i>Aedes aegypti</i>	85
• Isolation and selection of <i>Bacillus thuringiensis subsp.israelensis</i> with high toxicity against <i>Aedes aegypti</i> larvae	91

1.O.3. Nguyễn Kim Thoa, Nguyễn Thị Hoa, Trần Văn Sỹ, Đinh Thị Ngọc Tuyết, Võ Thị Thứ	
• Nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học diệt ấu trùng muỗi.....	92
• Studying on larvae mosquito toxin production.....	98
1.O.4. Nguyễn Văn Thường, Nguyễn Quỳnh Châu, Ngô Đình Quang Bình	
• Sản xuất chế phẩm sinh học diệt sâu <i>Bacillus thuringiensis</i> trên hệ thống lên men chìm.....	99
• Production of Bioinsecticide from <i>Bacillus thuringiensis</i> in the sink fermentation system	106
1.O.5. Văn Thị Hạnh, Nguyễn Thu Hằng, Nguyễn Văn Uyển, Nguyễn Trọng Bình	
• Phát triển virus <i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedral baculovirus (AcNPV) làm thuốc trừ sâu sinh học.....	107
• Development of <i>Autographa californica</i> nuclear polyhedral virus (AcNPV) as bioinsecticide	110
1.O.6. Nguyễn Văn Tuất, Trần Hữu Hạnh và CS	
• Nghiên cứu sử dụng nấm có ích để phòng trừ cỏ lồng vực ở Việt Nam.....	111
• Investigation of beneficial fungi to control barnyas grass (<i>Echinochloa crus - galli</i>) in Vietnam.....	115
1.O.7. Tống Kim Thuận, Bùi Thu Hà, Lý Kim Bảng	
• Nghiên cứu ảnh hưởng của một số thuốc bảo vệ thực vật và thuốc diệt khuẩn lên sự sinh trưởng của vi sinh vật gây bệnh tua mực (Witches broom) trên cây quế Trà My Quảng Nam.....	117
• Using biocide in protection of the cassia trees from "witches broom" disease	123
1.O.8. Nguyễn Thùy Châu, Nguyễn Hương Trà, Bùi Hải Hoà, Trương Thanh Bình, Trần Văn Tuấn, Lê Hữu Hiếu	
• Tuyển chọn các chủng <i>Bacillus subtilis</i> sinh iturin A như là chất diệt nấm sinh học từ đất và lá cây và nghiên cứu công nghệ sản xuất iturin A.....	124
• The screening of <i>Bacillus subtilis</i> isolates producing Iturin A as antifungal substance from soil and leaf samples and study on Iturin A production technology	132
1.O.9. Cao Văn Thu, Nguyễn Thế Đông, Nguyễn Thị Hoa	
• Nghiên cứu sinh tổng hợp kháng sinh từ hai chủng <i>Micromonospora</i> N°9 và N°108	133
• Studies on the biosynthetical fermentation of antibiotics from two strain <i>Micromonospora</i> N°9 and N°108	138
1.O.10. Lê Thanh Bình, Phạm Thị Ngọc Lan, Yoshimi Benno	
• Tác dụng tăng trưởng đối với gia cầm của chế phẩm vi sinh vật PRO99 ...	139
• The weight increment effect of microbial preparation PRO99.....	144
1.O.11. Phạm Văn Toán	
• Kết quả nghiên cứu triển khai công nghệ sản xuất phân bón vi sinh vật dạng tiềm sinh	145
• Results of research and application of the technology for production of biofertilizer from dormant microorganisms.....	157

- 1.O.12. **Nguyễn Đức Lương, Phạm Thanh Mai**
- Nghiên cứu khả năng phát triển của tảo *Spirulina platensis* trong nước thải nhà máy Vissan..... 158
 - Growth of *Spirulina Platensis* in Vissan Wastewater 162
- 1.O.13. **Lại Thuý Hiền, Phạm Thu Thuý, Đặng Phương Nga, Đỗ Thu Phương, Hoàng Hải, Phạm Thị Hằng**
- Chọn chủng vi khuẩn phân huỷ hydrocacbon mạch dài ứng dụng trong khai thác dầu khí 163
 - Selection of long chain hydrocarbon-utilizing bacteria for enhancement of oil recovery 169
- 1.O.14. **Phạm Hương Sơn, Đặng Xuyên Như, Phạm Văn Ty**
- Một vài đặc tính sinh học và khả năng phân huỷ hydrocacbon của hai chủng nấm men *Candida tropicalis* HS-10 và HS-15..... 170
 - Biological Properties and Hydrocarbons Degrading Activity of Two Strains of *Candida tropicalis* HS-10 and HS-35. 176
- 1.O.15. **Phạm Thị Ngọc Lan, Phạm Thị Hoà, Lý Kim Bảng**
- Tuyển chọn một số giống xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ mùn rác 177
 - Selection some strains *Streptomyces* cellulolytic dissintegrating from humus - waste..... 182
- 1.O.16. **Đặng Cẩm Hà, Nguyễn Bá Hữu, Cù Việt Nga, Trần Như Hoa, Nguyễn Thị Đệ**
- Thử nghiệm công nghệ phân huỷ sinh học làm sạch nước thải nhiễm dầu tại kho Hà Khẩu..... 183
 - Bioremediation treatments in field trial for cleaning up oil contaminated wastewater in Ha Khau petroleum product storage 191
- 1.O.17. **Đặng Xuyên Như, Nguyễn Phú Cường, Dương Hồng Dinh**
- Ứng dụng tảo và cột lọc sinh học trong xử lý nước thải sinh hoạt qui mô nhỏ..... 192
 - Using Algae and Biofilter for treat municipal sewage in small scale 198
- 1.O.18. **Nguyễn Văn Năm, Lại Thị Chí, Hoàng Phương Hà, Trần Văn Nhị, Phạm Văn Ty**
- Ảnh hưởng của một số chế phẩm vi sinh vật hữu hiệu lên quá trình xử lý khí cặn bùn nước thải làng nghề chế biến nông sản kết hợp chăn nuôi..... 199
 - Influence of some effective microbial products on anaerobic treatment sludge in agriculture product processing wastewater..... 205
- 1.O.19. **Nguyễn Thị Kim Cúc, Phạm Việt Cường, Nguyễn Thị Tuyết Mai, Lê Văn Nhung**
- Phân lập, định loại và một số tính chất của các chủng vi nấm, xạ khuẩn có tiềm năng ứng dụng trong quy trình xử lý vỏ cà phê..... 206
 - Isolation, identification and some properties of *Actinomycetes* and Fungi for applying in coffee processing waste treatment..... 213
- 1.O.20. **Nguyễn Thanh Hằng**
- Động thái của quá trình đường hóa bằng chế phẩm *Aspergillus awamori* và bằng chế phẩm San Super và ảnh hưởng của nó đến quá trình lên men rượu..... 214
 - The change of the sacharification of cassava mash by *A.awamori* and by Sansuper and their effects on alcohol fermentation 218

✓ 1.O.21. Nguyễn Thu Hà, Trương Hương Lan, Phạm Anh Tuấn, Nguyễn Thu Nga	
• Nghiên cứu chủng nấm men bia thích hợp trong lên men bia nồng độ cao.....	219
1.O.22. Hồ Phú Hà, Hoàng Đình Hoà, Nguyễn Thị Hiền	
• Ảnh hưởng của hàm lượng đạm amin trong dịch đường đến hệ số sinh sản riêng của nấm men bia.	229
• Influence of amin content molahes specific propogatin coefferience of yeasts.....	236
1.O.23. Nguyễn Mạnh Tuấn, Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Thị Hiền, Lương Đức Phẩm	
• Nghiên cứu khả năng lên men của bánh men rượu được làm từ các vi sinh vật thuần chủng phân lập tại Việt Nam.....	237
• Research on ability of alcohol fermentation of rice by using the yeast cakes added with some pure strains of microorganisms isolated in Vietnam.....	245
1.O.24. Trương Thị Thanh Bình, Đỗ Thị Ngọc Huyền, Trần Văn Tuấn, Bùi Thị Hương, Nguyễn Thủy Châu	
• Nghiên cứu công nghệ sản xuất đậu tương lên men từ vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> Natto	246
• The study on the soybean fermentation technology by <i>Bacillus subtilis</i> natto	255
1.O.25. Phạm Thuý Hồng, Yasuo Nakatomi và Hiroyuki Takano	
• Tạo chủng nấm men bánh mì có khả năng lên men đường cao bằng phương pháp lai rare -mating.....	256
• Construction of high sugar-fermentable baker's yeast by rare-mating technique	265
✓ 1.O.26. Nguyễn Quang Thảo, Nguyễn Thành Đạt, Nguyễn Quang Hào	
• Một số kết quả nghiên cứu lên men vang từ quả vải thiều (<i>Litchi chinensis</i>).....	266
• Some studying results in wine making from lychee fruits.....	276
✓ 1.O.27. Giang Thế Bình, Giang Thế Việt, Đặng Hồng Anh, Đặng Kim Tuyền, Nguyễn Thị Hiền	
• Nghiên cứu cố định các tế bào nấm men trong ca-aliginat để lên men rượu vang	278
• Study on the use of immobilized yeasts in the wine fermentation.....	291
1.O.28. Trần Văn Nhị, Đỗ Thị Tố Uyên	
• Nghiên cứu vi khuẩn quang hợp để sử dụng trong xử lý nước thải đậm đặc hữu cơ	292
• Study on photosynthetic bacteria for the use in treatment of organic waste water with high concentrations.....	300
1.O.29. Lê Thị Ánh Hồng, Phan Tố Phương, Trần Duy Quý, Nguyễn Mai Chi, Nguyễn Thuý An, Nguyễn Hằng Phương, Mai Thu Hà, Lương Thị Hải, Đàm Quốc Trụ, Nguyễn Văn Đồng	
• Ứng dụng các kỹ thuật phân tử trong phát hiện và xác định bệnh hại thực vật ở Việt Nam (tại sao và như thế nào).....	301
• Molecular technique for the detection and identification of plant pathogens in Vietnam (Why and What)	312

1.P.1.	Phạm Thị Ngọc Lan, Trần Thị Thuý, và Lê Thanh Bình	
	• Đặc tính hoá phân loại chủng vi khuẩn lactic sinh bacterioxin có phổ tác dụng rộng	314
	• Taxonomic characterization of the lactic acid bacteria strain producing a broad spectrum bacteriocin	318
1.P.2.	Lê Gia Hy, Phạm Kim Dung, Bùi Thị Việt Hà, Nguyễn Xuân Quý, Phạm Văn Ty, Phan Anh Toàn	
	• Chất kháng sinh chống nấm của chủng xạ khuẩn TC 5-4 phân lập ở Việt Nam	319
	• The antifungal antibiotics of <i>Streptomyces</i> strain TC 5-4 isolated in Vietnam	324
1.P.3.	Nguyễn Thanh Phương, Lại Thanh Tùng, Đặng Thị Cẩm Hà	
	• Một số đặc điểm sinh học và khả năng phân huỷ phenanthren của 2 chủng vi khuẩn sử dụng cacbuahydro thơm đa nhân phân lập từ cặn thải xăng dầu	325
	• Some Biological characteristics and Phenanthrene degrading capacity of two Bacterial strains isolated from petroleum sludges	332
✓ 1.P.4.	Đặng Minh Hằng	
	• Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp xenulaza của một số chủng vi sinh vật để xử lý rác	333
	• Study on some cellulolytic fungies for municipal waste decomposting	339
✓ 1.P.5.	Nguyễn Mạnh Dũng	
	• Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm vi sinh vật phân huỷ chất thải sinh hoạt	340
	• Study on production and utilization microbiological preparations of decomposing wastes	344
1.P.6.	Lương Đức Phẩm, Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Phương Huệ, Nguyễn Nhật Quang, Nguyễn Văn Hiếu	
	• Nghiên cứu thu nhận chế phẩm glucoamylaza (gla) từ nấm mốc và nấm men bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt	345
	• The production of crude glucoamylase (gla) preparation by strains fungi and yeast	351
1.P.7.	Ngô Thị Tường Châu	
	• Nghiên cứu ứng dụng chủng nấm mốc <i>Aspergillus oryzae</i> có hoạt tính protease cao phân lập ở Huế trong chế biến nước chấm lên men	352
	• The utilization study of <i>Aspergillus oryzae</i> strain with high protease activity isolated from soybean sauce at Hue in fermented sauce production	358
1.P.8.	Nguyễn Văn Đạt, Đỗ Thị Hồng Việt và Hoàng Việt	
	• Phân lập và nghiên cứu các vi khuẩn nhóm <i>Bacillus</i> ưa kiềm sản xuất α - amylaza kiềm	359
	• Isolation and study of alkaphilic <i>Bacillus</i> sp. producing alkaphilic α -amylase	365

1.P.9. **Tống Kim Thuận, Ngô Duy Tuấn, Hoàng Tiến Nam, Trương Nam Hải**

- Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng phân giải tinh bột sống 366
- Isolation and screening of microorganisms producing raw starch digestive amylase 373

1.P.10. **Phùng Thị Hà, Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Thị Hiền, Lương Đức Phẩm**

- Nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng lên men của một số chủng nấm men phân lập từ bánh men cổ truyền 374
- Studying some Boiological characteristics and the fermentation ability of some strains of yeats isolated from traditional yeast cakes in Vietnam 382

1.P.11. **Chu Kỳ Sơn, Nguyễn Thị Hiền, Lê Thanh Mai**

- Nghiên cứu các điều kiện tối ưu cho quá trình lên men rượu etilic từ rỉ đường mía Lam Sơn -Thanh Hoá 383
- Study of some optimal technical conditions for the alcohol fermentation from Lamson cane molasses..... 390

1.P.12. **Nguyễn La Anh, Vũ Quỳnh Hương, Nguyễn Thị Lộc, Đinh Mỹ Hằng, Nguyễn Thị Hương Giang, Đặng Thị Hoà Bình**

- Nghiên cứu ứng dụng *Saccharomyces cerevisiae* và vi khuẩn lactic trong sản xuất đồ uống có độ cồn thấp 391

1.P.13. **Vũ Nguyễn Thành, Đào Anh Hải**

- Một số kết quả bước đầu trong nghiên cứu nấm men sinh killer toxin 395
- Apreliminary study on killer yeasts 398

1.P.14. **Phan Thanh Phương, Nguyễn Nga, Trương Văn Dung, Nguyễn Thị Phương Duyên, Nguyễn Thiên Thu**

- Nghiên cứu chế tạo và sử dụng vacxin nhược độc đa giá phòng chống 4 bệnh đỏ của lợn 400
- Study on preparation and application polyvalent attenuated vaccine against 4 red diseases of swine 404

1.P.15. **Phạm Thị Ngọc Lan, Trương Văn Long**

- Bước đầu nghiên cứu vi khuẩn *Azotobacter* trong đất vùng gò đồi tỉnh Thừa Thiên - Huế 406
- Preliminary study on *Azotobacter* in soil of the hill in Thuathien - Hue province..... 411

1.P.16. **Hoàng Quốc Khánh, Nguyễn Phúc Hoàng, Ngô Đức Duy, Lê Kim Huế**

- Sản xuất axit indoleacetic bởi vi khuẩn cố định nitơ *Azospirillum brasiliense* và hiệu ứng gia tăng kích thích thực vật 412
- indole-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasiliense* and plant growth stimulation effect 415

1.P.17. **Nguyễn Ngọc Dũng, Hồ Thị Kim Anh, Phan Thị Hoài Anh**

- Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn cố định nitơ trong rễ lúa lên sinh trưởng của mầm lúa CR 203 416
- Effects of the rice root endophytic nitrogen-fixing isolates on the growth of CR203 rice seedlings..... 420

1.P.18. **Nguyễn Kim Vũ, Nguyễn Ngọc Quyên, Nguyễn Thu Hà, Phạm Văn Toàn, Trần Tú Thuý**

- Một số phương pháp lưu giữ chủng vi sinh vật cố định nitơ 421
- Some methods for the presevation of nitrogen- fixing bacteria 427

- 1.P.19. *Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Thi, Hà Kim Anh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai*
- Phối hợp các chủng vi khuẩn cố định nitơ và vi khuẩn hoà tan photphat để nâng cao hiệu quả chế phẩm vi sinh vật 428
 - Combine nitrogen-fixing bacteria with phosphate solubilizing bacteria to increase microfertilizer's effect 433
- 1.P.20. *Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Phương Chi*
- Ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên khả năng phân giải photphat khó tan của 2 chủng nấm sợi MN1 và ĐT1 434
 - The influence of nitrogen resources on the phosphate dissolving ability of two fungi Strains MN1 and ĐT1 440
- 1.P.21. *Lê Thị Đình, Phạm Thị Thu Hương, Nguyễn Văn Toàn, Nguyễn Giảng, Lê Xuân Thám*
- Nghiên cứu tác dụng và khả năng tích tụ sinh học của Cr và V trên pha nấm men các loài tảo nhũ *Tremella* sp. bằng kỹ thuật hạt nhân 441
 - Study of effects and bioaccumulation of Cr and V in the yeast phase of jelly fungi *Tremella* spp. by using nuclear techniques 449
- 1.P.22. *Lê Hữu Hiếu, Nguyễn Hương Trà, Nguyễn Ngọc Huyền, Nguyễn Thùy Châu*
- Tác dụng ức chế nấm mốc và aflatoxin của iturin A và *Bacillus subtili* 450
 - The inhibition effect of fungi and aflatoxin of iturin A and *Bacillus subtilis* 457
- 1.P.23. *Nguyễn Quỳnh Châu, Ngô Đình Quang Bình, Nguyễn Văn Thương*
- Hiệu lực diệt sâu của một số chế phẩm *Bacillus subtilis* sản xuất ở Việt Nam 458
 - Insecticide effect of *Bacillus subtilis* preparation produced in Vietnam 463
- 1.P.24. *Tạ Kim Chính, Hà Thị Quyên, Hoa Thị Minh Tú*
- Quy trình sử dụng chế phẩm vi nấm MA phòng trừ mối (*Termitidae*) hại cây trồng 464
 - The process using preparation MA to prevent and to against termite and soil living and roof eating insect 468
- ✓ 1.P.25. *Đào Thị Thu Hằng, Hoàng Hoa Long, Vũ Thị Bích Hửu, Lê Như Kiều, Nguyễn Ngọc Cường và Trần Duy Quý*
- Đặc điểm sử dụng một số nguồn cacbon của vi khuẩn gây bệnh héo xanh cây trồng (*Bacterial wilt*) lưu hành ở Miền Bắc Việt Nam 469
 - Pattern of utilisation of carbon sources by *R. solanacearum* Field strains causing the bacterial wilt of tomato in the north of Vietnam 474
- 1.P.26. *Giang Thế Bình, Đặng Hồng ánh, Giang Thế Việt, Đặng Kim Tuyền, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Thu Hà, Nguyễn Thị Hiền, Lê Thanh Mai*
- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố tới sự phát triển và hoạt độ phân giải axit malic của *Leuconostoc oenos* LF01 dùng trong lên men phụ rượu vang 475
 - Study on the effect of some factors on the growth and malolactic activities of *Leuconostoc oenos* LF01 by wine production 487

Phần II. CÔNG NGHỆ ENZYM VÀ HOÁ SINH

- 2.O.1. Nguyễn Thị Vinh, Nguyễn Tài Lương, Đoàn Việt Bình, Nguyễn Thị Kim Dung**
- Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm sinh học Rabiton lên một số chỉ tiêu sinh hoá máu chuột liên quan tới bài tập vận động 491
 - Effects of biological preparat from sea snake meat (Rabiton) on some biochemical blood parameters of rats in correlation with running exercise..... 496
- 2.O.2. Nguyễn Tài Lương, Nguyễn Thị Vinh, Đoàn Việt Bình, Nguyễn Huy Nam, Nguyễn Kim Dung, Trịnh Kim Thoa, Đỗ Văn Thu, Nguyễn Anh, Nguyễn Kim Độ, Nguyễn Diệu Thuý, Đậu Hùng Anh**
- Kết quả nghiên cứu về steroid hormone trong thịt hải sâm (*Holothurides*) và một số chỉ tiêu liên quan đến mô hình sử dụng chế phẩm viên nang hải sâm 497
 - Study on the steroid hormone in sea cucumbers meat extract and effect of preparat haisam on the some relative parameters 504
- 2.O.3. Nguyễn Anh Dũng, Nguyễn Đình Huyền, Trần Tích Cảnh, Nguyễn Quốc Hiến**
- Nghiên cứu cố định trypsin trên màng chitin ghép axit acrylic được chế tạo bằng kỹ thuật bức xạ 505
 - immobilization of trypsin onto chitin -G-acrylic acid film made by radiation method 510
- 2.O.4. Cao Đăng Nguyên, Nguyễn Quốc Khang**
- Đặc trưng của lectin từ con trìa mỡ (*Meretrix meretrix* L.) ở vùng biển Thừa Thiên - Huế 511
 - Specific characteristics of lectin from Haemolymph clam (*Meretrix meretrix* L.) In the sea of Thua Thien - Hue 517
- 2.O.5. Trần Quế, Hoàng Hưng Tiến, Lê Xuân Thám, Trịnh Đình Đạt, Phạm Văn Lập, Phạm Bá Phong**
- Phát hiện khả năng gây bệnh loạn nhiễm sắc thể ở từ bào lympho người xử lý thuốc trừ sâu BAI 58..... 518
 - Detecting chromosome aberrations induced in human Lymphocytes treated *in vitro* by pesticide BAI 58..... 525
- 2.O.6. Lê Quang Huấn, Đỗ Thị Tố Uyên, Trần Văn Nhị**
- Phương pháp thu nhận carotenoid và ubiquinone từ một vi khuẩn quang hợp thuộc chi *Rhodobacter* phân lập ở Việt Nam 526
 - Extraction and characterization of Carotenoid and ubiquinone from a photosynthetic bacterium genus *Rhodobacter* isolated in Vietnam 530
- 2.O.7. Nguyễn Lan Hương, Lê Văn Nhung, Hoàng Đình Hoà**
- Phân lập và hoạt hoá vi sinh vật ưa nhiệt có hoạt tính xenlulaza cao để bổ sung lại vào khối ủ, rút ngắn chu kỳ xử lý rác thải sinh hoạt..... 531
 - Separate and activate thermophile with high cellulose activity to add into the garbageheap, shorten the cycle of waste treatment 536

2.O.8.	Bạch Mai Hoa, Lê Gia Hy, Phạm Kim Dung, Trương Nam Hải	
•	Nghiên cứu sản xuất proteaza kiềm từ vi sinh vật ưa kiềm phân lập ở Việt Nam	537
•	Studies on production of alkaline protease by alkalophylic strain VT3-1 isolated in Vietnam	545
2.O.9.	Lý Kim Bảng, Lê Gia Hy, Tăng Thị Chính, Phan Tuyết Minh, Lê Thanh Xuân, Trần Quang Huy, Đào Ngọc Quang, Phạm Thị Cúc	
•	Sử dụng vi sinh vật có hoạt tính phân giải xenluloza cao để nâng cao chất lượng phân hủy rác thải sinh hoạt và nông nghiệp.....	546
•	The application of cellulase producing microbial strains isolated in Vietnam for production of organic fertilizer by domestic waste composting.....	551
2.O.10.	Đặng Đình Kim, Trần Văn Tựa, Đặng Hoàng Phước Hiến, Lê Thu Thủy và Hoàng Thị Bảo	
•	Sử dụng các chất hấp phụ sinh học để xử lý ô nhiễm Cr, Ni và Pb trong nước thải công nghiệp	552
•	Utilization of biosorbents for heavy metal removal from the industrial wastewater	557
2.O.11.	Phạm Thị Thuý, Đông Thị Thanh, Nguyễn Thị Bắc, Trần Thị Tuyết, Phạm Văn Nha	
•	Nghiên cứu công nghệ sản xuất và ứng dụng chế phẩm nấm <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) để phòng trừ sâu róm thông (<i>Dendrolimus punctatus walk</i>) hại rừng.....	558
•	Results on technological production of mycoinsecticide <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) and it's application for control <i>Dendrolimus punctatus</i> Walk	564
2.O.12.	Võ Thị Mai Hương, Trương Văn Lung	
•	Nghiên cứu công nghệ tách chiết alginate từ rong mơ Thừa Thiên - Huế.....	566
•	Study on technologycal extract alginate from <i>Sargassum</i> of Thua Thien - Hue.....	571
2.O.13.	Nguyễn Thị Xuân Sâm, Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Phùng Thị Thuý	
•	Tự cố định β -glucozidaza dưới dạng hạt từ nấm mục trắng <i>Phanerochaete Chrysosporium</i>	572
•	The self immobilization of β -glucosidase in mycelial pellets from the white-rot fungi <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	579
2.O.14.	Nguyễn Đức Lượng, Đặng Vũ Bích Hạnh	
•	Một số tính chất enzym cellulase của xạ khuẩn <i>Actinomyces griseus</i>	580
•	Some cellulase property of <i>Actionmyces griseus</i>	584
2.O.15.	Đình Duy Kháng, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Chikafusa Fukazawa	
•	Tinh chế và xác định tính chất của chitinaza từ đậu tương.....	585
•	purification and characterization of chitinases from mature dry seeds of soybean (<i>Glycine max</i> [L] Merr.....	591
2.O.16.	Trần Đình Mẫn, Schweder	
•	Khả năng sinh tổng hợp và đặc điểm α -amilaza chịu nhiệt của chủng vi khuẩn 3BT2.....	592
•	Production and characterizion of thermostable α -amilase of bacterial stran 3BT2.....	598

- 2.O.17. Trương Thị Hoà, Nguyễn Thu Hà, Trương Hương Lan, Nguyễn Văn Việt**
- Nghiên cứu sử dụng ngũ cốc cho sản xuất nước uống giàu dinh dưỡng 599
- 2.O.18. Lê Việt Nga, Ngô Tiến Hiên, Trần thị Châu, Nguyễn Thị Hiên, Nguyễn Thuý Hương**
- Nghiên cứu thâm dò khả năng sản xuất cider từ nguồn nguyên liệu quả Việt Nam 607
 - Study on cider production from dome konds of vietnamese fruits 614
- 2.O.19. Đỗ Thị Giang, Nguyễn Thị Hoài Trám, Phạm Thu Trang**
- Nghiên cứu sử dụng enzym trong sản xuất nước quả 615
 - Some enzymes were studied in the fruit proccessing 620
- 2.O.20. Cao Văn Thu và Nguyễn Văn Trục**
- Nghiên cứu lên men sinh tổng hợp axit xitric 621
 - Study on the biosynthetical fermentation of citric acid 626
- 2.O.21. Hoàng Kim Anh, Ngô Kế Sương**
- Nghiên cứu công nghệ sản xuất Maltodextrin từ bột sắn và bột gạo 627
- 2.O.22. Lê Văn Liên, Phạm Thị Thoa và Nguyễn Thị Phụng**
- Chế biến phụ phẩm thủy sản bằng phương pháp lên men vi sinh vật làm thức ăn chăn nuôi 635
 - Processing of aquatic by-products by method of fermentation for animal feed 641
- 2.O.23. Lưu Hữu Mạnh, Nguyễn Văn Bá, Nguyễn Thị Thu Vân, Nguyễn Nhật Xuân Dung**
- Sử dụng vỏ đầu tôm ủ chua làm thức ăn bổ sung đậm nuôi vịt đẻ 642
 - Utilization of shrimp head silage as a supplement for egg laying ducks 647
- 2.O.24. Nguyễn Anh - Trịnh Thị Kim Thoa**
- Nghiên cứu hoạt tính enzym huyết thanh ở một số giống dê lai F1 và so sánh với các giống dê nội, ngoại nuôi ở Việt Nam 649
 - Investigation of the activity of some serum enzymes in crossbreed goats and comparativng with activity of serum enzymes in native and the irapoted goats 654
- 2.O.25. Nguyễn Thị Diệu Thúy, Nguyễn Văn Cường, Lê Thị Linh Lan**
- Phát triển kỹ thuật chẩn đoán bệnh virus tằm (Nuclear polyhedrosis virus) bằng ELISA và que thử 655
 - Development of ELISA and dipstick assays for the detection of nuclear polyhedrosis virus (NPV) in *Bombyx mori* 661
- 2.O.26. Đặng Thị Thu, Trần Văn Hà, Đỗ Ngọc Liên**
- Nghiên cứu thâm dò protein kìm hãm (amilaza ((AI P) từ một số hạt đậu *Phaseolus vulgaris* Việt Nam 662
 - Studies on α amylase inhibitor protein (α AIP) from some *Phaseolus vulgaris* bean seeds in Vietnam 668
- 2.O.27. Nguyễn Văn Bá, Lưu Hữu Mạnh, Triệu Công Tâm, Lâm Anh Huy, Phạm Trường Yên, Trần Phước Đường**
- Sản xuất và sử dụng chế phẩm enzym nấm sợi trong chăn nuôi 669
 - Enzyme enrichment of cassava for animal and shrimp feed 675

- 2.O.28. Lê Doãn Diên, Trần Tuấn Quỳnh, Phùng Hữu Dương, Lê Bích Liên, Đỗ Xuân Hương, Nguyễn Minh Yến, Hoàng Thanh Hoa, Nguyễn Hương Thủy, Trần Văn Chương**
- Một số biến đổi hoá sinh, động thái enzyme thủy phân proteinase, amylase và sự hao thất chất khô trong quá trình nảy mầm của hạt đại mạch trồng trong nước..... 677
 - Study on some biochemical changes and on the dynamism of hydrolytic enzymes (proteinase, amylase) during the germination of the barley seeds grown in Vietnam 683
- 2.P.1. Nguyễn Hoàng Uyên, Nguyễn Tài Lương, Nguyễn thị Vinh, Ngô thị Kim, Đoàn Việt Bình, Nguyễn Kim Dung, Thẩm Thu Nga, Nguyễn Huy Nam, Lê Bích Thảo**
- Ứng dụng công nghệ enzyme tạo viên nang Rabiton từ rắn..... 684
 - Using enzymmatic technique in processing preparat Rabiton from snake meat 691
- 2.P.2. Nguyễn Văn Thiết, Nguyễn Tài Lương, Nguyễn Huy Nam**
- Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm Hải Sâm lên một số chỉ tiêu enzyme trên chuột nhắt trắng..... 692
 - Studies on influence of the preparation Hải Sâm on some enzymes' activities in rats 698
- 2.P.3. Đồng Thị Anh Đào, Nguyễn Đức Lương, Lê Văn Nhung, Yumi Yoshikawa, Kanji Matsumoto**
- So sánh hiệu quả thu nhận enzyme superoxide dismutase từ sự phá vỡ tế bào *Saccharomyces cerevisiae* bằng phương pháp cơ học và hoá học..... 699
 - Efficiency comparison of sod release from bakers' yeast cells by the mechanical chemical disruption methods..... 706
- 2.P.4. Nguyễn Liêu Ba, Nguyễn Thị Dự và cộng sự**
- Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần môi trường tới sinh tổng hợp proteaza kiềm của chủng *Bacillus brevis* phân lập tại Hà Nội..... 707
 - Study on impact of medium on bio-synthesis alkaline protease of strain *Bacillus brevis* 715
- 2.P.5. Nguyễn Xuân Thu, Nguyễn Quang Vinh**
- Tách chiết, làm sạch lectin từ hai loại tảo *Gracilaria blodgettii*, *G. chorda* và nghiên cứu một số tính chất của chúng 716
- 2.P.6. Đỗ Quý Hai, Fekete Eva, Matkovics Béla**
- Xác định các tế bào thần kinh sản xuất oxide nitric (NO) ở trong não cá chép (*Ciprinus carpio* L.) và ảnh hưởng của các chất ức chế đặc hiệu enzyme nitric oxide synthase (NOS) lên hoạt độ NADPH diaphorase của chúng 722
- 2.P.7. Nguyễn Văn Chung**
- Ứng dụng chế phẩm α -amylaza trong chưng cất tinh dầu và tách piperine tinh thể từ hạt tiêu (*Pipernigrum-l*)..... 731
- 2.P.8. Tô Kim Anh, Lê Văn Nhung, Đặng Thị Thu**
- Tinh chế và xác định tính chất của collagenaza từ *Bacillus subtilis* FS-2..... 735
 - Purification and properties of collagenase from *Bacillus subtilis* FS-2 742

2.P.9. Phạm Anh Cường, Panfilov V. I.	
• Nghiên cứu qui trình công nghệ sản xuất thức ăn gia súc giàu protein đơn bào từ bã mía.....	743
• Studies on the production of plant carbohydrate protein-containing feed from sugar-cane bagasse.....	750
2.P.10. Hoàng Thị Việt, Nguyễn Văn Cẩm, Trần Quang Tấn, Nguyễn Đầu Toàn, Nguyễn Văn Hoa, Lương Thanh Cù, Phạm Thị Hạnh, Trần Đình Phả	
• Kết quả nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm NPV (<i>Nuclear Polyhedrosis Viruses</i>) trừ sâu hại cây trồng.....	751
• Results of research on production and use of NPV, (<i>Nuclear polyhedrosis viruses</i>) for insect pest control.....	757
2.P.11. Nguyễn Việt Dũng, Nguyễn Thị Phương Trang, Trần Linh Thuộc	
• Ứng dụng phương pháp kiểm tra nhanh vi sinh vật bằng ATP để giám sát vệ sinh trên dây chuyền chế biến thực phẩm.....	759
• Application of rapid method of microbial quantification by ATP for the monitoring of hygiene status in food processing process.....	765
2.P.12. Chu Kỳ Sơn, Nguyễn Thị Hiền, Lê Thanh Mai	
• Nghiên cứu các điều kiện tối ưu cho quá trình lên men rượu etilic từ rỉ đường mía Lam Sơn - Thanh Hóa	766
• Study of some optimal technical conditions for the alcohol fermentation from Lamson cane molasses.....	773
2.P.13. Nguyễn Tiến Cư, Till Bachmann	
• Xác định nhanh chỉ số BOD bằng đầu đo cảm biến sinh học (biosensor).....	775
• Rapid determination of BOD by using biosensor	781
2.P.14. Võ Minh Trí, Trần Linh Thuộc	
• Tách chiết luciferase từ đom đóm và ứng dụng trong định lượng vi sinh vật.....	782
• Extraction Of Luciferase From Fire Fly And Application in quantification of microorganisms.....	789
2.P.15. Tăng Thị Chính, Lý Kim Bằng, Lê Gia Hy	
• Nghiên cứu sản xuất enzym xenlulaza của một số chủng vi sinh vật ưa nhiệt phân lập từ bể ủ rác thải.....	790
• Studies on production of cellulases of thermophylic bacterial strains isolated from waste composting ponds in Vietnam.....	796
2.P.16. Ngô Thị Kim, Trương Thị Thu, Phạm Như Bích	
• Thành phần và hàm lượng axit amin ở một số động vật hoang dã.....	798
• Composition and content amino acid of some animal wild.....	803
2.P.17. Nguyễn Đức Lượng, Đặng Vũ Bích Hạnh	
• Khả năng sinh tổng hợp cellulase của <i>Actinomyces griseus</i>	804
• Cellulase synthesis by <i>Actinomyces griseus</i>	809
2.P.18. Phan Phước Hiền, Nguyễn Công Hào, Mai Đình Trị, Nguyễn Cửu Thị Hương Giang	
• Mối quan hệ giữa quá trình hình thành và tích tụ hoạt chất rotenone trong cây <i>Derris elliptica</i> Benth	810
• Relationships between the formation and accumulation of rotenone in derris plant.....	816

284
2002

Phần III. CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT

3.O.1. Nguyễn Thị Tám, Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình	
• Ứng dụng công nghệ tế bào thực vật vào việc chọn dòng chịu nóng ở lúa	819
• Selection For High Temperature Tolerance Of Rice By Using Plant Cell Tissue Culture	826
3.O.2. Phan Thị Bảy, Lê Thị Muội, Ngô Vĩnh Viễn, Nguyễn Đức Thành	
• Sự biến động ở một số đặc điểm nông sinh học và khả năng kháng bệnh đạo ôn của các giống lúa chọn lọc từ mô kháng dịch nấm đạo ôn	827
• The variation in agro-biological traits and the level of blast resistance rice lines derived from calli resisted to culture filtrate of blast fungi	836
3.O.3. NghiêM Như Vân, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội	
• Các cây lúa có mức bội thể khác nhau nhận được trong nuôi cấy bao phấn và một số đặc điểm hình thái của chúng	837
• Several morphological characteristics of various ploidy plants obtained from anther culture of rice	845
3.O.4. Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Nhân, Mai Thị Tân, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Khắc Thái Sơn, Đặng Thị Vân	
• Hoàn thiện công nghệ sau nuôi cấy <i>in vitro</i> cho cây dứa, chuối và khoai tây	846
• Research on improving the technique for pineapple, banana and potato originated from <i>in vitro</i> at the nursery stage	858
3.O.5. Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Quang Thạch, Từ Thị Hoài Thu	
• Nghiên cứu các phương pháp nhân nhanh một số giống hoa cúc chùm Hà Lan	859
• Repid mutiplication of Holand spay chrysanthemum by tissue culture	865
3.O.6. Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Phương Thảo	
• Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống cây hoa loa kèn bằng kỹ thuật tạo củ trong ống nghiệm	866
• Study to build the process of proparation of lyly by in Vitrotuberisation	873
3.O.7. Phạm Ngọc Lương, Trần Duy Quý, Nguyễn Văn Đồng, Vũ Đức Quang.	
• Áp dụng phương pháp nuôi cấy bao phấn phục vụ cho công tác chọn giống lúa	874
• Using Anther Culture Method For Rice Breeding	881
3.O.8. Hoàng Tuyết Minh, Vũ Thị Thuỷ, NghiêM Thị Nhân, Nguyễn Thu Hoài, Phạm Thu Thuỷ, Nguyễn Tiến Thành	
• Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô trong tạo giống lúa lai hai dòng	882
• Utilization of tissue culture techniques on rice two-line hybrid breeding	887
3.O.9. Lê Thị Thu Vẻ, Đỗ Năng Vịnh, Lê Huy Hàm	
• Nhân nhanh các giống hoa loa kèn mới	889
• Micropropagation of Lilium	895

3.O.10. Đinh Hải Lâm, Nguyễn Thuý Hà, Trần Thị Hạnh, Đỗ Năng Vịnh, Lê Huy Hàm

- Nghiên cứu hoàn thiện quy trình vi ghép *in vitro* ở một số giống cam quýt địa phương 896
- Improvement of shoot-tip grafting techniques for releasing disease-free materials from indigenous citrus varieties..... 901

3.O.11. Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh, Trần Duy Quý

- Một số nghiên cứu tạo dòng đồng hợp tử bằng nuôi cấy bao phấn ngô..... 902
- Recent progress of maize *in vitro* androgenesis in Vietnam 907

3.O.12. Bùi Thị Tường Thu, Trần Văn Minh, Nguyễn Văn Uyển

- Ứng dụng công nghệ tế bào thực vật trong công tác giống cây thân gỗ:
(1) Cây ăn trái - Cây măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) 908
- Application of plant cell biotechnology in woody species improvement
(2) Fruit trees - Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.)..... 916

3.O.13. Huỳnh Văn Kéo, Trương Văn Lung

- Kết quả bước đầu nghiên cứu giảm hom cây Hoàng đàn giả (*Dacrydium clatum* Wallich ex Hocker) 917
- Preliminary results of a study on propagation by cutting of *Dacrydium elatum* 922

3.O.14. Hoàng Nghĩa Sơn, Ngô Kế Sương, Nguyễn Nghi

- Ảnh hưởng của sinh khối *Spirulina* bổ sung vào thức ăn nuôi gà thịt và gà đẻ trứng giống 923
- Effect of using *Spirulina* biomass in chicken and hen diet..... 932

3.O.15. Nguyễn Thị Ước, Nguyễn Hữu Đức, Lê Văn Ty, Bùi Linh Chi, Hoàng Nghĩa Sơn, Bùi Xuân Nguyên

- Sản xuất phôi bò bằng thụ tinh trong ống nghiệm 934
- *In-vitro* fertilization of oocytes of local cattle in Vietnam 936

3.O.16. Lê Xuân Thám, Trần Hữu Độ, Hoàng Nghĩa Dũng

- Nghiên cứu công nghệ hoá tài nguyên nấm bào ngư. Loài mới *Pleurotus blaoensis* Thám sp. Nov. & *Antromycopsis blaoensis* Thám, Anam. Nov. tìm được ở Bảo Lộc, Lâm Đồng 937
- Study of resources of abalone-oyster mushrooms *Pleurotus blaoensis* Tham, sp. Nov. & *Antromycopsis blaoensis* Tham, anam. nov. found in Baoloc, Lam Dong 945

3.O.17. Vu Khoa Bang, Muyldermans Serge and Wyns Lode.

- Plantibody: Expression of Single-domain Heavy-chain Antibody in Plant..... 946

3.O.18. Nguyễn Thị Chính, Kiều Thu Vân, Dương Đình Bi, Nguyễn Thị Đức Hiền.

- Nghiên cứu một số hoạt chất sinh học và tác dụng chữa bệnh của nấm linh chi (*Ganoderma incidum*)..... 956

3.O.19. Cao Đăng Nguyên, Nguyễn Quốc Khang

- Phân bố và động thái của lectin một số loài động vật vùng biển Thừa Thiên-Huế..... 964
- Distribution and dynamic on lectins of zoology in the sea of Thua Thien-Hue..... 973

3.O.20. Tô Long Thành

- Vai trò của TNF-a và IL-6 ở chuột C57 BL/6 thường hoặc khuyết thiếu TNF-a 974
- Role of TNF-a and IL-6 in knockout and wildtype mice infected with *Mycobacterium. avium* subsp paratuberculosis..... 982

3.O.21. Nguyễn Quốc Thông, Đặng Đình Kim, Lê Lan Anh

- Khả năng tích lũy kim loại nặng Cr, Ni và Zn của bèo sen (*Eichhornia crassipes*) trong xử lý nước thải công nghiệp 983
- The heavy meTal accumulation of water hyacinth (*E. crassipes*) during the industrial wastewater treatment..... 988

3.O.22. Đỗ Thị Thảo, Đỗ Khắc Hiếu

- Một số kết quả nghiên cứu thuốc chữa ung thư bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào người..... 990
- Some results in determining anticancer drugs by using human cell culture technique 999

3.O.23. Lê Văn Ty, Bùi Linh Chi, , Nguyễn Thị Ước, Hoàng Nghĩa Sơn, Nguyễn Hữu Đức, Dương Đình Long, Bùi Xuân Nguyên

- Áp dụng kỹ thuật vi thao tác vào công nghệ phôi..... 1000
- Application of micromanipulation in embryotechnology..... 1004

3.O.24. Trịnh Thị Kim Thoa, Đỗ Văn Thu, Nguyễn Anh

- Nghiên cứu quy trình công nghệ bảo quản tinh dịch dê và kết quả bước đầu về thụ tinh nhân tạo bằng tinh đông lạnh..... 1005
- Investigation production technology of conservation of goat's semen and the fist results in artificial insemination..... 1011

3.O.25. Bùi Xuân Nguyên, Lê Văn Ty, Đỗ Tước, Hoàng Ngọc Khanh, Ngô Viết Nhơn, Nguyễn Hữu Đức, Bùi Linh Chi, Nguyễn Khắc Tích, Dương Đình Long, Hoàng Nghĩa Sơn, Nguyễn Thị Ước

- Nghiên cứu xây dựng ngân hàng tế bào và phôi động vật đông lạnh..... 1012
- Protection of animal biodiversity using cryobanking of cell and embryos 1016

3.P.1. Võ Thị Phương Khanh, Phạm Thành Hồ

- Nuôi trồng nấm hương trên mùn cưa cao su bổ sung dinh dưỡng..... 1017
- Cultivation of shiitake mushroom on supplemented sawdust 1022

3.P.2. Trần Quế, Hoàng Hùng Tiến, Hoàng Văn Nguyên, Trịnh Đình Đạt, Phạm Văn Lập, Phạm Bá Phong

- Nghiên cứu dịch tể học sai hình nhiễm sắc thể tế bào limpho máu ngoại vi người như một chỉ thị cảnh báo an toàn phóng xạ độc chất môi trường..... 1023
- Studies on epidemiology of chromosome aberrations induced in human lymphocytes for indicating contamination of radiation and radiomimetic agents..... 1029

3.P.3. Trần Văn Tụ, Đặng Diễm Hồng, Lê Thu Thủy, Hoàng Thị Bảo, Đặng Đình Kim

- Nuôi trồng *Dunaliella* cho tách chiết carotenoid 1030
- Cultivation of *Dunaliella salina* for carotenoid extraction 1035

- 3.P.4. **Nguyễn Thị Thanh Bình, Phùng Thị Bích thủy, Vũ Đức Ban, Hà Văn Phúc**
- Thực trạng chất lượng lá dâu Việt Nam và nhu cầu dinh dưỡng của giống tằm cao sản nhập nội 1036
 - Study on quality of Vietnam's mulberry leaves and nutritional requirement of high productivity silkworm..... 1042
- 3.P.5. **Ngô Anh**
- Nghiên cứu họ nấm linh chi (*Ganodermataceae* Donk) ở Thừa Thiên - Huế..... 1043
 - Study on the family *Ganodermataceae* Donk in Thua Thien - Hue Province..... 1049
- 3.P.6. **Võ Thị Bạch Mai, Nguyễn Trần Đông Phương**
- Khả năng tạo tiền củ của giống lan Hồ điệp *Dips Potus Beauty-King Shiang Beauty x Kour s Valentine* 1050
 - Ability to formation of protocorms of *Dips potuz beauty-king shiang beauty x kour's valentine phalaenopsis* in tissue cuture..... 1055
- 3.P.7. **Chu Bá Phúc, Lê Huy Hàm, Nguyễn Khánh Vân, Đỗ Năng Vịnh**
- Áp dụng phương pháp nuôi cấy mô để nhân nhanh các loại hồng môn (*Anthurium andreanum*) 1056
- 3.P.8. **Nguyễn Thuý Hà, Đinh Hải Lâm, Trần Thị Hạnh, Đỗ Năng Vịnh, Lê Huy Hàm**
- Nghiên cứu quy trình bảo quản nguồn gen cây ăn quả có múi *in vitro*.... 1062
 - Studies on Citrus germplasm conservation in *in vitro* condition..... 1067
- 3.P.9. **Đoàn Duy Thanh, Lê Thị Thu Vê, Bùi Huy Thuý, Hoàng Thị Tuyết Minh, Đỗ Năng Vịnh**
- Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn trong chọn tạo giống lúa lai hai dòng..... 1068
 - Application of anther culture technique on rice two-line hybrid breeding..... 1071
- 3.P.10. **Phạm Thị Lý Thu, Lê Huy Hàm, Đỗ Năng Vịnh**
- Một số kết quả bước đầu về nghiên cứu bảo quản nguồn gen chuối *in vitro* ở Việt Nam..... 1073
 - Primary results on banana germplasm conservation in Vietnam..... 1079
- 3.P.11. **Hà Thị Thuý, Đỗ Năng Vịnh, Lê Huy Hàm**
- Nhân nhanh các giống mía cao sản bằng công nghệ vi nhân giống *in vitro* 1080
 - Study on rapid multiplication of sugarcane through tissue culture 1085
- 3.P.12. **Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Lê Văn Ty, Bùi Linh Chi, Nguyễn Thị Xiêm, Đào Lan Hương, Bùi Xuân Nguyên**
- Hoạt hoá và bảo quản lạnh tinh trùng phục vụ thụ tinh ống nghiệm và điều trị vô sinh 1086
 - Capacitation and cryopreservation of human sperm for *in vitro* fertilization and treatment of infertility 1090
- 3.P.13. **Đỗ Văn Thu, Trịnh Thị Kim Thoa**
- Ảnh hưởng của nồng độ lòng đỏ và glycerol trong môi trường lên sức sống tinh trùng dê sau giải đông và ủ ở 37°C 1091
 - Effects of egg yolk concentration and glycerol in diluent on the survival of goat spermatozoa after thawing and incubation at 37°C 1097

3.P.14. Khuất Hữu Thanh, Mashurov A. M.

- Đa hình di truyền nhóm máu của bò Laisind Việt Nam và một số giống bò sữa châu Âu 1098
- Polimorphism of blood groups genes in the same dairy cattle breeds of vietnam and europe 1102

3.P.15. Bùi Văn Lê, Lê Kim Hoàn, Nguyễn Duyên Hải, Bùi Thị ánh Tuyết, Trần Duy Quý, Lê Thị ánh Hồng, Trần Thanh Vân

- Khả năng hình thành trực tiếp các cơ quan thể và tái sinh cây *Sain paulia ionantha* Wendl (African violet) khi sử dụng chất thidiazuron (TDZ) 1103
- Direct organogenesis and plant regeneration in *Saintpaulia ionantha* Wendl (African violet) using thidiazuron 1111

Phần IV. KỸ THUẬT DI TRUYỀN**4.O.1. Đặng Sỹ Hải, Hoàng Việt, Trương Nam Hải**

- Thiết kế vectơ đa phiên bản mang gen α -amylase lai chịu nhiệt để biểu hiện trong *Bacillus subtilis* 1115
- Construction of the multicopy plasmid for stable expression of the thermostable hybrid α -amylase in *Bacillus subtilis* 1120

4.O.2. Nguyễn Thuý Hà, Hoàng Quốc Trường, Tống Quỳnh Mai, Nguyễn Thị Tỵ, Nguyễn Hữu Hiến, Phan Quốc Kinh, Lê Trần Bình & Phan Văn Chi

- Tách dòng và biểu hiện gen mã hoá cho protein bất hoạt ribosome nhóm 1 ở *E. coli* 1121
- Gene cloning and expression of ribosome-inactivating proteins in *E.coli* 1128

4.O.3. Quynh Đình Thi, Nguyễn Diệu Thúy, Vũ Văn Diễn và Nguyễn Văn Cường

- Biểu hiện lipase từ chủng *Bacillus* trong nấm men *P. pastoris* 1129
- Expression of a *Bacillus* sp. lipase in *Pichia pastoris* 1135

4.O.4. Nguyễn Văn Cường, Nguyễn Thị Diệu Thúy, T. T. Bachmann, R. D. Schmid

- Thiết kế và biểu hiện đoạn Fab của kháng thể kháng 2, 4-dichlorophenoxyacetic a ở *E. coli* 1136
- Construction and expression of 2,4-D specific Fab fragment in *E. coli* 1143

4.O.5. Lê Đức Đào

- Chuyển tải và biểu hiện gen DNA polymerase của *Thermus aquaticus* (Taq-DNA polymerase gene) trong *E. coli* 1144

4.O.6. Đình Duy Kháng, Nguyễn Văn Vũ, Đái Thị Hằng Nga, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Xuân Hùng, Đỗ Đức Văn, Đái Duy Ban

- Ứng dụng kỹ thuật PCR lồng (Nested PCR) để phát hiện ADN của virus viêm gan B trong khối u của bệnh nhân ung thư gan 1151
- Application of nested PCR for detection of hepatitis B DNA in the liver tumor biopsies 1156

- 4.O.7. Nguyễn Thị Ngọc Dao, Kaoru Nishiyama, Taku Shirakawa, Matsuo Masafumi, Trần Thị Chính, Tạ Thị Tính, Nguyễn Văn Đô, Hoàng Hạnh Phúc, Trần Văn Khánh, Vũ Triệu An, Đoàn Hạnh Nhân**
- Phân tích các dạng đột biến gen gây thiếu hụt G6PD ở một số bệnh nhân thuộc tỉnh Hoà Bình và Hà Nội..... 1157
 - Analyzing variants of DNA mutation of some patients with G6PD-deficiency from Hoa Binh and Hanoi..... 1164
- 4.O.8. Lê Huyền Ái Thủy, Janine Doly, Hồ Huỳnh Thùy Dương**
- Phát hiện virus sốt xuất huyết Dengue và bước đầu khảo sát sự biểu hiện interferon ở các bệnh nhân nghi nhiễm bằng kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 1165
 - Detection of Dengue virus RNA and interferon α and β mRNA in blood samples by RT-PCR..... 1170
- 4.O.9. Nguyễn Thanh Thủy, Vũ Triệu An, Văn Đình Hoa, Nguyễn Thị Phương, Vũ Chí Dũng**
- Kết quả bước đầu xử dụng kỹ thuật PCR xác định gen TDF để chẩn đoán giới tính nam cho bệnh nhân chưa rõ giới tính..... 1172
 - A preliminary application of the PCR technic to determinate TDF gen for the diagnosis of the hermaphroditess male sex 1177
- 4.O.10. Trịnh Thị Kim Thoa, Hoàng Tuấn Anh**
- Áp dụng kỹ thuật PCR và RFLP để nghiên cứu gen kappa casein và β -actoglobulin ở bò đực giống hướng sữa tại Việt Nam..... 1179
 - Application of the PCR and RFLP technology for identification of the kappa-casein and β -Lactoglobulin genotype in dairy bulls in Vietnam .. 1184
- 4.O.11. Bùi Linh Chi, Lê Văn Ty, Nguyễn Thị Ước, Nguyễn Hữu Đức, Bùi Xuân Nguyên**
- Ứng dụng kỹ thuật PCR trong sản xuất phôi bò có giới tính chọn lọc..... 1185
 - PCR application for sexed bovine embryos production 1190
- 4.O.12. Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Đức Hoàng, Trần Linh Thuộc**
- Khảo sát phương pháp phát hiện *Salmonella* spp. trong thủy sản bằng PCR. 1191
 - Study on method for detection of *Salmonella* spp. in seafoods by polymerase chain reaction 1196
- 4.O.13. Nông Văn Hải, Lê Thị Thu Hiền, Kim Thị Phương Oanh, Huỳnh Thị Thu Huệ, Nguyễn Đăng Tôn, Đặng Văn Hạnh, Nguyễn Huy Hoàng, Trần Thị Phương Liên, Lê Trần Bình**
- Ứng dụng công nghệ DNA trong nghiên cứu tài nguyên động vật và thực vật Việt Nam..... 1197
 - Application of DNA technology to evaluation of animal and plant resources in Vietnam 1204
- 4.O.14. Nguyễn Đức Thành, Phan Thị Bấy, Lê Hồng Diệp**
- Phát triển và ứng dụng các chỉ thị phân tử trong nghiên cứu đa dạng phân tử ở lúa 1205
 - Development and application of molecular markers in the study of molecular diversity in rice 1215
- 4.O.15. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang**
- Ứng dụng DNA marker trong đánh giá quỹ gen cây lúa 1216

- 4.O.16. Vương Đình Tuấn, Y. Fukuta, M. Yano, và T. Ban**
- Lập bản đồ xác định genes ảnh hưởng đến tính kháng mặn của lúa (*Oryza sativa* L.) 1226
 - Mapping of quantitative trait loci for salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) 1235
- 4.O.17. Nguyễn Văn Đông, Vũ Đức Quang, Phạm Ngọc Lương, Trần Duy Quý và Henry T. Nguyen**
- Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong việc phát triển hệ thống lúa lai hai dòng thương phẩm 1236
 - Application of biotechnology in development of the commercial two-line hybrid rice system 1247
- 4.O.18. Lê Tuấn Nghĩa, Hei Leung, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý**
- Đa dạng di truyền và mối tương quan giữa kiểu gen RGA và kiểu hình phản ứng bệnh đạo ôn của một số giống lúa thu ở Việt Nam 1248
 - Genetic Diversity and the correlation between RGA Genotypes and Blast Phenotypes of Rice Varieties collected in Vietnam 1258
- 4.O.19. Lê Thị Lan Oanh, M. Mohan, S. Nair**
- Sử dụng kỹ thuật PCR- RAPD định vị gen kháng rầy nâu ở lúa *Indica* 1259
 - Use of RAPD and RFLP markers for tagging gene for BPH resistance in indica rice 1265
- 4.O.20. Nguyễn Hoàng Lộc, Akihiro Suzuki, Fumio Takaiwa**
- Tạo dòng phân tử và biểu hiện các gen liên quan *myb* ở hạt lúa 1266
 - Molecular cloning and expression of *myb*-related genes in rice seed 1273
- 4.O.21. Lê Việt Dũng, Yoshio Sano**
- Đa dạng di truyền của gen *Waxy* trên cây lúa (*Oryza sativa*) 1274
 - Genetic diversity in the *Waxy* gene regulation 1279
- 4.O.22. Phan Tổ Phương, Trương Nam Hải, Trần Duy Quý, Lili, S. Zhang, C. M. Fauquet, R. N. Beachy, Lưu Văn Quyết, Lê Thị Ánh Hồng**
- Sự biểu hiện của gen kháng bệnh bạc lá (Xa21) ở cây lúa chuyển gen Việt Nam (VL901) 1280
- 4.O.23. Nguyễn Thị Thanh, Lê Tấn Đức, Nguyễn Văn Uyển**
- Tạo cây cải bông (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) và cây cải xanh (*Brassica juncea*) mang gen kháng sâu cryIA(c) và gen bar kháng thuốc cỏ dại thông qua *Agrobacterium tumefaciens* 1287
 - Transgenic cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) and brassica juncea obtained by *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation 1295
- 4.O.24. Nguyễn Hữu Hổ, Lê Tấn Đức, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Văn Uyển**
- Tạo cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) kháng thuốc trừ cỏ Basta bằng chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* 1297
 - Production of transgenic tobacco (*Nicotiana cotiana tabacum* L.) plants resistant ant to herbicide basta via VIA *Agrobacterium tumefaciens* 1304

4.O.25. Trần Thị Hoà

- Sử dụng kỹ thuật PCR - RAPD trong nghiên cứu đa hình di truyền ở thực vật 1305
- Conservation of genetic diversity using PRC_based AND polymorphic loci (RAPD)..... 1312

4.O.26. Nguyễn Ngọc Minh, Nguyễn Đức Thành, Lê Thị Muội

- Phân lập và xác định trình tự axit nucleic một đoạn ADN lục lạp của *Solanum nigrum* trong cây *Nicotiana plumbaginifolia* biến nạp 1313
- Cloning and sequencing of a *Solanum nigrum* chloroplast DNA fragment from transformed *Nicotiana plumbaginifolia* 1320

4.O.27. Võ Thương Lan, Hoàng Thị Minh Hiền, Trần Hữu Quang, Huỳnh Quang Năng, Đặng Diễm Hồng

- Nghiên cứu tính đa dạng của một số loài rong câu (*Gracilaria*) ở vùng biển miền Nam Việt Nam bằng kỹ thuật RAPD- PCR..... 1321
- Analysis of genetic variability of *Gracilaria* (Red algae) by RAPD-PCR. 1328

4.O.28. Lê Thị Kim Tuyền

- Đánh giá việc sàng lọc các enzym giới hạn phân lập từ vi khuẩn tự nhiên tại Việt Nam..... 1329
- Evaluation on the screening of restriction enzymes isolated from natural bacteria in Vietnam 1334

4.O.29. Đái Duy Ban, Đinh Duy Kháng, Nguyễn Văn Vũ, Đái Thị Hằng Nga, Nguyễn Thị Nga, Đỗ Đức Văn, Nguyễn Xuân Hùng và cộng sự

- Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật gen chẩn đoán ung thư gan nguyên phát (*Hepatocellular carcinoma*) tại Bệnh viện Việt Đức 1335
- Genetic technique application in the diagnostic of the initial liver cancer at the Viet- Duc hospital..... 1340

4.O.30. Lê Xuân Đắc, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình

- Sử dụng kỹ thuật RAPD để đánh giá tính đa hình DNA của một số dòng chọn lọc từ mô sẹo của giống lúa C71 1341
- RAPD analysis of somaclonal lines regenerated from desiccated or chilled calli of rice cultivar C71 1347

4.P.1. Trần Thị Phương Liên, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải, Lê Thị Muội

- Phân lập gen dehydrin liên quan đến khả năng chịu hạn ở cây đậu tương.... 1348
- Cloning of A dehydrin GENE that is related to drought tolerance of soybean..... 1353

4.P.2. Phan Tường Lộc, Lê Tấn Đức, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Văn Uyển

- Chuyển gen vào cây cà chua (*Lycopersicon esculentum*) gián tiếp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* 1354

4.P.3. Trần Bích Lan, Nguyễn Kim Thoa, Vũ Đức Quang, Nguyễn Đức Doanh, Trần Duy Quý

- Kết quả bước đầu trong nghiên cứu chuyển gen GUS và gen kháng thuốc trừ cỏ vào giống lúa của Việt Nam..... 1365
- Preliminary results on transformation of *Gus* and *Bar* genes to Vietnamese rice Varieties 1370

- 4.P.4. Đặng Trọng Lương, R. Offringa, Vũ Đức Quang, Nguyễn Hữu Đồng, Trần Duy Quý, W. Dolf, và Paul J. J. Hooykaas**
- Thiết kế lại cấu trúc gen Bt (*Bacillus thuringiensis*) Ubiquitin promoter-CryIA(c) để chuyển vào cây hai lá mầm..... 1371
- 4.P.5. Vũ Đức Quang, Lã Tuấn Nghĩa, Hei Leung, Trần Duy Quý**
- Phân tích phân tử quần thể nấm đạo ôn thu từ miền Bắc và Trung Việt Nam 1379
 - Molecular Analysis of Blast Pathogen Population in Northern and Central Vietnam..... 1390
- 4.P.6. Đặng Diễm Hồng, Võ Thương Lan, Hoàng Thị Minh Hiền, Trần Kiên Cường**
- Nghiên cứu tính đa dạng của một số loài rong guột (*Chlorophyta*) ở vùng quần đảo Trường Sa bằng kỹ thuật RAPD-PCR. 1392
 - Analysis of genetic variability of *Caulerpa* (*Chlorophyta*) collected in areas of Truong Sa Island by RAPD - PCR 1399
- 4.P.7. Phạm thị Vui, Hồ Huỳnh Thùy Dương**
- Quy trình phát hiện virus Dengue ở muỗi dựa trên kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)..... 1400
 - A detection protocol for mosquito-borne Dengue virus based on RT-PCR technique 1405
- 4.P.8. Nguyễn Công Hào, Nguyễn Cửu Thi Hương Giang, Nguyễn Công Phương Nam, Cassandra L. Smith**
- Kết quả nghiên cứu bước đầu về DNA của cây thuốc *Crinum latifolium* L. 1407
 - Preliminary results on study of DNA of *Crinum latifolium* L. 1412
- 4.P.9. Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thị Kim Liên, Trần Quốc Trọng, Quách Thị Liên, Lê Bích Thủy**
- Những kết quả bước đầu về tạo quần thể cho lập bản đồ phân tử các đặc điểm rễ ở lúa can 1413
 - The preliminary results on development population for molecular mapping of root traits in upland rice..... 1420
- 4.P.10. Nguyễn Văn Thiết, Lê Thị Lan Oanh**
- Một số kết quả bước đầu nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các giống nhãn trồng ở Việt Nam bằng kỹ thuật RAPD..... 1421
 - Preliminary results of studies on the genetic relationship of ten longan varieties cultivated in Vietnam by RAPD technique..... 1428
- 4.P.11. Nguyễn Văn Cường, Vũ Văn Diễn, Nguyễn Kim Đô, Nguyễn T. Diệu Thuý, Quynh Đình Thi**
- Tạo cá chuyển gen hormone sinh trưởng người 1429
 - Generation of the transgenic fish by microinjection of the human growth hormone gen (hGH) 1437

- 4.P.12. Trương Nam Hải, Đái Duy Ban, Phạm Công Hoạt, Hoàng Thị Minh Châu, Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Thị Kim Xuyên, Nguyễn Thanh Thủy, Nguyễn Đình Phúc và cộng sự**
- Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật gen chẩn đoán ung thư vòm mũi họng (*Nasopharyngeal carcinoma*) tại Viện Tai mũi họng Trung ương..... 1438
 - Genetic technique application in the diagnostic of the nasopharyngeal carcinoma (NPC) at the National institute of OtORHINOLARYNGOLOGY 1443
- 4.P.13. Lưu Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Thị Kim Dung, Đoàn Thị Hoà, Vũ Đức Quang, Trần Duy Quý**
- Xác định gen kiểm soát tính kháng đạo ôn và rầy nâu ở lúa bằng kỹ thuật AFLP 1444
 - Tagging genes controlling blast and brown planthopper resistance in rice using AFLP techniques..... 1451
- 4.P.14. Trần Duy Dương, Lưu Thị Ngọc Huyền, Vũ Đức Quang, Hoàng Tuyết Minh**
- Sử dụng phương pháp RAPD trong nghiên cứu đa hình một số dòng lúa phục vụ cho công tác chọn giống 1452g

LỜI TỰA

Công nghệ sinh học (CNSH) là một hướng khoa học công nghệ trọng điểm đã được quan tâm phát triển ở nước ta. Về mặt chính sách quốc gia điều này đã thể hiện chính thức qua nghị quyết 18/CP của Chính phủ ban hành ngày 11 tháng 3 năm 1994 ***“Phát triển CNSH ở Việt Nam đến năm 2010”***.

Nhằm phát triển CNSH thành một ngành kinh tế công nghiệp sinh học Thủ tướng Chính phủ cũng đã thành lập 4 chương trình quốc gia kỹ thuật - kinh tế trong đó có CNSH và ban hành quyết định số 54/1998/QĐ-TTg về Quy chế quản lý và điều hành các chương trình này. Chương trình kỹ thuật - kinh tế CNSH quốc gia hiện tại do ông Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Lê Huy Ngọ làm chủ nhiệm.

Để chuẩn bị cho sự phát triển CNSH việc nghiên cứu - triển khai đã được tiến hành trước một bước đáng kể. Từ năm 1986 bắt đầu có chương trình Nhà nước RD mang tên CNSH do Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường quản lý với mỗi kế hoạch tài khoá là 5 năm. Hiện nay chương trình đang ở tài khoá thứ ba. Trước đó trong kế hoạch 1981 - 1985 khi bắt đầu có các chương trình mục tiêu RD của Nhà nước thì cũng đã có một số chương trình mà một phần đáng kể nội dung là CNSH, ví như các chương trình : *“Sinh học phục vụ nông nghiệp”*, chương trình *“Công nghiệp thực phẩm - vi sinh”*, chương trình *“Cây lương thực và thực phẩm”*. Đương nhiên cùng với các chương trình Nhà nước, còn có các chương trình, đề tài CNSH ở các ngành, địa phương và cơ sở.

Để có điều kiện trao đổi, tổng kết các nghiên cứu, trước đây Nhà nước cũng đã cho phép tổ chức hai hội nghị khoa học CNSH toàn quốc. Đó là *“Hội nghị CNSH và hóa sinh, Hà Nội 1994”* và *“Hội nghị vi sinh vật học và CNSH, Hà Nội 1995”* (nhân kỷ niệm 100 năm ngày mất của Louis Pasteur).

Cũng với những mục tiêu trên, Hội nghị CNSH lần này được tiến hành khi chương trình quốc gia RD về CNSH tài khoá 1996 - 2000 sẽ kết thúc sau một năm nữa. Ban tổ chức nhất trí lấy tên cho hội nghị năm 1999 là ***“Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội 1999”***.

Việc tổ chức Hội nghị đã được sự đồng ý và ủng hộ từ các cơ quan lãnh đạo và quản lý Nhà nước, trước hết là Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường, đến các cơ sở nghiên cứu, các doanh nghiệp hữu quan. Đặc biệt đáng trân trọng là sự hưởng ứng nhiệt tình của các nhà khoa học CNSH trong toàn quốc. Chỉ sau hơn

một tháng kể từ ngày Ban tổ chức gửi thông báo và lời mời viết bài, chúng tôi đã nhận được gần 200 báo cáo gửi đến. Các báo cáo đã được biên tập và in toàn văn trong Tuyển tập này.

Ban tổ chức Hội nghị CNSH toàn quốc xin chân thành cảm ơn tất cả các cơ quan lãnh đạo và quản lý, các đơn vị, các nhà khoa học vì sự ủng hộ và tích cực tham gia.

Việc tổ chức Hội nghị và ấn hành Tuyển tập chắc chắn không tránh khỏi nhiều thiếu sót. Ban tổ chức chúng tôi mong được sự thông cảm và lượng thứ.

**TM. BAN TỔ CHỨC HỘI NGHỊ CNSH
TOÀN QUỐC, HÀ NỘI 1999**

**Trưởng ban
Lê Văn Nhung**

P.1

HOẠT ĐỘNG NGHIÊN CỨU TRIỂN KHAI CỦA CHƯƠNG TRÌNH NHÀ NƯỚC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC, KHCN-02 NĂM 1996-1998 VÀ TRIỂN VỌNG NĂM 1999-2000

Lê Văn Nhung, Trương Đình Kháng

Trong nhiệm kỳ kế hoạch 1996-2000, Chương trình KHCN-02 Công nghệ sinh học phục vụ phát triển nông lâm ngư nghiệp bền vững, bảo vệ môi trường và sức khỏe con người đã tiến hành được quá nửa chặng đường, chuẩn bị cho những nội dung khả thi đưa vào hoạt động trong nền kinh tế quốc dân của thế kỷ 21.

Mục tiêu của Chương trình KHCN-02 bao gồm những vấn đề khoa học công nghệ đáp ứng cho hoạt động kinh tế xã hội với kỳ vọng đạt được những kết quả áp dụng trong sản xuất. Cụ thể như sau:

Mục tiêu khoa học công nghệ

- Khai thác có hiệu quả tài nguyên sinh vật và tạo sản phẩm bằng công nghệ sinh học.
- Đưa kết quả hoạt động về CNSH phục vụ sản xuất và ứng dụng.
- Giải quyết chắc chắn từng loại công nghệ có tính khả thi cao, góp phần kiến tạo sản phẩm cụ thể cho xã hội.
- Nâng cao trình độ khoa học và trình độ thao tác công nghệ đối với các lĩnh vực CNSH.

Mục tiêu kinh tế - xã hội

- Đưa các nội dung về KHCN phục vụ kịp thời cho việc thực hiện Nghị quyết 18/CP của Chính phủ về phát triển CNSH đến năm 2010.
- Tập trung tạo ra các công nghệ mũi nhọn để xây dựng nền công nghiệp sinh học ở Việt Nam.
- Đưa các kỹ thuật khả thi của CNSH vào sản xuất, tạo sản phẩm cho xã hội.

Để đáp ứng từng phần có trọng tâm trọng điểm các yêu cầu của Nhà nước về lựa chọn những nội dung cụ thể thực hiện trong Chương trình cho phép đạt được các mục tiêu trên đây là yêu cầu mà các đề tài cần đạt được.

Trong 2 năm 1996-1998, Chương trình bao gồm 10 đề tài nghiên cứu-triển khai và 4 đề tài triển khai thực nghiệm (các dự án sản xuất thử nghiệm).

Bám sát yêu cầu và mục tiêu đề ra. Chương trình KHCN-02 đã đạt được những kết quả trên một số lĩnh vực với sự hoạt động của các đề tài như sau:

I. VỀ CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO, CÔNG NGHỆ GEN THỰC VẬT

Chương trình có 2 đề tài cho lĩnh vực nhân giống, tạo giống và phục tráng giống bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào, công nghệ gen (Mã số KHCN-02-01 và KHCN-02-02 và Dự án sản xuất thử nghiệm KHCN-02-DA3).

- Chúng ta đã có đội ngũ cán bộ có trình độ trong lĩnh vực công nghệ tế bào và công nghệ gen đối với cây trồng.
- Đã phân tích được trình tự cấu trúc gen của các đối tượng cây trồng tạo ra trong quá trình nghiên cứu, hiểu rõ bản chất của sự đổi thay trong cây trúc di truyền là điều mà trước đây chúng ta chỉ có thể phỏng đoán.
- Nắm bắt và sử dụng thành thạo một số khâu trong kỹ thuật di truyền, hoàn thiện kỹ thuật bản gen trong chuyển gen hữu ích vào lúa, khoai lang và bắp cải.
- Xây dựng được quy trình chọn tạo các dòng lúa chịu bệnh đạo ôn và chịu mặn bằng công nghệ tế bào. Đã tạo được các dòng lúa lưỡng bội bằng nuôi cấy bao phấn và đánh giá được độ thuần chủng khi sử dụng.
- Đã tiến hành khảo nghiệm và được công nhận 1 dòng lúa DR2 có năng suất cao, chất lượng tốt, chịu hạn cho sản xuất bằng công nghệ tế bào.
- Quy trình tái sinh cây có mùi bằng phôi vô tính (từ quả non, lá non) đã được hoàn thiện từng bước để tạo giống cam quýt sạch bệnh mở ra triển vọng nhân nhanh nhiều giống tốt invitro cho các vùng chuyên canh cây có mùi.
- Đã chọn được 5 loài phong lan quý cho công tác nhân giống phục vụ sản xuất hoa cây cảnh cho thị trường. Quy trình công nghệ tổng hợp trong nhân giống phong lan, nhân trong vườn ươm để có thời gian ra hoa sớm, nhiều hoa trong điều kiện thời tiết miền Bắc đang đi dần đến kết quả. Đối với địa lan đã hoàn thiện được quy trình nhân giống cho sản xuất.
- Công nghệ nhân giống tiên tiến trong sản xuất cây lâm nghiệp cũng là nội dung quan trọng của các đề tài. Công nghệ giám hom tiên tiến đã chứng tỏ là ưu việt trong điều kiện nuôi cấy mô các loài thực vật thân gỗ chưa hoàn thiện. Đã thực hiện các bể nhân hom phủ ni lông không cần hệ thống phun sương là loại hình công nghệ đơn giản, chi phí thấp được thí nghiệm để nhân giống cây Sao đen và cây Dầu nước, mở ra triển vọng nhân được nhiều giống cây bản địa quý cho công tác làm giàu rừng trong tương lai.
- Cây dược liệu quý cũng là nội dung được quan tâm. Cho đến nay, quy trình công nghệ nhân nhanh cây trinh nữ hoàng cung (có tác dụng trị ung thư tiền liệt tuyến, ung thư vú, trị thấp khớp, áp xe) đã hoàn thành bằng kỹ thuật tái sinh

trực tiếp. Đối với cây cà gai leo (Chữa sơ gan mãn, chống nhiễm độc TNT) đã sử dụng lát cắt mỏng để tái sinh cụm chồi, tạo cây con thành công, cần có thời gian để đưa cây từ bầu ra ruộng.

- Dự án nuôi cấy mô mía lượng đường cao (14-15%) đã hoàn thiện qui trình nhân từ phòng thí nghiệm đến vườn ươm và trong sản xuất đã đạt 500.000 cây. Từ qui mô 8 ha nhân giống đã triển khai ra 100 ha cho Đà Bắc (Hoà Bình và một số huyện miền núi). Giống mía ROC16 do dự án nhân đã cung ứng giống chịu hạn cho các vùng đồi, năng suất đạt 60-70 tấn/ha. Mô hình nhân giống mía bằng nuôi cấy mô đã được các tỉnh tiếp nhận.

II. VỀ CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC CHẾ PHẨM CHĂM SÓC, BẢO VỆ CÂY TRỒNG NÔNG NGHIỆP (bao gồm các đề tài KHCN-02-06, KHCN-02-07, KHCN02-08 và KHCN-02-09)

Như ta đã biết việc thất thu trước và sau thu hoạch trên nền của sản lượng cây trồng hiện nay là 20-30% sản lượng nếu không có các giải pháp bảo vệ và chăm sóc thích hợp. Hàng năm chúng ta sử dụng 40.000 tấn thuốc sâu hoá học và khoảng 20 triệu tấn phân bón hoá học các loại. Mục tiêu của công nghệ sinh học là tìm ra những giải pháp khả thi để sản xuất thuốc sâu và phân bón sinh học với tỷ trọng ngày càng cao.

- Đã hoàn thiện được công nghệ sản xuất phân vi sinh vật cố định đạm và phân giải lân trên nền chất mang không khử trùng với bộ vi sinh vật có hoạt lực cao và tính tiềm sinh trong các điều kiện Việt Nam. Giải pháp này đã có tính năng ưu việt chung cho các vi sinh vật không có bào tử, làm nền tảng cho công nghệ sản xuất của các xí nghiệp phân bón vi sinh, sinh học, có khả năng phát triển do hiệu lực cao, giá thành hạ.
- Để bảo vệ cây trồng lâm nghiệp, đã hình thành được công nghệ sản xuất nấm rễ ngoại cộng sinh. Tuy nhiên nội dung này cần hoàn thiện hơn đối với cây lâm nghiệp trưởng thành để có thể phục vụ sản xuất lớn.
- Các công nghệ sản xuất các chế phẩm vi sinh bảo vệ thực vật dần dần được hoàn thiện và tiến tới công nghệ sản xuất sử dụng hỗn hợp để tăng hiệu lực diệt sâu cả về thời gian, tốc độ. Chế phẩm BT có khả năng diệt trên 90% sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh cho rau. Chế phẩm NPV có hiệu lực trừ sâu khoang cho lạc đạt 48% sau 2 ngày. Chế phẩm *Beauveria* diệt sâu róm thông, châu chấu trên mía đạt hiệu lực 80-90%.
- Đã xây dựng được kỹ thuật tổng hợp về đấu tranh sinh học để sử dụng có hiệu quả các sinh vật có ích để diệt trừ sinh vật có hại và cho đến nay đã có bộ chủng giống vi sinh vật ổn định cho khai thác trong tương lai.
- Một nội dung mới của Chương trình là đã sử dụng các giải pháp hoá sinh để tạo ra các chế phẩm có bản chất protein, alcaloit, glucosit làm tác nhân diệt trừ sâu bệnh, góp phần bảo vệ cây trồng. Đã xây dựng được 7 qui trình đơn giản để sản

xuất các chế phẩm (PPI, HAMA1, MT1, HA, cao bộ. . .) sử dụng các loại thực vật Việt Nam trong sản xuất thuốc sâu hoá sinh. Các chế phẩm có hoạt lực cao (diệt 70-90% sâu bệnh), an toàn đối với người và các động vật khác, thời gian tự phân huỷ nhanh. Luận cứ của đề tài về nguồn nguyên liệu là phong phú, có khả năng đáp ứng cho sản xuất sản phẩm phục vụ các vùng chuyên canh rau quả qui mô trung bình và nhỏ.

- Chế phẩm chẩn đoán, trị liệu cây trồng cũng là nội dung mới có nhiều triển vọng trong dự báo chính xác các nạn dịch bệnh lớn để có biện pháp phòng trừ. Công nghệ sản xuất huyết thanh kháng virus (CMV) và huyết thanh kháng vi khuẩn (EW1) cho thử nghiệm và chẩn đoán bệnh đã được hình thành. Đề tài cũng đã sản xuất và thử nghiệm kháng huyết thanh của nấm đạo ôn, mở ra triển vọng cho phòng trừ loại dịch bệnh nguy hiểm này cho các trà lúa.

III. VỀ VACCIN VÀ CÁC CHẾ PHẨM CHẨN ĐOÁN TRỊ LIỆU CHO VẬT NUÔI (đề tài KHCN-02-03 và dự án SXT KHCN-02-DA4)

Với ý đồ thực hiện giải pháp công nghệ sản xuất và thử nghiệm vaccin đa giá phòng bệnh cho vật nuôi, đề tài đã sản xuất và thử nghiệm diện hẹp thành công vaccin tam liên (dịch tả lợn -- đóng dấu lợn + tụ huyết trùng) và nhị liên (đóng dấu lợn + phó thương hàn). Các chế phẩm vaccin này đã được thử nghiệm thành công và an toàn trên một số lợn cho các địa phương. Giải pháp tỏ ra có hiệu quả do sử dụng đơn giản, chi phí thấp và thuận lợi (do không phải tiêm nhiều lần cho từng loại vaccin), tuy nhiên công nghệ mới này cần có thời gian kiểm chứng mới có thể phát triển được.

- Vaccin nhũ hoá phòng chống bệnh suy giảm miễn dịch cho gà sinh sản và gà con đã được hoàn thiện nâng cao một bước, bảo vệ được gà trong sản xuất lớn: nội dung này đang được khảo nghiệm để có thể sản xuất.
- Các KIT (chế phẩm) chẩn đoán bệnh *Mycoplasma* gia súc, gia cầm, các bệnh kí sinh trùng đường máu, KIT chẩn đoán bệnh gumboro gà và KIT chẩn đoán bệnh bụng tằm đã mở ra khả năng sản xuất và sử dụng trong nước bằng các chế phẩm do Việt Nam sản xuất sẽ trở thành một lĩnh vực mới trong sử dụng công nghệ cao để sản xuất chế phẩm chẩn đoán - trị liệu bệnh, bảo vệ vật nuôi.
- Viện hoá học công nghiệp đã hoàn thành dự án sản xuất chế phẩm dextran để sản xuất dextran-Fe làm thuốc trị bệnh thiếu máu cho lợn con. Dự án đã hoàn thiện dây truyền công nghệ và thiết bị sản xuất qui mô 30.000 lít/năm, cung ứng hàng chục triệu liều dextran-Fe, đạt được điển, được Bộ NN-PTNT công nhận, sản phẩm tiêu thụ tốt. Ta có khả năng đáp ứng đủ nhu cầu thị trường sản phẩm này.

IV. VỀ LĨNH VỰC BẢO VỆ MÔI TRƯỜNG (bao gồm 2 đề tài KHCN-02-04 xử lý rác thải và KHCN-02-05 xử lý nước thải)

- Công nghệ vi sinh trong xử lý rác thải đã được định hình và có sự ứng dụng cụ thể. Bằng phương pháp sử dụng tổng hợp nhiều chủng vi sinh vật: xạ khuẩn ưa

nhệt phân giải xelluloza, nấm sợi ưa nhiệt phân giải xelluloza vi khuẩn phân giải phốt phát, vi khuẩn cố định đạm. Đề tài đã giải quyết thành công qui trình phân giải nhanh rác thải. Đã xây dựng công nghệ xử lý phân giải rác qui mô 1300-1500 m³/mẻ, rút ngắn thời gian xử lý từ 45 ngày xuống 25-27 ngày, góp phần giải quyết nhanh khối lượng rác bị tồn đọng. Sản phẩm sau xử lý được chế biến thành phân bón hữu cơ sinh học, đưa ra sản xuất hàng trăm ngàn tấn phục vụ sản xuất nông nghiệp.

- Nước thải ở môi trường Việt Nam có các chỉ tiêu BOD, COD, SS và colifrom cao gấp 5-10 lần tiêu chuẩn, cần phải có xử lý để bảo vệ môi trường. Đề tài đã đưa ra và thực nghiệm thành công công nghệ với các bước sau: Dùng biện pháp sinh học để ổn định nước thải đưa vào; sử dụng thùng phản ứng sinh học kỵ khí, hiếu khí và đĩa quay sinh học để xử lý; sử dụng hệ thống thuỷ sinh loại bỏ kim loại nặng.

Sử dụng thùng phản ứng sinh học đã chứng minh tính hiệu quả trong làm sạch các loại nước thải chăn nuôi, nước thải chế biến thực phẩm và các loại nước thải giàu chất hữu cơ, mở ra triển vọng áp dụng trong thời gian tới.

V. VỀ CÁC ĐỀ TÀI, DỰ ÁN SẢN XUẤT SẢN PHẨM Y SINH HỌC VÀ CÁC LOẠI ĐƯỜNG ĐƠN (đề tài KHCN-02-10, dự án KHCN-02-DA1 và KHCN-02-DA2)

Để sử dụng tốt nguồn tài nguyên sinh vật của đất nước trong tạo ra các sản phẩm cho xã hội, Dự án sản xuất Vitamin A và E đã hoàn thiện công nghệ trong sản xuất 7 loại chế phẩm y tế giàu vitamin E từ gốc: mứt viga, Becaroten-E, Becaten Film, Becaten nang, Btaritol, Becaroten-E film và Becarotennang với hơn 2 triệu viên các loại.

Dự án KHCN-02-DA2 đã hoàn thiện nấp đặt dây chuyền công nghệ sản xuất thành công glucoza siro và tinh thể phục vụ cho công nghiệp thực phẩm, dược phẩm. Cho đến nay đã ổn định qui trình và sản xuất được hơn 10 tấn glucoza tinh thể.

- Đề tài KHCN-02-10 đã hoàn thiện 4 qui trình công nghệ trong sản xuất 4 chế phẩm thực phẩm chức năng cụ thể : Viên nang hải sâm, Rabitol từ động vật biển , viên nang Memacin từ nấm và laltest từ sam biển . Các chế phẩm này có tác dụng tích cực trong bồi dưỡng sức khoẻ vận động viên thể thao và phục vụ các lực lượng vũ trang, được thực tiễn chấp nhận.
- Như vậy, sau 3 năm hoạt động, Chương trình KHCN-02 đã đạt được từng phần mục tiêu về khoa học công nghệ đã đề ra, đội ngũ cán bộ KHCN đã được nâng cao trình độ khoa học và thao thác công nghệ; một số sản phẩm đã được sản xuất thử nghiệm bằng công nghệ tiên tiến, tạo lập được thị trường cho một số sản phẩm công nghệ sinh học phục vụ sản xuất và đời sống.

VI. PHƯƠNG HƯỚNG CHO NĂM 1999-2000

Trên cơ sở các kết quả đạt được trong các năm qua, Chương trình KHCN-02 còn hơn 1 năm hoạt động với 13 đề tài với các nội dung chính yếu sau đây:

1. Xác lập một cách chắc chắn cơ sở khoa học và công nghệ trong việc sử dụng kỹ thuật phân tử, công nghệ tế bào và công nghệ gen trong kiến tạo cây trồng mới cho sản xuất. Xác minh tính thực tiễn của các giải pháp công nghệ cao trong tạo cây trồng mang gen và biểu hiện gen chống chịu yếu tố bất lợi. Xác lập thị trường cho công nghệ nhân giống invitro đối với cây trồng.
2. Tổng hợp các điều kiện trong sản xuất chế phẩm sinh học làm phân bón sinh học chất lượng cao và thuốc trừ sâu sinh học từ nguồn nguyên liệu trong nước.
3. Tiếp tục đưa ra các công nghệ khả thi trong xử lý nước thải và phụ phế thải nông nghiệp.
4. Đi sâu xác lập công nghệ sản xuất chế phẩm bảo vệ cây trồng và vật nuôi, xây dựng một số pilot sản xuất, cải tiến và thống nhất tính chất của các chế phẩm chăm sóc thú y cho toàn quốc.
5. Bước đầu tiếp nhận và đào tạo cán bộ có trình độ công nghệ về sản xuất kháng sinh mới, chuẩn bị cho sản xuất kháng sinh trong các liên doanh và đưa ra các giải pháp công nghệ cao trong bảo quản nông sản.

R & D AGIVITIES OF GOVERNMENT PROGRAM ON BIOTECHNOLOGY, KHCN 02 IN THE PERIOD OF 1996 - 1998 AND PERSPECTIVES OF THE PERIOD OF 1999 - 2000

Le Van Nhung, Truong Dinh Khang

SUMMARY

This item has showed the result of R&D topics and P projects in national biotechnology program, coden KHCN-02 for two years 1997-1998 and the direction of the development in next two years 1999-2000.

ĐỊNH HƯỚNG PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ SINH HỌC Ở VIỆT NAM ĐẾN NĂM 2010

Phạm Hữu Giục

BỘ KHOA HỌC, CÔNG NGHỆ VÀ MÔI TRƯỜNG

I. MỞ ĐẦU

Công nghệ sinh học (CNSH) là một tập hợp các ngành khoa học và công nghệ (sinh học phân tử, di truyền học, vi sinh vật học, sinh hoá học và công nghệ học) nhằm tạo ra các qui trình công nghệ khai thác ở qui mô công nghiệp các hoạt động sống của vi sinh vật, tế bào thực vật và động vật để sản xuất các sản phẩm có giá trị phục vụ đời sống, phát triển kinh tế xã hội và bảo vệ môi trường.

Hiện nay, CNSH thường được xem là bao gồm các loại công nghệ và kỹ thuật chủ yếu: kỹ thuật di truyền, công nghệ vi sinh, công nghệ tế bào và mô, công nghệ enzym.

Nghị quyết 18 CP của Thủ tướng chính phủ khẳng định: Cùng các ngành công nghệ mũi nhọn khác (công nghệ thông tin, công nghệ tự động hoá và công nghệ vật liệu mới), công nghệ sinh học sẽ góp phần khai thác tối ưu các nguồn lực của đất nước phục vụ phát triển sản xuất, nâng cao chất lượng cuộc sống của nhân dân và chuẩn bị những tiền đề cần thiết về mặt công nghệ cho đất nước tiến vào thế kỷ 21.

II. ĐÁNH GIÁ HIỆN TRẠNG TIỀM LỰC KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VÀ CÔNG NGHIỆP TRÊN LĨNH VỰC CNSH

1. Tiềm lực về tài nguyên thiên nhiên và khí hậu

Việt Nam là một nước nhiệt đới có khu hệ sinh vật (vi sinh vật, thực vật, động vật) hết sức phong phú và đa dạng, nguồn tài nguyên thiên nhiên này cung cấp:

1. Những nguồn gen phong phú và quý hiếm cho chọn lọc, lai tạo giống và phát triển kỹ thuật di truyền;
2. Những nguồn nguyên liệu phong phú cho các quá trình công nghệ thuộc lĩnh vực CNSH (công nghệ lên men, công nghệ enzym, công nghệ chiết rút các hoạt chất sinh học).
3. Nguồn bức xạ mặt trời dồi dào và phân bố đều trong năm là điều kiện hết sức thuận lợi cho sự phát triển của thực vật. Một nền nông nghiệp 3-4 vụ trồng trọt năng suất cao trong năm sẽ là nguồn cung cấp nguyên liệu phong phú (tinh bột, đường, sinh khối) cho sự phát triển CNSH.

Đồng thời với những lợi thế, khí hậu nhiệt đới nóng ẩm cũng gây không ít khó khăn cho sự phát triển CNSH, nhất là đối với công nghệ vi sinh.

2. Tiềm lực khoa học và công nghệ

1. Về nghiên cứu và phát triển

Trong vài thập kỉ qua, nhiều hướng nghiên cứu về CNSH đã được triển khai và thu được kết quả tốt, cả trong việc tăng cường tiềm lực khoa học - công nghệ lẫn trong phục vụ nền kinh tế quốc dân:

1. *Công nghệ vi sinh.* Các hướng nghiên cứu khác nhau đã được tiến hành nhằm xây dựng các công nghệ sản xuất các sản phẩm enzym, sinh khối giàu protein, phân vi sinh vật cố định nitơ, thuốc trừ sâu vi sinh vật, học môn thực vật, kháng sinh thô, axit amin, nước giải khát lên men, vaccin phòng bệnh cho người và gia súc, axit hữu cơ.
2. *Công nghệ tế bào.* Hướng nghiên cứu được tập trung và đã đạt được những thành tựu đáng kể là xây dựng các công nghệ nhân nhanh và phục tráng các cây lương thực, thực phẩm, cây công nghiệp, cây ăn quả. Bên cạnh đó, việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô và tế bào trong lai tạo, chọn lọc giống cây trồng, rút ngắn thời gian tạo giống và thu hoạt chất đang được triển khai tích cực. Bước đầu đã tiếp cận kĩ thuật gen trong việc tạo ra những cây mang gen biến nạp có những đặc tính ưu việt.
3. *Về công nghệ tế bào động vật.* Đã thử nghiệm kĩ thuật cấy truyền hợp phôi và có những kết quả bước đầu đối với bò. Tiếp đến là những thành công trong việc sử dụng kĩ thuật bảo quản lạnh sâu đối với tinh trùng bò, lợn, dê.
4. *Công nghệ enzym.* Nghiên cứu về công nghệ enzym đã được tiến hành khá sớm, bởi nhiều tác giả, như sử dụng phủ tạng của lò mổ để chiết xuất pancrease, pepsin, trypsin,... sử dụng mầm mại để sản xuất amylase... nhưng hầu hết còn dừng lại trong phòng thí nghiệm. Gần đây một số đơn vị nghiên cứu về enzym đã có những thử nghiệm công nghệ như sản xuất axit amin từ nhộng tằm bằng protease, bột đạm thịt bằng bromelain từ dứa, lên men rượu bằng enzym cố định trên cột... Cũng đã có những nghiên cứu sử dụng peroxidase, Cyt-P450 trong chế tạo biosensor và thuốc phát hiện chất độc. Hoàn thiện công nghệ sản xuất đường glucoza từ tinh bột bằng enzym, theo phương pháp axit đã sản xuất thử nghiệm, chuyển giao công nghệ cho một số cơ sở sản xuất với quy mô 20 tấn nha Glucoza/ngày.
5. *Công nghệ gen.* Công nghệ gen là công nghệ cao và là công nghệ quyết định sự thành công của cuộc cách mạng CNSH. Ở nước ta, một vài phòng thí nghiệm được nhà nước đầu tư bước đầu và có điều kiện gửi cán bộ đi thực tập ở những phòng thí nghiệm tiên tiến nước ngoài đã bước đầu làm chủ được các kỹ thuật cơ bản của công nghệ gen như phân lập và xác định cấu trúc gen, thiết kế và biến nạp gen vào tế bào vi sinh, tế bào động vật và thực vật, nghiên cứu biểu hiện gen. Hiện tại, đang có một số công trình nghiên cứu đi sâu về gen thủy phân và lên men tinh bột, gen học môn sinh trưởng ở cá, gen chống chịu úng, hạn, lạnh ở lúa, gen tổng hợp độc tố BT, ứng dụng kĩ thuật nhân gen (PCR) trong nhận dạng, trong kĩ thuật hình sự, chẩn đoán bệnh...

2. Về đội ngũ cán bộ khoa học - công nghệ

Trong những năm qua, một đội ngũ các nhà khoa học về CNSH từ tiến sĩ, phó tiến sĩ, kĩ sư đến kĩ thuật viên đã được đào tạo. Đội ngũ cán bộ này đã vượt qua nhiều khó khăn để phát huy tác dụng trong các cơ sở đào tạo, nghiên cứu và trong sản xuất kinh doanh. Do những khó khăn khác nhau, đặc biệt là thiếu thông tin và thiếu các phương tiện nghiên cứu, nên trình độ của đội ngũ cán bộ này ít được cập nhật và không theo kịp được những tiến bộ của CNSH thế giới.

3. Cơ sở vật chất và tổ chức của các cơ quan KHCN thuộc lĩnh vực CNSH

Đối với một lĩnh vực khoa học thực nghiệm như CNSH, nếu không có các phòng thí nghiệm tốt không thể có được các nhà khoa học có trình độ và tất nhiên không thể có được các kết quả khoa học có trình độ cao.

Trong một vài thập kỉ qua, chúng ta đã xây dựng được một mạng lưới các phòng thí nghiệm về CNSH ở các trường đại học và các viện nghiên cứu. Song, do chưa được đầu tư thích đáng, nên phần lớn các phòng thí nghiệm này rất lạc hậu và ở nhiều nơi, phòng thí nghiệm hầu như không có trang thiết bị và các điều kiện tối thiểu cho các nhà khoa học tiến hành các thí nghiệm. Trong vòng 5 năm qua, ngân sách nhà nước đã đầu tư khoảng 2 triệu USD cho một vài phòng thí nghiệm. Những phòng thí nghiệm này bước đầu đã có điều kiện tối thiểu để làm việc. Song, những gì chúng ta đã đầu tư còn xa mới đáp ứng được yêu cầu để CNSH thực sự có thể đóng góp cho sự phát triển của nền KTQD.

4. Đánh giá chung về tiềm lực KHCN thuộc lĩnh vực CNSH

Như vậy, với sự nỗ lực của nhiều năm, năng lực nghiên cứu triển khai trong lĩnh vực CNSH của chúng ta đã được nâng lên một bước. Một số phòng thí nghiệm đã có đủ trình độ để giải quyết một số vấn đề mà nền Kinh tế quốc dân đòi hỏi, có khả năng tiếp thu một cách chọn lọc những thành tựu khoa học - công nghệ hiện đại và từng bước vận dụng chúng trong điều kiện cụ thể của Việt Nam. Đặc biệt trong lĩnh vực y tế, những thành tựu mới về CNSH đã được ứng dụng trong sản xuất vắc xin và do đó, trình độ công nghệ của chúng ta đã đạt trình độ tiên tiến, sản phẩm đạt tiêu chuẩn của Mỹ và Nhật Bản và được xuất sang Nhật Bản. Song đánh giá một cách nghiêm túc, chúng ta thấy năng lực nghiên cứu triển khai thuộc lĩnh vực CNSH của chúng ta còn rất hạn chế xét về trình độ của các công trình nghiên cứu lẫn khả năng tạo được công nghệ hoàn chỉnh phục vụ nền Kinh tế quốc dân.

Nguyên nhân của sự chậm phát triển cũng như các yếu, kém của CNSH trong thời gian qua tập trung vào 2 vấn đề lớn sau đây:

1. **Đầu tư.** Hai vấn đề bất cập trong thời gian qua là mức đầu tư cho CNSH rất nhỏ so với yêu cầu, đầu tư thường chưa "tối hạn" và đầu tư không đồng bộ. CNSH là một ngành khoa học thực nghiệm và lại là một ngành công nghệ cao, do đó đòi hỏi mức đầu tư tương xứng để bắt kịp với trình độ công nghệ của thế giới. Song, trong những năm qua mức đầu tư của ta chỉ bằng 1/50 - 1/100 của các nước trong khu vực. Bên cạnh đó, sự đầu tư này lại không đồng bộ: đầu tư cho nghiên

cứu triển khai không gắn kết với đầu tư cho đào tạo, cho phát triển cơ sở hạ tầng của CNSH cũng như phát triển nền công nghiệp sinh học.

2. *Cách tổ chức thực hiện.* Có những vấn đề về CNSH mà trong thời gian qua chúng ta hoàn toàn có khả năng phát triển ở mức cao hơn hiện nay, song do lúng túng trong cách tổ chức thực hiện nên chậm được phát triển. Lấy ví dụ thành công trong lĩnh vực công nghệ sản xuất vacxin cho thấy với tiềm lực hiện này, song với cách đi đúng chúng ta hoàn toàn có thể phát triển được CNSH: xây dựng nội lực để tiếp thu chuyển giao công nghệ, tiếp nhận chuyển giao công nghệ để phát triển nội lực bảo đảm làm chủ được công nghệ, lấy sản xuất làm đích để định hướng toàn bộ vấn đề phát triển.

3. Tiềm lực của nền Công nghệ sinh học Việt Nam

Đã từ lâu, ngành Công nghệ sinh học thế giới đã có chỗ đứng vững chắc và chiếm tỉ trọng không nhỏ trong nền kinh tế thế giới. Ở Việt Nam, ngành Công nghệ sinh học mới chỉ có các sản phẩm là rượu cồn, bia và vacxin phòng bệnh cho người được sản xuất ở qui mô công nghiệp, còn những sản phẩm khác chỉ sản xuất ở qui mô nhỏ, phân tán.

Theo thống kê gần đúng đến năm 1997, các sản phẩm do các tổ chức Khoa học-công nghệ Việt Nam sản xuất có liên quan đến CNSH như sau:

1. *Về nuôi cấy mô cây trồng - hạt lai.* Tổng lượng các loài cây trồng (chuối, mía, cây ăn quả, cây lâm nghiệp, cây dược liệu) được nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào, vi nhân giống, giâm hom tiên tiến, lúa lai, ngô lai có giá trị tương đương 50 tỷ đồng.
2. *Về phân bón sinh học.* Các loại phân bón sinh học (phân vi sinh cố định nitơ và phân giải lân, phân sinh hoá, phân hữu cơ từ rác thải) đạt giá trị 5,0 tỷ đồng.
3. *Về thuốc trừ sâu sinh học.* Đã sản xuất các chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học bảo vệ thực vật (thuốc vi nấm, vi khuẩn, virus, thuốc thảo mộc, ký sinh thiên địch) tương đương 50 tấn với tổng giá trị 1,6 tỷ đồng.
4. *Về CNSH vật nuôi.* Các sản phẩm thử nghiệm về cấy phôi bò, thức ăn bổ sung chất lượng cao, vacxin gia súc, gia cầm đạt 260-270 tỷ đồng (Cộng dồn 6 năm).
5. *Về bảo vệ sức khoẻ con người.* Giá trị các chế phẩm dinh dưỡng và dược phẩm y sinh học đạt doanh thu khoảng 1,5 - 2,0 tỷ đồng (trong khi hàng năm ta nhập 400 tấn kháng sinh các loại, trị giá 120 triệu USD; vacxin các loại tương đương 10 triệu USD).
6. *Về CNSH công nghiệp.* Các chế phẩm axit amin, protein, axit hữu cơ, các loại đường đơn có nhu cầu 100 - 300.000 tấn/năm, về cơ bản ta chưa sản xuất được, chỉ sản xuất thử nghiệm một số đường đơn (glucose, fructose) tương đương 1,8-2,0 tỷ đồng.
7. *Về CNSH bảo vệ môi trường.* Các quá trình sản xuất thử nghiệm công nghệ phân huỷ rác thải bằng công nghệ vi sinh đã xử lý được 1,2 triệu tấn rác/năm qui ra giá trị 8 tỷ đồng.

Nhìn chung lại, có thể nói ở Việt Nam chưa hình thành một nền Công nghệ sinh học theo đúng nghĩa của nó cả về bề rộng lẫn chiều sâu. Nguyên nhân chủ yếu ở đây là do năng lực đầu tư (cả của Nhà nước và tư nhân) của ta còn quá yếu kém.

III. NHỮNG QUAN ĐIỂM VÀ MỤC TIÊU PHÁT TRIỂN CNSH Ở VIỆT NAM

1. Quan điểm phát triển CNSH ở Việt Nam

- Phát triển CNSH nhằm vừa khai thác tối ưu, vừa bảo vệ và phát triển nguồn tài nguyên sinh vật của đất nước.
- Phát triển CNSH nhằm chủ yếu phục vụ phát triển nền nông - lâm - ngư nghiệp bền vững, bảo vệ sức khỏe con người và môi trường sống, trong đó lấy việc góp phần hiện đại hoá và công nghiệp hoá nông nghiệp và nông thôn làm trọng tâm.
- Phát triển CNSH trên cơ sở tiếp thu có chọn lọc các thành tựu của thế giới áp dụng vào điều kiện cụ thể của Việt Nam, nhanh chóng đi ngay vào các công nghệ tiên tiến (chú trọng qui mô vừa và nhỏ) đồng thời với việc hiện đại hoá các công nghệ truyền thống theo nguyên tắc đi tắt đón đầu.

2. Mục tiêu phát triển

Mục tiêu chính cần đạt được trong giai đoạn phát triển tới 2010 của CNSH nước ta là:

- Nghiên cứu ứng dụng chọn lọc các thành tựu khoa học - công nghệ thuộc lĩnh vực CNSH của thế giới phục vụ thiết thực và có hiệu quả sự phát triển bền vững nông - lâm - ngư nghiệp, công nghiệp chế biến, bảo vệ sức khỏe nhân dân và môi trường sống.
- Xây dựng một ngành Công nghệ sinh học phát triển bảo đảm sản xuất được các sản phẩm phục vụ tiêu dùng nội địa và xuất khẩu. Giai đoạn đầu đến năm 2005 lấy việc triển khai những công nghệ đạt được trong nước của 20 năm qua, đồng thời dựa và công nghệ nhập làm nền tảng để hình thành ngành công nghiệp sinh học, giai đoạn sau từ 2005 - 2010 kết hợp giữa công nghệ nội sinh và công nghệ nhập với tỉ trọng công nghệ nội sinh ngày càng chiếm tỉ trọng lớn để phát triển ngành công nghiệp sinh học đạt trình độ khu vực.
- Tạo lập được một hệ thống các cơ quan khoa học - công nghệ thuộc lĩnh vực CNSH có năng lực tiến hành nghiên cứu phát triển ở trình độ cao và có khả năng tạo ra các công nghệ mới, hiện đại phục vụ sự phát triển của nền kinh tế quốc dân.

IV. NHỮNG ĐỊNH HƯỚNG ƯU TIÊN PHÁT TRIỂN CNSH Ở VIỆT NAM

Sau đây là những định hướng ưu tiên phát triển của CNSH: Cho đến năm 2005 CNSH tập trung cho mục tiêu phục vụ phát triển nông nghiệp và bảo vệ sức khỏe con

người. Giai đoạn 2 từ 2005 đến 2010 CNSH mở rộng phạm vi phục vụ sang lĩnh vực công nghiệp và bảo vệ môi trường.

1. CNSH phục vụ phát triển Nông nghiệp bền vững

1. Tạo và nhân giống cây trồng chất lượng cao cho phát triển nông, lâm nghiệp và cây dược liệu.
2. Sản xuất chế phẩm sinh học làm phân bón, thuốc trừ sâu - bệnh phục vụ bảo vệ cây trồng và bảo quản nông sản.
3. Sản xuất các loại vacxin vật nuôi và tiến tới có được vacxin tái tổ hợp.
4. Sản xuất các chế phẩm chẩn đoán (KIT) bệnh cây trồng vật nuôi, ngăn chặn các dịch bệnh lớn.
5. Phát triển nhanh số lượng, chất lượng đàn giống và sản phẩm vật nuôi. Bảo tồn, phát triển và sử dụng nguồn gen quý.

2. CNSH phục vụ Y tế và bảo vệ sức khỏe nhân dân

1. Sản xuất kháng sinh bảo vệ sức khỏe nhân dân.
2. Sản xuất 10 loại vacxin phòng các bệnh chính cho người, trong đó có các vacxin thế hệ mới.
3. Sản xuất được các chế phẩm sinh học khác như vitamin, axit amin...

3. CNSH phục vụ các ngành công nghiệp

1. Sản xuất Protein, axit amin các loại.
2. Sản xuất axit hữu cơ và dung môi hữu cơ.
3. Công nghệ enzym.
4. Chế biến nông sản, thực phẩm.

4. CNSH phục vụ xử lý ô nhiễm môi trường

1. Công nghệ theo dõi và đánh giá mức độ ô nhiễm môi trường bằng các biosensor.
2. Công nghệ xử lý rác thải, phế thải hữu cơ rắn.
3. Công nghệ xử lý nước thải.

V. CÁC NỘI DUNG XÂY DỰNG VÀ PHÁT TRIỂN

1. Xây dựng và phát triển tiềm lực khoa học - công nghệ sinh học

CNSH mới là một lĩnh vực công nghệ cao và những hứa hẹn của CNSH trong thế kỉ 21 chính là CNSH mới. Trong tình hình năng lực công nghệ thuộc về CNSH của Việt Nam còn nhiều yếu kém, để có thể làm chủ được công nghệ cao này và đưa nó vào sản xuất đòi hỏi về xây dựng tiềm lực KHCN là hết sức cấp bách.

1. Đào tạo nhân lực cho CNSH

Thời gian để đào tạo được một lực lượng cán bộ KHCN đủ năng lực làm chủ công nghệ chắc chắn không dưới 5 năm. Do đó, việc đào tạo cán bộ cho CNSH đến nay đã là một đòi hỏi cấp bách và cần phải được bắt đầu ngay. Dự án đào tạo nhân lực cho CNSH phải bảo đảm đồng bộ về cơ cấu ngành nghề, cơ cấu trình độ. Về cơ cấu ngành nghề những lĩnh vực sau cần được lưu ý: kĩ thuật di truyền, CN vi sinh, CN tế bào, CN enzym, công nghệ học, trong đó đặc biệt chú trọng kĩ thuật di truyền và công nghệ học (các kĩ sư về quá trình công nghệ). Về cơ cấu trình độ, cần có kế hoạch đào tạo theo tỉ lệ thích hợp mà các nước phát triển vẫn duy trì: 1 tiến sĩ/10-20 đại học. Trong đào tạo cần kết hợp giữa bổ túc trình độ cho đội ngũ hiện có với việc đào tạo trong nước và nước ngoài.

- *Đào tạo ở nước ngoài.* Vốn ngân sách nên ưu tiên đào tạo cán bộ giỏi có học vị tiến sĩ tại các nước có trình độ cao về CNSH như Tây Âu, Mỹ, Nhật Bản. Nhà nước cần có chính sách khuyến khích loại hình du học tự túc vào việc đào tạo cán bộ về CNSH.
- *Đào tạo trong nước.* Cần mở chuyên ngành đào tạo về CNSH trong một số trường đại học. Mở các loại hình nâng cao trình độ cho đội ngũ hiện có: Đào tạo cán bộ Đại học (là chủ yếu) kết hợp với đào tạo cán bộ có trình độ sau đại học. Cần nghiên cứu hình thức mời các chuyên gia giỏi của nước ngoài tham gia giảng dạy và cộng tác tại Việt Nam.

2. Đầu tư xây dựng mạng lưới các phòng thí nghiệm CNSH và phòng thí nghiệm trọng điểm

Vì CNSH là một ngành KHCN có phạm vi tác động khá rộng (nông, lâm, ngư nghiệp, y tế, bảo vệ môi trường, công nghiệp), là một ngành có liên quan đến sự sống và phụ thuộc khá lớn vào các điều kiện tự nhiên, và Việt Nam là một nước trải dài từ vĩ độ 23°23' đến 8°23' tạo thành các vùng sinh thái rất khác nhau, do đó việc xây dựng một mạng lưới các phòng thí nghiệm về CNSH, trong đó có một số phòng thí nghiệm trọng điểm là yêu cầu khách quan.

3. Tăng cường năng lực nghiên cứu triển khai

Trong vòng 5 - 10 năm tới cần tăng cường năng lực nghiên cứu triển khai của các cơ quan KHCN nhằm: Làm chủ được các CN cao trong CNSH; Tạo được công nghệ mới phục vụ các nhu cầu của nền kinh tế. Hình thức: có thể tổ chức thành một hoặc một vài chương trình KHCN cấp nhà nước. Các nội dung nghiên cứu bao gồm:

1. *Nghiên cứu ứng dụng công nghệ cao.* NC làm chủ các kĩ thuật chủ yếu của công nghệ gen và ứng dụng công nghệ gen tạo ra các giống cây trồng, vi sinh vật, động vật, động thực vật thuỷ sinh mang gen biến nạp có các đặc tính ưu việt phục vụ sản xuất, ứng dụng các kĩ thuật và công nghệ cao trong CNSH để nghiên cứu sản xuất các chế phẩm sinh học, vacxin thế hệ mới...
2. *Nghiên cứu ứng dụng CN tế bào trong tạo và nhân giống cây trồng.* Ứng dụng các kĩ thuật của công nghệ tế bào thực vật trong nghiên cứu tạo giống cây trồng:

rút ngắn thời gian tạo giống, tạo các giống có phẩm chất, năng suất, có khả năng chống chịu cao. Nghiên cứu xây dựng các công nghệ nhân nhanh các giống cây trồng phục vụ các chương trình và dự án quốc gia: chương trình xuất khẩu nông sản, chương trình mía đường, dự án trồng mới 5 triệu ha rừng, chương trình phát triển cây ăn quả, chương trình phát triển cây dược liệu, chương trình phát triển thực vật thủy sinh... Góp phần xây dựng hệ thống các xí nghiệp nhân giống cây trồng.

3. *Ứng dụng công nghệ tế bào động vật.* Ứng dụng công nghệ tế bào động vật trong tạo giống một số vật nuôi. Triển khai ở qui mô lớn công nghệ sinh sản, trong đó chú trọng công nghệ cấy truyền phôi và công nghệ tinh đông lạnh vật nuôi: lợn, bò thịt, bò sữa, dê, thỏ sản. ứng dụng công nghệ tế bào động vật trong sản xuất một số chế phẩm sinh, y học như một kháng thể đơn dòng, vacxin...
4. *Phát triển công nghệ vi sinh và công nghệ lên men.* Nghiên cứu tạo các giống vi sinh vật và các qui trình công nghệ lên men vi sinh vật phục vụ sản xuất phân vi sinh vật và thuốc trừ sâu bệnh vi sinh vật, một số axit hữu cơ, làm sạch môi trường. Tổ chức nghiên cứu thiết kế, chế tạo các dây chuyền lên men (vấn đề này phải do các kĩ sư cơ khí, chế tạo máy, công nghệ học tiên hành).
5. *Phát triển công nghệ hoá sinh và công nghệ enzym.* Xây dựng các qui trình công nghệ để sản xuất công nghiệp các loại enzym từ sinh khối vi sinh vật, từ thực và động vật. Tìm kiếm và hoàn thiện công nghệ sản xuất các chế phẩm sinh học có giá trị cao từ vi sinh vật, thực vật, động vật trên cạn và dưới nước (Ví dụ: Tetrodotoxin từ gan cá nóc, LAL-test từ máu sam, thuốc chống ung thư, sốt rét, sinh đẻ có kế hoạch...)
6. *CNSH trong bảo quản, chế biến nông sản và công nghiệp thực phẩm.* Phát triển các công nghệ bảo quản nông sản hạn chế dần các công nghệ hiện hành đang sử dụng các chất hoá học. Phát triển các công nghệ chế biến nông sản qui mô nhỏ phục vụ việc chế biến nông sản tại chỗ. Hiện đại hoá và công nghiệp hoá các công nghệ chế biến cổ truyền. Phát triển các công nghệ sản xuất thực phẩm và các phụ gia cho chế biến thực phẩm.
7. *Nghiên cứu ứng dụng CNSH trong bảo vệ môi trường.* Phát triển các công nghệ xử lí các chất sinh hoạt, chất thải của các quá trình chế biến nông sản và chất thải công nghiệp rắn, lỏng. Phát triển công nghệ và xử lí ô nhiễm dầu.
8. *Nghiên cứu công nghệ sản xuất kháng sinh và vacxin thế hệ mới.* Nghiên cứu công nghệ cố định enzym để sản xuất kháng sinh. Phát triển công nghệ sản xuất vacxin thế hệ mới.

2. Xây dựng và phát triển nền công nghiệp sinh học

1. Sản xuất các sản phẩm phục vụ phát triển nông nghiệp bền vững

Xây dựng các xí nghiệp CNSH (qui mô huyện, liên huyện hoặc tỉnh) nhân nhanh giống cây trồng, sản xuất phân và thuốc trừ sâu bệnh hại thực vật. Xây dựng hoặc nâng cấp các xí nghiệp sản xuất các loại vacxin phòng bệnh vật nuôi và các chế phẩm chẩn đoán bệnh.

2. Sản xuất các sản phẩm phục vụ bảo vệ sức khoẻ nhân dân

Sản xuất kháng sinh: Nhập công nghệ để đến năm 2005 sản xuất được 1.000 tấn kháng sinh cơ bản. Sản xuất vacxin: đến 2005 sản xuất được 80 triệu liều thuộc 10 loại vacxin, trong đó có một khối lượng thích hợp vacxin thế hệ mới.

3. Sản xuất các sản phẩm công nghiệp

Sản xuất các axit hữu cơ, protein, axit amin. Sản xuất các dung môi hữu cơ.

4. Bảo vệ môi trường

Xây dựng các xí nghiệp xử lí rác và nước thải sinh hoạt tại các tỉnh, thành phố bằng các phương pháp công nghệ sinh học kết hợp với cơ học và hoá học.

VI. CÁC BIỆN PHÁP, CHÍNH SÁCH VÀ TỔ CHỨC THỰC HIỆN CÁC DỰ ÁN

Các Dự án độc lập sẽ là các Dự án về xây dựng tiềm lực chung cho ngành CNSH. Chương trình kĩ thuật kinh tế CNSH sẽ là một tập hợp các Dự án với mục tiêu cuối cùng xây dựng ngành công nghiệp sinh học Việt Nam.

1. Đề nghị Nhà nước cho phép sử dụng ODA cho việc tổ chức đào tạo cán bộ CNSH trong và ngoài nước.
2. Đề nghị Nhà nước cho phép sử dụng ODA để đầu tư tăng cường cơ sở vật chất kĩ thuật cho các cơ quan KHCN về CNSH.
3. Đầu tư và có chính sách thích hợp để phát triển ngành công nghiệp sinh học: Cho đến năm 2005, tập trung đầu tư cho Chương trình KT-KT CNSH. Chương trình KT-KT CNSH trong giai đoạn đến năm 2005 ưu tiên cho 2 lĩnh vực nông nghiệp và y tế. Chương trình KT-KT CNSH phải lồng ghép được các nội dung KHCN với các nội dung phát triển sản xuất và lồng ghép với các chương trình kinh tế xã hội khác. Để phát triển ngành công nghiệp sinh học Việt Nam, đề nghị Nhà nước có chính sách ưu đãi về thuế, vay tín dụng, sử dụng ODA để đầu tư, lập quỹ hỗ trợ đổi mới công nghệ, bảo hộ các sản phẩm CNSH đã được sản xuất trong nước bằng việc đưa vào Kế hoạch điều hành xuất nhập khẩu hàng năm của Chính phủ danh mục các sản phẩm CNSH cấm hoặc hạn chế nhập...

VII. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

1. Bộ Giáo dục và Đào tạo tổ chức xây dựng và triển khai Dự án Đào tạo nhân lực cho CNSH;
2. Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường tổ chức xây dựng và triển khai Dự án Đầu tư xây dựng mạng lưới các phòng thí nghiệm CNSH và phòng thí nghiệm trọng điểm và Dự án Tăng cường năng lực nghiên cứu triển khai;
3. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, cơ quan chủ trì Chương trình KT-KT CNSH, phối hợp với các Bộ, ngành thành viên Ban chủ nhiệm chương trình Xây

dựng và tổ chức triển khai Chương trình Kỹ thuật-Kinh tế CNSH (bao gồm các dự án tổ chức sản xuất các sản phẩm CNSH với mục tiêu xây dựng ngành công nghiệp sinh học);

4. Bộ Kế hoạch và Đầu tư, chủ trì cùng các Bộ Tài chính và Khoa học, Công nghệ và Môi trường tổ chức thẩm định các Dự án và Chương trình KT-KT CNSH, xây dựng kế hoạch huy động vốn, kế hoạch đầu tư, dự kiến phân bổ ngân sách Nhà nước hàng năm và 5 năm trình Thủ tướng Chính phủ phê duyệt;
5. Bộ Kế hoạch và đầu tư, Tài chính, Khoa học, công nghệ và Môi trường, Ban Chủ nhiệm Chương trình KT-KT CNSH xây dựng và trình Thủ tướng Chính phủ ban hành các chính sách nhằm thúc đẩy việc thực hiện đề án.

DIRECTIVES FOR DEVELOPEMT OF BIOTECHNOLOGY IN VIETNAM

Pham Huu Giuc

SUMMARY

Based on overall overviewing of the current development status the directives of biotechnology development in Vietnam to the year 2010 have been presented. Suggestions on regulatory and policy issues have been also made in order to ensure succesful implementation of the plans.

P.3

CHƯƠNG TRÌNH KỸ THUẬT - KINH TẾ VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC ĐẾN NĂM 2010

*Nguyễn Ngọc Kính***ỦY VIÊN THƯ KÝ - CHÁNH VĂN PHÒNG****BAN CHỦ NHIỆM CHƯƠNG TRÌNH KT-KT VỀ CNSH**

Ngày 8 - 1 - 1999, Thủ tướng Chính phủ đã ra quyết định về việc thành lập Ban Chủ nhiệm Chương trình Kỹ thuật - Kinh tế về Công nghệ Sinh học và giao cho Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn chủ trì Chương trình.

Khác với Chương trình nghiên cứu - triển khai (RD) hoặc các dự án Sản xuất thử - thử nghiệm (P) hiện nay do Bộ Khoa học, Công nghệ & Môi trường quản lý, Chương trình Kỹ thuật - Kinh tế là một chương trình đồng bộ về Khoa học - Công nghệ - Sản xuất (sản phẩm được thị trường chấp nhận) và hệ thống các chính sách, đầu tư; trong đó lấy công nghệ làm động lực phát triển nhằm đạt được các mục tiêu kinh tế xác định.

I. NHIỆM VỤ CỦA CHƯƠNG TRÌNH KỸ THUẬT - KINH TẾ

- Tạo ra những sản phẩm chủ lực có tính cạnh tranh (Sản phẩm: sản phẩm tiêu dùng cụ thể hoặc các công nghệ).
- Tạo ra năng lực công nghệ đủ mạnh để đảm bảo tính cạnh tranh của các sản phẩm.
- Làm hạt nhân cho sự nghiệp Công nghiệp hóa - hiện đại hóa.

II. NHỮNG QUAN ĐIỂM TRIỂN KHAI CHƯƠNG TRÌNH KT-KT VỀ CNSH Ở VIỆT NAM

1. Lấy phục vụ nông nghiệp và phát triển nông thôn làm trọng tâm cho giai đoạn trước mắt

Triển khai CNSH vào sản xuất nhằm chủ yếu phục vụ việc thực hiện có hiệu quả các chương trình An ninh lương thực, nông sản và thủy sản xuất khẩu, thanh toán một số bệnh xã hội và bệnh dịch nguy hiểm nhằm phát triển nền nông - lâm - ngư nghiệp bền vững, bảo vệ sức khỏe con người và môi trường sống, trong đó lấy việc góp phần hiện đại hóa và công nghiệp hóa nông nghiệp và nông thôn làm trọng tâm.

2. Lấy phát triển nội lực kết hợp với nhập công nghệ làm phương châm phát triển

Triển khai sản xuất CNSH trên cơ sở nâng cấp và hiện đại hóa các công nghệ truyền thống, chọn lọc đồng thời với việc phát triển hoàn thiện các công nghệ nội sinh

đã có và tiếp thu có chọn lọc các thành tựu công nghệ của thế giới áp dụng vào điều kiện cụ thể của Việt Nam, nhanh chóng đi ngay vào các công nghệ tiên tiến (chú trọng quy mô vừa và nhỏ).

3. Bảo đảm phát triển bền vững

Triển khai sản xuất CNSH nhằm vừa khai thác tối ưu, vừa bảo vệ và phát triển nguồn tài nguyên sinh vật của đất nước.

III. MỤC TIÊU TỔNG QUÁT CỦA CHƯƠNG TRÌNH KỸ THUẬT - KINH TẾ VỀ CNSH

Triển khai các công nghệ được chọn lựa từ nguồn nội sinh và nhập ngoại vào việc sản xuất các sản phẩm công nghệ sinh học có chất lượng cao, số lượng lớn đủ sức thay thế sản phẩm nhập trên thị trường tiêu dùng nội địa, phục vụ thiết thực và có hiệu quả vào việc thực hiện các Chương trình An ninh lương thực, Nông sản và thủy sản xuất khẩu, Chương trình tiêm chủng mở rộng ... nhằm bảo đảm sự phát triển bền vững nông - lâm - ngư nghiệp, công nghiệp chế biến, bảo vệ sức khỏe nhân dân và môi trường sống, từng bước tiến tới xây dựng một ngành Công nghiệp sinh học phát triển có đủ năng lực sản xuất và cạnh tranh đối với các chủng loại sản phẩm công nghệ sinh học chính yếu và đặc chủng cho thị trường tiêu dùng nội địa và xuất khẩu, góp phần thúc đẩy quá trình CNH - HĐH đất nước.

Cụ thể là:

- Xây dựng một ngành Công nghiệp sinh học phát triển bảo đảm sản xuất được các sản phẩm phục vụ tiêu dùng nội địa và xuất khẩu bao gồm các chế phẩm sinh học dùng trong sản xuất nông nghiệp, các sản phẩm y dược, sản phẩm phục vụ phát triển công nghiệp và bảo vệ môi trường.
- Tạo lập được một hệ thống liên kết các cơ quan khoa học - công nghệ với các ngành sản xuất và thị trường thuộc lĩnh vực CNSH có năng lực tiến hành sản xuất ra sản phẩm công nghệ sinh học (trong đó có giống cây trồng và vật nuôi) chất lượng cao, ở quy mô công nghiệp phục vụ sự phát triển nông lâm ngư nghiệp bền vững và bảo vệ sức khỏe con người.
- Giai đoạn đầu đến năm 2005 lấy việc triển khai những công nghệ đạt được trong nước của 20 năm qua, đồng thời dựa vào công nghệ nhập làm nền tảng để hình thành ngành công nghiệp sinh học, giai đoạn sau từ 2005 - 2010 kết hợp giữa công nghệ nội sinh và công nghệ nhập với tỉ trọng công nghệ nội sinh ngày càng chiếm tỉ trọng lớn để phát triển ngành công nghệ sinh học đạt trình độ khu vực.

IV. NHỮNG NỘI DUNG CHỦ YẾU CỦA CHƯƠNG TRÌNH KỸ THUẬT - KINH TẾ VỀ CNSH

Những định hướng ưu tiên phát triển của chương trình KTKT về công nghệ sinh học cho đến năm 2005 CNSH tập trung cho mục tiêu sản xuất phục vụ phát triển nông

ngiệp và bảo vệ sức khỏe con người. Giai đoạn 2 từ 2005 đến 2010 CNSH mở rộng phạm vi sản xuất sang lĩnh vực công nghiệp và bảo vệ môi trường.

1. Những công nghệ phục vụ phát triển Nông nghiệp bền vững

- Triển khai công nghệ tế bào và công nghệ gen vào việc tạo và nhân giống cây trồng chất lượng cao cho phát triển nông, lâm nghiệp, cây dược liệu và cây công nghiệp.
- Triển khai công nghệ sản xuất các chế phẩm sinh học, chủ yếu là chế phẩm vi sinh vật làm phân bón, thuốc trừ sâu bệnh phục vụ tăng năng suất cây trồng, bảo vệ cây trồng và bảo quản nông sản, giảm thiểu tác hại dùng thuốc hóa học.
- Sản xuất các loại vacxin vật nuôi và tiến tới có được vacxin tái tổ hợp, trước mắt bảo đảm được nhu cầu trong nước, từng bước thay thế việc nhập nội.
- Sản xuất các chế phẩm chuẩn đoán (KIT) bệnh cây trồng vật nuôi, ngăn chặn các dịch bệnh lớn, từng bước chuẩn hóa việc sản xuất giống cây ăn quả bảo đảm chất lượng phục vụ chương trình nông sản xuất khẩu.
- Triển khai công nghệ phôi và công nghệ tinh đông lạnh vào việc phát triển nhanh số lượng, chất lượng đàn giống và sản phẩm vật nuôi. Bảo tồn, phát triển và sử dụng nguồn gen quý.

2. Những công nghệ sản xuất phục vụ Y tế và bảo vệ sức khỏe nhân dân

- Triển khai công nghệ lên men vi sinh vật vào việc sản xuất một số kháng sinh quan trọng, từng bước giảm lượng kháng sinh nhập góp phần bảo vệ sức khỏe con người.
- Triển khai công nghệ nuôi cấy tế bào động vật và công nghệ gen vào việc sản xuất 10 loại vacxin phòng các bệnh chính cho người, trong đó có các vacxin thế hệ mới.
- Triển khai công nghệ lên men vi sinh vật và nuôi cấy tế bào để hình thành ngành công nghệ sản xuất các loại chế phẩm sinh học khác như vitamin, axit amin, hormon sinh trưởng, protein chữa bệnh ...

3. Những công nghệ phục vụ các ngành công nghiệp

- Công nghệ sản xuất các loại phụ gia (màu, mùi, vị và chất bảo quản) cho công nghiệp chế biến thực phẩm.
- Sản xuất axit hữu cơ và dung môi hữu cơ.
- Công nghệ enzym công nghiệp như amylase, cellulase và protease.
- Công nghệ sản xuất các loại nước uống và nước giải khát công nghiệp.

4. Những công nghệ phục vụ xử lý ô nhiễm môi trường

- Công nghệ theo dõi và đánh giá mức độ ô nhiễm môi trường bằng các biosensor.
- Công nghệ xử lý rác thải, phế phẩm hữu cơ rắn.
- Công nghệ xử lý nước thải.

V. MỤC TIÊU TRƯỚC MẮT CỦA CHƯƠNG TRÌNH KỸ THUẬT - KINH TẾ VỀ CNSH TỚI NĂM 2005

1. Giai đoạn từ 1999 đến 2000

Trong năm 1999 Chương trình hoàn thiện các công việc chuẩn bị như

1. Thành lập ban chủ nhiệm Chương trình,
2. Thành lập văn phòng Chương trình.
3. Ban hành các văn bản hướng dẫn xây dựng và thẩm định dự án,
4. Tiến hành xây dựng,
5. Tiến hành thẩm định các dự án khả thi,
6. Xây dựng và bảo vệ kế hoạch tổng thể thực hiện Chương trình kỹ thuật - kinh tế về Công nghệ sinh học,
7. Bảo vệ kế hoạch tổng thể và
8. Trình Thủ tướng Chính phủ phê duyệt kế hoạch tổng thể Chương trình kỹ thuật - kinh tế về CNSH.

Năm 2000 đề nghị Nhà nước cho triển khai thực hiện từ 5 đến 7 dự án có tính khả thi cao nhất chọn lựa từ 18 dự án đã đăng ký năm 1999. Các bước tiến hành bao gồm:

1. Xây dựng kế hoạch chi tiết cho từng dự án;
2. Tiến hành đấu thầu XD/CB và mua sắm trang thiết bị (nếu có);
3. Cấp vốn và triển khai thực hiện sản xuất;
4. Hoàn thiện và rút kinh nghiệm.

Cuối năm 2000 Chương trình có thể tiến hành hội nghị sơ kết đánh giá quá trình thực hiện và rút ra những bài học kinh nghiệm cho giai đoạn tiếp theo.

2. Giai đoạn từ 2001 đến 2005

Triển khai thực hiện 10 - 15 đề án được chọn lựa trên lĩnh vực phục vụ phát triển nông nghiệp bền vững và bảo vệ sức khỏe con người, từng bước nâng cấp công nghệ sản xuất cũ, thay thế sản phẩm nhập ngoại và tiến tới xuất khẩu.

Nhóm công nghệ liên quan đến cải tiến và nhân nhanh giống cây trồng vật nuôi bao gồm:

1. Tạo giống lúa;
2. Nhân giống cam chanh và dưa quả;
3. Nhân giống mía cao sản;
4. Nhân giống bò và lợn cao sản bằng công nghệ phôi và tinh động lạnh;
5. Sản xuất giống cá rô phi đơn tính và giống cá chép hậu bị. Tổng cộng 5 dự án.

Nhóm công nghệ sản xuất các chế phẩm bảo vệ cây trồng vật nuôi bao gồm:

1. Vaccin tụ huyết trùng và tả vịt;
2. Thuốc NPV, thuốc Bt, thuốc *Bauveria* trừ các loại sâu;

3. Phân bón vi sinh vật;
4. Chế phẩm vi sinh trong công nghiệp;
5. Kit chuẩn đoán bệnh cây trồng và kit chuẩn đoán bệnh vật nuôi. Tổng cộng 9 dự án.

Nhóm công nghệ sản xuất sản phẩm phục vụ bảo vệ sức khỏe con người bao gồm:

1. Vacxin.
2. Sản xuất dược chất;
3. Dịch truyền và các sản phẩm từ máu.

4. Giai đoạn từ 2006 đến năm 2010

Giai đoạn tới năm 2010 nhằm vào triển khai đồng bộ các công nghệ thuộc 4 lĩnh vực chính bao gồm:

1. CNSH nông nghiệp;
2. CNSH y dược học;
3. CNSH công nghiệp;
4. CNSH môi trường;

Phấn đấu từng bước xây dựng ở nước ta một ngành công nghệ sinh học phát triển đạt *hiệu quả cao về kinh tế, xã hội và môi trường.*

Số lượng Dự án giai đoạn 2 không chỉ nhằm vào sự hỗ trợ của nhà nước mà sẽ bước đầu khai thác nguồn đầu tư của các doanh nghiệp.

P.4

HỢP TÁC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC CỦA CÁC NƯỚC ASEAN

Lê Trần Bình

ĐIỀU PHỐI VIÊN QUỐC GIA TIỂU BAN CÔNG NGHỆ SINH HỌC CỦA ASEAN

I. TIỂU BAN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (SCB) THUỘC ỦY BAN KHOA HỌC CÔNG NGHỆ (COST) CỦA ASEAN

Tiểu ban Công nghệ sinh học (SCB) là một trong 8 tiểu ban :

1. KH&CN Vật liệu;
2. Vi điện tử & Tin học;
3. Khoa học biển;
4. KH&CNL thực phẩm;
5. Năng lượng không truyền thống;
6. Khí tượng & Địa vật lý;
7. KH&CN Cơ sở hạ tầng và Phát triển tài nguyên] thuộc Ủy ban Khoa học và Công nghệ (COST) của ASEAN.

Trưởng tiểu ban SCB nhiệm kỳ đến phiên họp 20 tại Yangon, Myanma là GS. Abdul Latif Ibrahim, MOSTE, Malaysia. Hiện nay trưởng tiểu ban SCB là Dr. Reynaldo de la Cruz, BIOTECH, Philippines. Cho đến 15 tháng 6 năm 1999 PGS Nguyễn Văn Uyển, Viện Sinh học Nhiệt đới, TP Hồ Chí Minh đảm nhận trách nhiệm Điều phối viên Việt Nam trong SCB. Hiện nay nhiệm vụ này được chuyển giao cho PGS. Lê Trần Bình, Viện Công nghệ Sinh học, Hà Nội. Hoạt động chủ yếu của SCB là:

1. Chuẩn bị báo cáo cho các kỳ họp của COST;
2. Góp ý, xem xét và điều phối (bao gồm giới thiệu các cơ quan, các chủ dự án của quốc gia tham gia thực hiện) các dự án hợp tác trên lĩnh vực công nghệ sinh học.

II. PHƯƠNG HƯỚNG ƯU TIÊN VÀ NGUYÊN TẮC HỢP TÁC

Kế hoạch hành động của SCB dựa trên các Văn bản định hướng của ASEAN như:

1. Chương trình hành động Hà Nội, 12/1998: Tầm nhìn 2020;
2. Kế hoạch hành động KH&CN của ASEAN, 1994;
3. Chương trình ngắn hạn (1996-2000)

trong đó ưu tiên 3 hướng chính :

- Sản phẩm lương thực, nông nghiệp và lâm nghiệp;
- Phát triển nghiên cứu khoa học công nghệ;
- Môi trường.

Riêng đối với SCB có 5 nội dung chính được chọn ưu tiên là:

1. Phát triển thuốc chữa bệnh, kit chẩn đoán và vaccines;
2. Cải tiến và sản xuất vật liệu sinh học cho nông nghiệp và công nghiệp;
3. Ứng dụng công nghệ sinh học nhằm cải thiện chất lượng và sản lượng cây trồng vật nuôi và các sản phẩm của chúng;
4. Thiết kế qui mô pilot và điều khiển bằng vi tính vì tính vi tính các bình phản ứng sinh học;
5. Bảo vệ đa dạng sinh học và môi trường.

Trong giai đoạn 1996-2000 ASEAN ưu tiên các lĩnh vực sau:

1. Cây thực phẩm và cây làm vườn;
2. Kiểm soát chất thải;
3. Chế biến sản phẩm tự nhiên;
4. Chẩn đoán y tế.

Về tài chính có các nguồn sau:

1. Quỹ hợp tác song phương do Quốc gia đối thoại là những quốc gia có tiềm lực KHCN và kinh tế mạnh thoả thuận với ASEAN theo chương trình hợp tác KHCN;
2. Tự chịu kinh phí: Do kinh phí từ bên ngoài hạn chế nên phương thức hợp tác trên nguyên tắc phần nước nào nước ấy chịu kinh phí sẽ được coi là một phương thức chính trong hợp tác KHCN của ASEAN;
3. Các tổ chức phi chính phủ khác như WMO, UNESCO hoặc Quỹ Crawford của australia.

Trình tự xét duyệt một dự án được tiến hành theo các bước như sau:

1. Đề xuất ý tưởng dự án;
2. Ban thư ký ASEAN xây dựng dự thảo tóm tắt đề án;
3. Văn phòng đánh giá ;
4. Hội đồng thẩm định;
5. Sửa chữa dự án tóm tắt ;
6. Ủy ban ASEAN xem xét;
7. Duyệt dự án;
8. Xác định nguồn kinh phí;
9. Xây dựng văn bản dự án đầy đủ;

10. Văn bản dự án đầy đủ;
11. Thăm định qua Hội đồng;
12. Ủy ban ASEAN duyệt;
13. Ủy ban thường trực ASEAN duyệt;
14. Quyết định chính thức cấp kinh phí và (15) Tiến hành thực hiện dự án.

III. CÁC DỰ ÁN ĐANG XEM XÉT VÀ TRIỂN KHAI

1. Sáng kiến Singapore nhằm hài hoà hoá bản hướng dẫn về sinh vật chuyển gen trong nông nghiệp - Dự án Niềm tin của công chúng đối với sinh vật chuyển gene GMOs

Sinh vật chuyển gen bao gồm giống cây trồng, giống vật nuôi và các chủng giống vi sinh vật nông nghiệp được biến đổi di truyền đang là một thực thể không thể bỏ qua ở mọi quốc gia. Việc bàn bạc thống nhất và làm cho các qui định khác nhau mang tính quốc gia trở nên hài hoà có tính khu vực đang là một nhu cầu và cũng là một thách thức đối với sự chênh lệch trong phát triển giữa các quốc gia. Sáng kiến của Singapore được ASEAN chấp thuận và sau nhiều lần bàn bạc đã trình được Văn bản hướng dẫn và Qui trình đánh giá, xét duyệt và cấp giấy phép lưu hành GMOs để các nước ASEAN xét duyệt.

Trên cơ sở thành công này Singapore đang hình thành một dự án mới lấy tên là Niềm tin của công chúng đối với sinh vật chuyển gene GMOs.

2. Dự án ASEAN- Ấn Độ

Dự án Hợp tác nghiên cứu về công nghệ sinh học giữa Ấn Độ và ASEAN trên các nội dung sau:

1. Công nghệ sinh học thực vật, nuôi cấy mô nhằm cải tiến giống cây trồng và sử dụng có hiệu quả tài nguyên sinh học;
2. Cây chuyển phôi động vật tập trung trên đối tượng là giống bò thịt và bò sữa;
3. Khía cạnh pháp lý cần được giải quyết là vấn đề Quyền tác giả của các công nghệ và vật liệu làm giống trước và sau quá trình cải biến;
4. Gắn đây phía Ấn Độ đề xuất thêm nội dung Công nghệ thông tin sinh học, tiến tới hợp nhất các nội dung (1), (2) và (4) thành Chương trình Hợp tác ASEAN-Ấn Độ về An ninh lương thực. Dự án Hợp tác ASEAN- Ấn Độ đang được hoàn thiện những bước cuối của giai đoạn xét duyệt và sẽ được triển khai thực hiện đầu năm 2000. Việt nam sẽ tham gia cả hai nội dung công nghệ sinh học thực vật và công nghệ cấy chuyển phôi động vật.

3. Dự án ASEAN- Trung quốc: Hội thảo về cây chuyển gene

Mục đích chính của hội thảo này là phía Trung Quốc sẽ giới thiệu với các học viên ASEAN về thành tựu giống cây trồng chuyển gene, đặc biệt chú trọng khía cạnh an toàn sinh học khi tiến hành thử nghiệm đồng ruộng. Dự kiến sẽ tiến hành vào tháng 5 năm 2000, mỗi nước ASEAN sẽ cử 2 học viên tham gia.

4. Dự án ASEAN- Hàn quốc

Hàn Quốc đã tiến hành triển khai dự án về Bản đồ Công nghệ sinh học của các nước ASEAN có sự hỗ trợ tài chính của ESCAP. Hiện nay dự án đang trong giai đoạn hoàn thiện và chuyển sang giai đoạn 2 là dự án Hợp tác Nghiên cứu về Đa dạng sinh học. Sắp tới Trưởng tiểu ban SCB của ASEAN dựa trên ý kiến của các đại diện thành viên sẽ trình bản dự thảo đề án trên để Hàn Quốc và SCB xem xét góp ý.

5. Hợp tác ASEAN- New Zealand: An toàn sinh vật chuyển gene

Dự án đang trong giai đoạn 1 là tiến hành hội thảo. Các nước ASEAN nhất trí chọn chủ đề Cây chuyển gen để tiến hành hội thảo, nhưng phía New Zealand khước từ. Chủ đề mới được lựa chọn sẽ là An toàn sinh học hoặc Cải tiến giống cây trồng. Trưởng tiểu ban SCB sẽ dựa trên ý kiến của các nước thành viên để chọn và trình một chủ đề thích hợp cho Hội thảo dự kiến sẽ tổ chức đầu năm 2000.

6. Dự án ASEAN-UNESCO: Chiến lược công nghệ sinh học phát triển chế phẩm đấu tranh sinh học mới để chống sâu và bệnh ở châu Á

UNESCO đã họp chuyên gia của các nước ASEAN và New Zealand để soạn thảo văn bản dự án về Chiến lược công nghệ sinh học phát triển chế phẩm đấu tranh sinh học mới để chống sâu và bệnh ở châu á. Tại phiên họp thứ 21 của SCB hội nghị nhất trí đánh giá đây là dự án có triển vọng, nhưng UNESCO thông qua chuyên gia New Zealand và chuyên gia các nước thành viên sẽ hoàn thiện Văn bản dự án để trình SCB xem xét trong phiên họp tới.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Từ khi nhập hội ASEAN Việt Nam đã tham gia tích cực vào các hoạt động của tiểu ban công nghệ sinh học và không bỏ lỡ cơ hội để tham gia các đề án mà nước ta có nhu cầu, có tiềm lực cán bộ. Tuy nhiên, do nguồn kinh phí khá hạn hẹp và khả năng đầu tư của các nước ASEAN cũng hạn chế và quy chế hoạt động của SCB phần nhiều còn dừng ở mức hội nghị, hội thảo và xây dựng dự án. Cần có những thay đổi về cách thức xây dựng quỹ khoa học công nghệ của ASEAN thì mới đưa hoạt động hợp tác KH-CN trên các lĩnh vực, trong đó có công nghệ sinh học trở nên có hiệu quả hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Report of the 20th meeting of the ASEAN Sub-Committee on Biotechnology, May 17, Yangon Myanmar
2. Proceedings ASEAN-Korea Workshop on the formation of a Biotechnology Atlas, August 30 – September 4, 1999, Taejon, Korea
2. Report of the 21st Meeting of the ASEAN Sub Committee on Biotechnology (SCB), October 25-26, 1999, Singapore

ASEAN COLLABORATION ON BIOTECHNOLOGY

Le Tran Binh

SUMMARY

The priorities and guideline for collaboration on biotechnology between the ASEAN member countries or with the Dialogue partners are presented. All the ongoing projects of collaboration activities on biotechnology of ASEAN member countries coordinated by the ASEAN Sub-Committee on Biotechnology is also listed as information for research institutions which are interesting in participation or development of collaboration projects.

MỘT VÀI THÀNH TỰU VỀ CÔNG NGHỆ LÊN MEN VÀ ENZYM

Ngô Tiến Hiền*

VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

Trong những năm gần đây, công nghệ lên men (CNLM) và công nghệ enzym (CNE) đã đạt được những kết quả đáng kể, góp phần nâng cao giá trị nông sản thực phẩm chế biến, hạ giá thành, tạo ra sản phẩm mới có sức cạnh tranh trên thị trường đáp ứng yêu cầu sản xuất nông nghiệp, công nghiệp, môi trường và y sinh học, đem lại kết quả khoa học công nghệ và kinh tế xã hội đáng kể.

I. VÀI NÉT VỀ CÔNG NGHỆ LÊN MEN VÀ ENZYM NƯỚC NGOÀI

Để đánh giá được rõ hơn thực trạng CNLM và CNE nước ta, chúng ta hãy nhìn ra thế giới bên ngoài về lĩnh vực này.

Ngày nay nhiều sản phẩm lên men đã sản xuất bằng VSV chuyển gen, có qui mô công nghiệp, bằng các công nghệ lên men liên tục, cố định tế bào, cố định enzym và sản xuất tự động hóa ở trình độ cao. Sau đây là một vài con số về CNLM và CNE của thế giới:

- Sản lượng cồn đạt trên 9 tỷ lít/năm, giá 0,5 USD/1. Một phần cồn được dùng làm nhiên liệu (gasohol) ở Mỹ và Brazil.
- Sản lượng bia đạt 122 tỷ lít/1994 gấp 10 lần sản lượng cồn. Mỹ đứng hàng đầu về sản lượng 23,7 tỷ lít / năm. Đan Mạch đạt mức bình quân cao nhất 182 lít/người/năm, Đức có nhiều nhà máy bia nhất - 12.000 cơ sở.
- Sản lượng mì chính thế giới đạt 350.000 tấn/năm.
- Đã có trên 50 axit hữu cơ đã được sản xuất công nghiệp bằng công nghệ vi sinh vật, lên men. Sản lượng axit xitric 350.000 tấn/năm. Sản lượng axit axetic 160.000 tấn/năm, lactic 30.000 tấn/năm, axit gluconic 45.000 tấn/năm.
- Các Vitamin cũng được sản xuất bằng công nghệ vi sinh vật. Trong đó vitamin B12 đạt 10.000 tấn/năm, vitamin A đạt 2.500 tấn/năm, vitamin E đạt 6.800 tấn/năm, vitamin C đạt 10.000 tấn/năm. Các vitamin B khác từ 2.000 - 8.000 tấn/năm.

* Xin chân thành cảm ơn các nhà Khoa học đã cung cấp tư liệu và đóng góp ý kiến cho bản báo cáo này: GS. Phạm Thị Trân Châu; PGS.PTS. Lý Kim Bảng; GS. Lê Doãn Diên; PGS.PTS. Đỗ Thị Giang; PTS. Trương Nam Hải; PGS.PTS. Nguyễn Đức Lương; GS. Lê Văn Nhung; PTS. Phạm Văn Toàn; TS. Lê Văn Tố và các tác giả khác có công trình tham gia báo cáo tại hội thảo này.

- Sinh khối VSV có 30 - 70% protein, trong đó số axit amin không thay thế không thua kém protein động vật. Sản lượng sinh khối VSV thế giới khoảng 2 triệu tấn/năm.
- Trong tổng số 2.000 loại enzyme đã được phát hiện, chỉ có khoảng vài trăm loại đã được sản xuất quy mô công nghiệp chủ yếu thuộc nhóm amylaza, proteaza, lipaza ... Một số khác được sản xuất với quy mô nhỏ và nhiều enzyme đặc hiệu được dùng để cắt, nối, chuyển gen trong kỹ thuật gen.

Tóm lại: CNLM và NGE nước ngoài có một số thế mạnh sau đây:

- Đã sử dụng các vi sinh vật chuyển gen có năng suất cao.
- Đã đạt trình độ cao về thiết bị lên men liên tục, tự động hóa, ứng dụng phần mềm của công nghệ thông tin.
- Sản phẩm có chất lượng cao đáp ứng các yêu cầu kinh tế kỹ thuật của sản xuất, có những biện pháp đảm bảo an toàn sinh học, an toàn thực phẩm.
- Đã tạo ra các sản phẩm mới, có giá trị kinh tế cao, có thế mạnh cạnh tranh trong thị trường toàn cầu và khu vực.

II. MỘT VÀI THÀNH TỰU VỀ CÔNG NGHỆ LÊN MEN VÀ CÔNG NGHỆ ENZYM NƯỚC TA

1. Công nghệ lên men và enzym phục vụ nông nghiệp

Trong những năm gần đây, trên thị trường đã xuất hiện các sản phẩm mới phục vụ nông nghiệp. Đó là các chế phẩm VSV có khả năng phân giải các chất hữu cơ, thay thế phân hóa học, cải tạo đất trồng và tăng năng suất cây trồng, vật nuôi.

- Chế phẩm VSV Micromix đã được sử dụng để phân hủy, xử lý rác thải, đã rút ngắn chu kỳ từ 60 ngày xuống 20 ngày với chi phí 300.000 đồng/150 tấn rác thải tạo ra phân bón vi sinh hữu cơ. Chế phẩm Micromix còn được dùng để xử lý vỏ cà phê làm phân hữu cơ bằng công nghệ vi sinh.
- Chế phẩm phân hữu cơ Komix và phân sinh học tổng hợp Biomix có khả năng thay thế 50 phân hóa học tăng năng suất lúa 19,6%, ngô 11%, chè 26%, lạc 24%.
- Một số thuốc thú y, vacin trong phòng trừ bệnh dịch gia súc, gia cầm đáp ứng nhu cầu chăn nuôi của nước ta. Chất kích thích tố sinh trưởng động vật cũng được sản xuất, tiêu dùng trong nước và xuất khẩu sang Hồng Kông.
- Sản phẩm thức ăn gia súc thức ăn nuôi tôm cá đã được nghiên cứu và sản xuất công nghiệp từ phế phụ phẩm công nghiệp đường ở nhà máy đường Hiệp Hòa, Phan Rang, Khánh Hòa, và nhà máy đường Thanh Hóa.
- Thuốc trừ sâu sinh học BT, thuốc diệt muỗi BTi, BS dạng lỏng và bột đã được sản xuất từ vi khuẩn *B.thuringiensis* đã được nhiều cơ quan khoa học công nghệ quan tâm nghiên cứu, sản phẩm đã được sản xuất ở qui mô 1000l/mẻ. BT lỏng được dùng để diệt côn trùng bộ cánh vẩy và cánh cứng. BT bột dùng phòng trừ

côn trùng cho qui mô 500 tấn. Chế phẩm BTi 1884, BTi Vn6 có tác dụng diệt bọ gây muỗi sau 1h ở nồng độ 100mg/l. Chúng BT 12 - 3 được dùng để sản xuất chế phẩm dạng sữa với 8.000 đơn vị/ml và dạng bột 16.000 đv/mg. Chúng BS 2362 có khả năng sinh tinh thể độc protein có tác dụng diệt trừ muỗi gây bệnh sốt rét *Culex* và *Anopheles*.

- Chế phẩm iturin A được sản xuất từ *B.subtilis* có tác dụng diệt nấm sinh độc tố và nấm hại cây trồng.
- Chế phẩm MA đã là sản phẩm được chấp nhận trên thị trường, có tên trong danh mục thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam có tác dụng diệt mối hại cây trồng.
- Chúng *Exserohilum* 85-1 có khả năng phòng trừ cỏ ruộng lúa và không gây hại cho cây lúa.
- Gần đây nhất có một chế phẩm enzyme mới ra đời phục vụ nông nghiệp. Đó là E2001. E2001 đã được thử nghiệm ở Việt Nam. Theo báo cáo của chủ nhiệm đề tài mới được nghiệm thu (tháng 10/1999), E2001 đã làm tăng độ phì nhiêu của đất, tăng năng suất cây trồng: 10% cho lúa, ngô, đậu tương, lạc, chè, cà phê, nhãn, mía và từ 30 - 50% cho khoai tây và bắp cải.

2. Công nghệ lên men và enzym trong công nghiệp

- Nhà máy Bia Sài Gòn thuộc Tổng Công ty Rượu, Bia, Nước Giải khát đã nghiên cứu và ứng dụng thành công enzym proteaza có tên thương mại là Maturex của hãng NOVO-Đan Mạch trong sản xuất bia, da rút ngắn chu kỳ lên men, giảm hàm lượng Diacetyl trong bia, đem lại kết quả lớn trong sản xuất và được Bộ Công nghiệp khen thưởng sáng kiến cho cán bộ, CNV Nhà máy bia Sài Gòn 2,4 tỷ đồng. Hiện nay có vài chục cơ sở đã sử dụng các enzym Termamyl, Fungamyl, AMG, trong dịch hóa, đường hóa nguyên liệu, enzym proteaza Maturex trong quá trình lên men, pectinex trong sản xuất nước quả tươi và rượu vang.
- Các enzym thuộc nhóm amylaza như: Termamyl, Fungamyl, AMG còn được sử dụng rộng rãi trong công nghệ sản xuất đường bột, sản xuất malto-dextrin, nha glucoza, siro glucoza-fructoza ở quy mô công nghiệp tại Công ty Bánh kẹo Hải Hà (cơ sở Việt Trì) sản lượng 1500 tấn/năm 1999, Công ty Minh Dương (Sơn Tây) đạt sản lượng 20 tấn sản phẩm/ngày và các cơ sở sản xuất đường nha glucoza bằng công nghệ enzym như: Công ty 19/5 Sơn Tây, Nhà máy Đường Quảng Ngãi, Nhà máy Đường Lam Sơn (Thanh Hóa), Công ty ong Nam Hà ... Với sản phẩm hàng hóa trên 10.000 tấn/năm 1999, đã khẳng định tính khả thi của công nghệ.
- Enzym và một số chủng giống *Lactobacillus* nhập ngoại được ứng dụng trong công nghệ sữa đã nâng cao chất lượng và đa dạng hóa sản phẩm. Một số sản phẩm lên men lactic như nấm, dưa chuột, cà, tôm chua ... với chất lượng cao đã trở thành hàng hóa hấp dẫn thị trường trong nước và xuất khẩu.
- Quá trình sản xuất nước mắm ngắn ngày bằng công nghệ enzym proteaza. Kết quả là: chu trình từ 6 - 8 tháng rút ngắn còn 2 tháng, độ đậm nước mắm tăng từ

8,3% lên 20,8%, hiệu suất thu hồi đạm tăng gấp 2 lần, tiêu hao nguyên liệu giảm 13%.

Trong hội nghị này chúng ta sẽ được nghe một số báo cáo khác về CNLM và CNE. Sau đây là một số kết quả đạt được.

- Công nghệ bảo quản quả tươi bằng màng sinh học vi mỏng, phối hợp hóa chất cho phép, và kho lạnh đang triển khai có kết quả.
- Công nghệ cố định tế bào trong lên men rượu sử dụng chủng *Saccharomyces cerevisiae* TVA trong lên men bia đã và đang được nghiên cứu triển khai đạt được kết quả khả quan mở ra triển vọng lên men liên tục quy mô công nghiệp.
- Việc lựa chọn và sử dụng *Leuconostoc oenos* LF_{01} với thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy tối ưu đã làm tăng hiệu suất phân giải axit DL-malic nhằm nâng cao chất lượng rượu vang và champagne.
- Nghiên cứu chủng nấm men *Sac. Cerevisiae* H3 trong lên men bia ở nồng độ cao từ 11% lên 18% mở ra triển vọng ứng dụng sản xuất bia ở nồng độ cao.
- Một số nghiên cứu khác ứng dụng CNLM và CNE trong chế biến thực phẩm gần đây cũng đạt được những kết quả khả quan. Đó là nghiên cứu phân lập nấm men phân giải tinh bột sống, nấm men bánh mì, *Micromonospora* sinh tổng hợp kháng sinh, vi sinh vật phân hủy dầu mỏ, nấm sợi sinh tổng hợp xellulaza. Từ 200 chủng nấm men lên men rượu vang dầu đã lựa chọn một số chủng sinh killer toxin là nguồn gen diệt vi khuẩn có thể chuyển vào tế bào nấm men lên men rượu bia để chống nhiễm trùng trong quá trình sản xuất. Từ bánh men cổ truyền đã tuyển chọn hệ VSV, từ đó đổi mới, phát triển công nghệ cổ truyền sản xuất bánh men với quy mô gia đình có sản lượng cao với nguyên liệu 5 tấn bột gạo/ngày.
- Các chế phẩm *PROZIMA* (dùng thủy phân thịt, cá) và *PROZIMABO* (dùng điều trị bông) là các chế phẩm enzym có nguồn gốc thực vật. Đó cũng là sản phẩm của công trình nghiên cứu cơ bản về proteinaza và protein ức chế proteinaza (PPI). Hạt gạo là nguyên liệu giàu PPI. Chế phẩm mới chứa PPI là *Monosertatin* có tác dụng trừ sâu hại rau và ức chế sinh trưởng vi khuẩn gây bệnh và nhiễm trong sản phẩm thực phẩm như *Pseudomonas*, *Streptococcus*.

Bằng phương pháp hóa miễn dịch, phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch, phương pháp ELISA, trên cơ sở sử dụng kits chuẩn đoán, các kháng thể đơn dòng và đa dòng đặc hiệu để phát hiện nhanh, nhạy aflatoxin, dư lượng thuốc trừ sâu, chất bảo quản trong rau quả thực phẩm. Thời gian phân tích (bằng HPLC là 1 ngày) giảm xuống 1 giờ với độ chính xác cao: dưới 1ppb Chlorpyrifos thuốc trừ sâu, chỉ phí 30.000 đồng/ mẫu thử, được áp dụng rộng rãi tới quy mô gia đình, cửa hàng rau sạch.

3. Công nghệ lên men và enzym bảo vệ môi trường

Trong báo cáo này chúng tôi xin giới thiệu một vài thành tựu của hướng công nghệ này qua các báo cáo của hội nghị môi trường toàn quốc 5 - 6 tháng 8 năm 1990 tại Hà Nội.

- *Microphôt* cũng là một chế phẩm vi sinh phân hủy chất hữu cơ có tác dụng chống tắc, khử mùi hôi ở bể phốt, đạt 2 Huy chương vàng tại Hội chợ triển lãm toàn quốc, và dùng cho quy mô gia đình và tập thể.
- Nhiều Viện, Trường đã phân lập, lựa chọn chủng VSV, tạo ra hệ VSV mới có năng suất cao hơn trong quá trình xử lý nước thải và bã thải trong sinh hoạt và sản xuất công nghiệp đặc biệt là xử lý chất thải công nghiệp trong sản xuất đường mía bằng công nghệ vi sinh trên cơ sở lên men yếu khí, hiếu khí đã tạo ra bã thải và được tái sử dụng làm phân bón hữu cơ tổng hợp.
- Tảo *Chlorella spirulina* đã được nghiên cứu sử dụng trong công nghệ xử lý nước thải cho nhà máy chế biến thịt, đường.
- Chế phẩm vi sinh vật DW₉₇ làm tăng quá trình xử lý kỵ khí cặn bùn nước thải làng nghề chế biến bún, tăng khả năng tạo CH₄ gấp 4 lần.
- VSV nhóm DW phân hủy yếm khí chất thải sinh hoạt được áp dụng ở quần đảo Trường Sa.
- Trên môi trường bổ sung đạm nitrat, các chủng nấm đã tăng hiệu suất phân giải photphat, đã làm giàu đất trồng và năng suất cây trồng.
- Chủng *Candida tropicalis* HS10 và HS35 có khả năng phân hủy hydro cacbon xử lý ô nhiễm giàu mô.

III. VÀI SUY NGHĨ VỀ ĐỊNH HƯỚNG PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ LÊN MEN VÀ CÔNG NGHỆ ENZYM TRONG TƯƠNG LAI Ở NƯỚC TA

- Các hoạt động khoa học CNLM và CNE trước hết cần ưu tiên phục vụ phát triển nông nghiệp trong đó có công nghiệp chế biến nông sản thực phẩm, nhằm góp phần nâng cao giá trị sản phẩm chế biến, giảm tổn thất sau thu hoạch, bảo đảm vệ sinh và an toàn thực phẩm.
- Để có hiệu suất lên men cao và khả năng sinh tổng hợp enzym cao, cần thiết phải có các chủng giống VSV mới, kể cả chủng chuyển gen, biến đổi di truyền có hiệu suất lên men cao, có khả năng chống chịu, bảo đảm an toàn thực phẩm, bảo đảm cho sự phát triển nông nghiệp bền vững.
- Để có nguồn gen quý, có thể nhập chủng giống nguồn gen và cần phát triển các sưu tập giống vi sinh vật trong nước.
- Có 5 yếu tố M (Man, Material, Machine, Management and Marketting) có tính chất quyết định sự phát triển khoa học công nghệ và sản xuất phải kể đến là: yếu tố con người là quyết định; yếu tố thị trường là định hướng; yếu tố nguyên liệu, nhất là nông sản là sản phẩm của nông nghiệp, thực phẩm gắn liền với nhu cầu ngày càng cao của con người, có tính quyết định cho sự lựa chọn công nghệ; yếu tố máy móc, trang thiết bị để phục vụ và nâng cao trình độ công nghệ, sức cạnh tranh của sản phẩm; không có trang thiết bị hiện đại thì khó có thể có công nghệ cao, và yếu tố quản lý nhằm nâng cao hiệu quả nghiên cứu cũng như sản xuất và đổi mới tư duy và phương pháp tiếp cận với công nghệ cao, công nghệ mới.

P.6

MỘT SỐ THÀNH TỰU VÀ HƯỚNG PHÁT TRIỂN CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT CÓ TRIỂN VỌNG ỨNG DỤNG Ở NƯỚC TA

Đỗ Năng Vịnh**VIÊN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP**

Trong bài này chúng tôi tổng kết vắn tắt một số thành tựu và tiến bộ kỹ thuật mới của công nghệ tế bào có khả năng ứng dụng vào nghiên cứu và sản xuất ở nước ta.

I. CÁC QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ TẾ BÀO MỚI HỨA HẸN CUỘC CÁCH MẠNG TRONG LĨNH VỰC TẠO GIỐNG

1. Xây dựng hệ thống tái sinh hiệu quả cao phục vụ cho công nghệ gen và quy trình chọn dòng tế bào chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường

Thành tựu nổi bật trong lĩnh vực này là hệ thống tái sinh cây lúa từ nuôi cấy tế bào phôi hoá. Thông qua chuyển gen vào hệ thống tế bào có khả năng tái sinh cao này, vài nghìn dòng lúa chuyển gen với các tính trạng khác nhau đã nhận được. Các tác giả đã gọi quy trình công nghệ này là quy trình sản xuất cây lúa chuyển gen quy mô lớn (Chen et al, 1998).

Tại Việt nam, giống lúa mới DR2 do Viện Công nghệ Sinh học tạo ra bằng kỹ thuật chọn dòng tế bào đã trở thành sản phẩm giống cây trồng đầu tiên của công nghệ sinh học nước ta. Giống này đã được Bộ NN và PTNT công nhận giống quốc gia năm 1999.

2. Công nghệ đơn bội in vitro và quy trình tái sinh cây từ nuôi cấy in vitro các hạt phấn tách rời ở cây hoà thảo

Trung quốc là nước triển khai công nghệ đơn bội trong tạo giống quy mô lớn, ở tất cả các loài cây trồng và có định hướng chiến lược rõ ràng nhất. Trên một nghìn cơ sở nuôi cấy bao phấn đã hoạt động trên toàn quốc từ những năm 1970. Kết quả đã tạo ra trên 100 giống lúa mới trong một thời gian ngắn. Các giống lúa nước và lúa mì mới tạo được từ kỹ thuật đơn bội đã được mở rộng trong sản xuất trên diện tích vài triệu ha. Tại Triều Tiên kỹ thuật nuôi cấy bao phấn đã tạo ra 42 giống lúa mới (Jain et al, 1997; Sasson, 1993).

Viện Di truyền Nông nghiệp đã tạo được hàng trăm dòng thuần bằng nuôi cấy bao phấn hạt lai, trong đó có nhiều giống đang khảo nghiệm có tiềm năng năng suất và chất lượng cao. Khoảng 30 dòng bất dục đực nhân (TGMS) mới, một số dòng B tiềm năng nhụy cái cao đã tạo được và đang được thử khả năng phối hợp và sản xuất hạt lai. Kỹ

thuật đơn bội in vitro cũng đang được ứng dụng trong chọn giống ở Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long, Viện Công nghệ Sinh học, vv...

Thành tựu nuôi cấy mô hứa hẹn nhiều triển vọng đối với chọn tạo giống lúa là quy trình tái sinh cây lúa từ nuôi cấy hạt phấn tách rời ở cả hai dạng lúa nước Japonica và Indica do Raina và Irfan công bố gần đây (Raina and Irfan, 1998). Trên 500 phôi đã được tái sinh từ khoảng 80.000 hạt phấn nuôi cấy trong 1 đĩa petri đường kính 3,5 cm. Rất nhiều cây xanh đã được tái sinh từ hạt phấn. Đây là một tiến bộ kỹ thuật đặc biệt quan trọng ở cây ngũ cốc, có thể mở ra triển vọng mới trong chọn tạo giống lúa bằng kỹ thuật đơn bội và kỹ thuật gen. Theo lý thuyết, từ một cặp lúa lai F1 có thể tạo ra 4096 các kiểu gen đồng hợp tử khác nhau tái sinh từ hạt phấn in vitro (Vĩnh ĐN và Phải P, 1996). Kỹ thuật nuôi cấy hạt phấn tách rời hứa hẹn có thể tạo ra vô số các nguồn gen đa dạng cho chọn giống.

3. Thành công trong việc thụ tinh nhân tạo và nuôi cấy tế bào trứng, tế bào hợp tử, tế bào nội nhũ thành cây trong điều kiện in vitro

Quy trình thụ tinh kép ở thực vật lần đầu tiên đã được thực hiện in vitro và sự phát triển của các sản phẩm sau thụ tinh đã được quan sát thường xuyên dưới kính hiển vi. Tế bào trứng sau khi thụ tinh nhân tạo hoặc thụ tinh in vivo với nhân của tế bào hạt phấn đã tạo thành hợp tử $2n$ và có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh trong ống nghiệm. Tế bào trung tâm của túi phôi ($2n$ nhiễm sắc thể) sau khi thụ tinh với nhân của tế bào hạt phấn đã tái sinh thành nội nhũ tam bội ở các cây hoà thảo như lúa mì, lúa mạch, ngô và lúa nước (Kranz and Kumlehn, 1999, Zhang et al, 1999 in press). Những thành công này đang mở ra triển vọng mới trong tạo giống thông qua các thao tác di truyền dưới kính hiển vi và tạo giống tam bội ở cây trồng.

4. Tạo cây ăn quả không hạt và cây lâm nghiệp năng suất cao thông qua nuôi cấy nội nhũ tam bội

Một số thành công của hướng nghiên cứu này tổng kết ở bảng 1:

Bảng 1. Hướng tạo cây tam bội ở cây rừng và cây ăn quả

Cây trồng	Phương pháp nuôi cấy	Kết quả	Tài liệu tham khảo
Cây rừng: - <i>Acacia nilotica</i> Keo - <i>Populus tremuloides</i>	Nội nhũ hạt non	Cây tam bội có năng suất và chất lượng giấy tốt hơn.	L. Garg et al, 1996.
Cây ăn quả: Táo tây, cây có múi, cây Kiwi,...	Nuôi cấy nội nhũ non.	Cây tam bội không hạt	Bhojwani and Bratnagar, 1992.

II. CÁC THÀNH TỰU MỚI TRONG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO NHÂN NHANH GIỐNG CÂY TRỒNG

Kỹ thuật nuôi cấy mô đã được trên 600 công ty lớn trên thế giới áp dụng để nhân khoảng 500 triệu cây giống trong 1 năm ở 50.000 giống cây trồng khác nhau (Vasil, 1994). Dự kiến thị trường cây giống nhân bằng kỹ thuật cấy mô vào khoảng 15 tỷ USD năm và tốc độ tăng trưởng hàng năm của thị trường là vào khoảng 15 % (Govil and Gupta, 1997).

Công nghệ nuôi cấy mô phục vụ nhân giống cây trồng đã được triển khai trên 20 năm nay ở nước ta. Nhân giống thương mại quy mô lớn đã đạt được ở một số cây trồng như nhân nhanh giống chuối (nhân khoảng 2.0 triệu cây năm), nhân nhanh giống khoai tây sạch bệnh, nhân nhanh các giống mía mới nhập nội (trong vài năm đã tạo ra 5330 ha mía giống mới K84 - 200 từ một ngọn mía nhập nội), nhân nhanh các dòng bạch đàn chọn lọc và keo lai. Quy trình công nghệ nhân nhanh giống chuối và giống mía đã được Bộ NN và PTNT công nhận là kỹ thuật tiên bộ. Quy trình công nghệ nhân giống đã được nhiều viện, trường nghiên cứu hoàn thiện ở nhiều cây trồng khác nhau như dứa, dưa sồi, cà phê, tẻch, vông, các cây thuốc quý, các loài lan và cây hoa cây cảnh, tạo giống và nhân nhanh giống cây ăn quả sạch bệnh như cây có múi, đu đủ, dâu tây vv... Việc thương mại hoá các quy trình công nghệ trên đây là chìa khoá quan trọng để mở ra sự bùng nổ ứng dụng công nghiệp vi nhân giống ở nước ta mười năm tới.

Những thành tựu đạt được trên đây chủ yếu vẫn dựa vào các phương pháp nuôi cấy mô truyền thống trong đó cây hoàn chỉnh được tái sinh trong đĩa petri, ống nghiệm, bình tam giác có nút kín. Phương pháp truyền thống đã tỏ ra có nhiều hạn chế và không đủ đáp ứng các nhu cầu của sản xuất:

- Tốc độ sinh trưởng và hệ số nhân thấp do những hạn chế về dinh dưỡng, đường khí, độ ẩm và các yếu tố lý hoá học khác.
- Quy mô nhân giống nhỏ và tốn kém nhân lực, kết quả giá thành cây còn cao (Vasil, 1994).

Do vậy đã có rất nhiều nghiên cứu nhằm tăng cường hệ số nhân, nâng cao chất lượng cây giống và tự động hoá quá trình nhân giống vô tính thông qua sử dụng các phương thức nhân giống mới, các chất hoạt tính sinh học mới, các thiết bị mới tương tự như các nồi lên men vi sinh hay còn gọi là Bioreactors.

Trước những nhu cầu mới của sản xuất ở nước ta như: chương trình 5 triệu ha rừng, chương trình mở rộng diện tích và năng suất các điền trang cà phê, điều, cây ăn quả xuất khẩu, vv... Chúng tôi thấy cần xem xét để nghiên cứu ứng dụng các công nghệ mới dưới đây:

1. Những cải thiện quan trọng trong công nghệ nhân giống bằng cấy mô

- 1.1. Các quy trình công nghệ mới, hiệu quả hơn đã xuất hiện gắn liền với việc chế tạo các dụng cụ và thiết bị nuôi cấy mới, cải thiện điều kiện môi trường. Nhờ vậy, hệ số nhân và chất lượng cây giống *in vitro* đã tăng nhanh đáng kể:

- Tăng cường trao đổi không khí giữa bình nuôi và môi trường ngoài:
 - Tăng hàm lượng CO₂ và cường độ chiếu sáng ở mức tối ưu trong bình nuôi nhằm tăng cường quang hợp của cây *in vitro* (Quynh and Kozai, 1998).
 - Giảm hàm lượng etylen và độc tố. Các chất này thường được tích lũy trong bình nuôi kín dẫn đến ức chế sinh trưởng của tế bào và cây *in vitro* (De Proft et al, 1985).
 - Giảm hàm lượng oxy trong bình nuôi xuống khoảng 10% (Tanaka et al, 1991).
- Giảm độ ẩm tương đối trong bình nuôi từ 95%-100% xuống khoảng 85-90% (Tanaka et al, 1992).
- Tối ưu hoá cường độ và thời gian chiếu sáng, cũng như quang phổ ánh sáng (Fujiwara and Kozai 1995).

Việc cải thiện chế độ đường khí trong bình nuôi có thể đạt được thông qua sử dụng màng lọc thông khí (millipore filter), hoặc bình nuôi cấy được chế tạo bằng vật liệu thoáng khí kết hợp với tăng áp lực khí CO₂ trong phòng nuôi, hoặc bằng bơm khí chủ động vào bình nuôi (Fujiwara and Kozai 1995; Quynh and Kozai, 1998). Phương pháp nuôi cấy thoáng khí đơn giản và dễ áp dụng nhất là thay nắp bình nuôi bằng màng thông khí lỗ nhỏ (0.02 μ m). Lai và cộng sự đã sử dụng loại màng này làm nắp và quan sát thấy tính ưu việt của nuôi cấy thoáng khí. Chỉ sau 2 tuần nuôi cấy số lượng chồi đủ để có kích thước lớn hơn hoặc bằng 0,5 cm đã tăng lên 41 %, số lượng lá tăng lên 17% so với nuôi cấy trong bình có nút kín. Không thấy có hiện tượng tích lũy etylen trong bình nuôi thoáng khí (Lai et al, 1998).

1.2. Sử dụng ánh sáng tự nhiên thay thế chiếu sáng nhân tạo chẳng những giảm chi phí năng lượng mà còn làm tăng hệ số nhân giống và chất lượng cây giống (Kodym and Zapata-Arias, 1999).

1.3. Phương pháp nuôi cấy thấm dung dịch lỏng của môi trường theo chu kỳ làm tăng đáng kể hệ số nhân giống và chất lượng cây giống cây mô.

Phương pháp dựa trên cơ sở bơm dung dịch lỏng thấm ướt mô nuôi cấy kết hợp thông khí và sau đó lại rút dung dịch đi theo chu kỳ (Alvard et al, 1993).

1.4. Kích thích quá trình ra hoa trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

Ví dụ, tre là cây thân gỗ quan trọng ở châu á với trên 500 loài tre khác nhau. Mặc dù vậy tre hầu như chỉ ra hoa ở độ tuổi từ 12-120 tuổi. Các nhà khoa học Ấn Độ và Đài Loan đã thành công trong việc làm cây tre cấy mô ra hoa kết hạt bình thường trong ống nghiệm chỉ sau 3 đến 6 tháng nuôi cấy. Thành công này mở ra một cuộc cách mạng trong chọn giống và nhân giống tre lại ngay trong ống nghiệm (Anonymous 1992; Nadgauda et al, 1997; Lin and Chang, 1998). Nhân giống tre quy mô lớn đã được triển khai ở nhiều công ty nước ngoài (Govil and Gupta 1997; Saxena and Dhawan 1999).

1.5. Ứng dụng các chất có hoạt tính sinh học mới:

Thidiazuron là một chất có hoạt tính tương tự với nhóm cytokinin, nhưng có tác dụng cực mạnh đối với một số cây thân gỗ khó nhân giống. Kết quả ứng dụng chất này đã dẫn đến khả năng nhân giống nhanh đối với hàng loạt cây lâm nghiệp và cây thân gỗ ăn quả. Việc phát hiện và ứng dụng thidiazuron có thể tạo ra một cuộc cách mạng mới trong nhân giống cây thân gỗ (Huetteman and Preece, 1993).

2. Nhân giống hàng loạt bằng Bioreactor và hạt nhân tạo là thành tựu nổi bật của công nghệ tế bào trong công nghiệp nhân giống

Bảng 2. Một số kết quả sử dụng Bioreactor nhân giống công nghiệp ở một số cây trồng

Loại cây	Phương pháp nuôi cấy	Kết quả	Tài liệu tham khảo
Khoai tây	8 lít Bioreactor	Sản xuất nhân giống hàng loạt chồi, sau đó là củ bi	Akita and Takayama 1988
Cà rốt	8 lít Bioreactor	Tạo được 50 vạn phôi vô tính, 40.000 hạt nhân tạo, 52% số hạt nhân tạo đã nảy mầm thành cây trong 1 tháng.	Onishi et al 1994
Cỏ ngọt <i>Stevia rebaudiana</i>	500lít Bioreactor chứa 300 lít môi trường.	Thu được 64,6 kg chồi tươi từ 460 g sinh khối ban đầu. Sản xuất 1 lần 200.000 cây đưa ra đất.	Takayama and Akita 1994
Cây lá nhọn (Conifers)	Phôi vô tính có các chất dự trữ như chất béo và protein tương tự như phôi hạt bình thường	Phôi vô tính sau khi làm khô có thể bảo quản được lâu dài và cho nảy mầm vào mùa xuân - Cây tái sinh từ phôi vô tính với độ đồng đều cao, được sản xuất hàng loạt phục vụ cho trồng rừng	Attree and Fowke ,1993
Cây dứa	10lít Bioreactor	Nhân giống dứa quy mô lớn đáp ứng nhu cầu 15 triệu cây/năm	Anomynous 1995.
Cà phê <i>C. canephora arabusta</i>	Bioreactor	- Tạo được 600.000 phôi vô tính với tỷ lệ phôi tái sinh thành cây là 47 % từ 1 gram sinh khối ban đầu.	Ducos et al 1993

Hơn 200 loài cây trồng đã được nhân giống bằng phôi vô tính (Nishimura et al,1993). Phôi vô tính sau khi làm khô có thể bảo quản được lâu dài và cho nảy mầm vào mùa xuân (Attree and Fowke ,1993). Từ phôi vô tính có thể tạo hạt nhân tạo. Hạt nhân tạo thu được có thể gieo bằng máy gieo hạt. Hai nhà khoa học Nhật bản Takayama và Misawa là những người đầu tiên thông báo sử dụng bioreactor vào nhân

giống thực vật. Kỹ thuật nhân giống này sau đó đã được áp dụng cho hàng loạt cây trồng khác như nhân nhanh *Lilium*, *Dioscorea*, *Asparagus*, *Amorphophalus*, *Colocasia*, *Hippeastrum*, *Gladiolus*, *Anthurium*, *Dieffenbachia*, *Spathiphyllum*, *Pinellia* trong các bioreactor dung tích từ 10- 20 lít. Ngoài phôi vô tính, có thể nhân nhanh chồi, củ, thân ngầm v.v... bằng bioreactor (Takayama and Akita, 1994). Bảng 2 tổng kết một số thành tựu nhân giống bằng bioreactor như nhân giống củ ngọt với công suất nhân giống khổng lồ, khoảng 200.000 chồi cây trong một Bioreactor 500 lít (Takayama and Akita, 1994). Nhân giống cà phê tạo được 600.000 phôi vô tính từ 1 gram sinh khối ban đầu với tỷ lệ tái sinh cây từ phôi vô tính đạt 47% (Ducos et al, 1993).

Có thể nói rằng phương pháp nhân giống này có khả năng tạo ra số lượng cây giống nhiều vô hạn từ một cây ban đầu tùy theo nhu cầu của thực tiễn trong tương lai.

III. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Nước ta là một nước nông nghiệp với gần 80 % dân số ở nông thôn. Kinh tế lâm nghiệp, các điền trang cây công nghiệp và cây ăn quả đang đòi hỏi hàng tỷ cây con giống có chất lượng cao, đặc biệt là chương trình 5 triệu ha rừng.

Công nghệ nuôi cấy mô và tế bào đã được hình thành và phát triển ở Việt Nam trên 20 năm nay. Một số quy trình công nghệ đã được áp dụng vào sản xuất lớn. Mặc dù vậy, quá trình nghiên cứu mở rộng, sản xuất thử dạng pilot và thương mại hoá công nghệ cần được đẩy mạnh trong 10 năm tới. Mặt khác, các tiến bộ kỹ thuật nhân giống của ta hầu hết mới dừng lại ở nuôi cấy mô truyền thống với việc sử dụng bình thủy tinh nút kín và ánh sáng nhân tạo. Các cải tiến kỹ thuật mới trong lĩnh vực cấy mô chúng tôi đã phân tích trên đây hầu như chưa được nghiên cứu và ứng dụng ở nước ta. Chúng tôi cho rằng công nghệ tế bào thực vật nước ta cần sớm tiếp cận với các công nghệ mới này trong giai đoạn tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akita M and Takayama S, 1988.

Mass propagation of potato tubers using jar fermenter techniques. In: Acta. Hort. 230, 55

2. Alvard D, Cote F, and Teisson C, 1993.

Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. In: Plant Cell, tissue and organ culture 32: 55-60

3. Anonymous, 1992.

Making bamboo bloom : a revolution in a test tube. In: Genetic engineering and Bio-technology monitor, 1992

4. Anonymous, 1995.

Tissue culture products. In: Genetic engineering and Biotechnology monitor. Vol. 2, No. 3.

5. Attree SM and Fowke LC, 1993.

Embryogeny of gymnosperms: advanced in synthetic seed technology of conifers. *Plant cell, tissue and organ culture* 35, 1-35

6. Bhojwani SS and Brettnagar SP, 1992.

Embryogeny of angiosperms. *Vikas Publishing House Pvt Ltd., New Delhi, India*

7. Bostel JV and Berthouly M, 1996.

High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. In: *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 44: 7-17

8. Chen L, Zhang S, Beachy RN, Fauquet CM 1998.

A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants, *Plant cell reports*, 18, 25-31

9. De Proft MP, Maene ML, Debergh P, 1985.

Carbondioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 65: 375-379.

10. Ducos JP, Zamarripa A, Eskes A and Petiard V, 1993.

Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor. In: 15eme Colloq. Sci. Int. Cafe, Montpellier, 6-11 June (pp 89-96). ASIC, Paris.

11. Garg L, Bhandari NN, Rani V, Bhojwani S, 1996.

Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*, *Plant cell reports*, 15, 855-858

12. Govil S and Gupta SC, 1997.

Commercialization of plant tissue culture in India. *Plant cell, tissue and organ culture* 51: 65-73.

13. Fujiwara K, Kozai T, 1995.

Physical microenvironment and its effects. In "Automation and environmental Control in Plant tissue culture" ed. by Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL. *Kluwer Academic Publisher, Dordrecht the Netherlands*. 319-369

14. Huang LC and Huang B L, 1993.

Bamboo tissue culture. In: *Recent Advances in botany. Monograph Series No. 13*, 203-212.

15. Huettelman CA and Preece JE 1993.

Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture, *Plant Cell, tissue and organ culture* 33, 105-119

16. Jain M, Sopory SK, Veilleux RE, 1997.

In vitro haploid production in higher plants, Vol4 - *Cereals*, *Kluwer Acad. Publishers*

17. *Kodym A., and Zapata-Arias FJ, 1999.*

Natural light as an alternative light source for the in vitro culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine', Plant Cell, tissue and organ culture ,55, 141-145

18. *Kranz E and Kumlehn J, 1999.*

Angiosperm fertilization, embryo and endosperm development in vitro. Plant science 142, 183-197

19. *Lai CC, Yu TA, Yeh SD, Yang JS, 1998.*

Enhancement of in vitro growth of papaya multishoots by aeration. Plant cell, tissue and organ culture 53,221-225

20. *Lin CS and Chang WC 1998.*

Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets. In: Plant Cell Reports 17, 617-620.

21. *Nadgauda SR, John CK , Parasharami VA, Joshi MS and Mascarenhas 1997.*

A comparison of in vitro with in vivo flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea*. Plant cell, tissue and organ culture 48: 181-188

22. *Nishimura S, Terashima T, Higashi K and Kamada H, 1993.*

Bioreactor culture of somatic embryos for mass propagation of plants. In: Synseeds Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press.

23. *Onishi N, Sakamoto Y, and Hirosawa T, 1994.*

Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39, 137-145.

24. *Quynh NT and Kozai T, 1998.*

Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. Environ. control in Bio., 36,2,59-75

25. *Raina KS and Irfan ST, 1998.*

High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice, Plant cell reports,17,957-962

26. *Sasson A ,1993.*

Biotechnologies in developing countries: Present and future, Vol I. UNESCO publishing.

27. *Saxena S and Dhawan V ,1999.*

Regeneration and large - scale propagation of Bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embriogenesis. Plant cell reports, 18, 438- 443

28. *Takayama S and Akita M, 1994.*

The types of bioreactors used for shoots and embryos. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39, 147-156

29. Tanaka K, Fujiwara K, Kozai T, 1992.

Effects of related humidity in the culture vessels on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets in vitro. *Acta Horticulture*, 319, 59 - 64

30. Tanaka K, Wantanabe Y, Shimada N, 1991.

Effect of O₂ concentration on growth of *Chrysanthemum morifolium* plantlets in vitro. *Environ. Control in Biol*, 30, 65-67

31. Vasil I K, 1994.

Automation of plant proppagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 39: 105 -108.

32. Vĩnh ĐV và Phái P, 1996.

Kỹ thuật đơn bội in vitro trong công tác giống cây trồng, Viện di truyền n/n, Kết quả N/c khoa học 1986 - 1996, NXB Nông nghiệp, 134 - 140

33. Zhang J, Dong WH, Galli A, Potrycus I, 1999.

Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*), *Plant cell reports* in press.

SOME ACHIEVEMENTS AND DEVELOPMENT DIRECTIVES OF PLANT CELL BIOTECHNOLOGY IN VIETNAM

Do Nang Vinh

SUMMARY

Vietnam is an agricultural country with nearly 80 % of population living in rural areas. The food production, the reforestation programme of 5 millions ha and the fast establishment of crop plantations require application of new advanced achievements of plant cell biotechnology in the country. The achievements world-wide applicable for Vietnam have been shortly analyzed. The scale-up of research and the commercialization of research results in the field of plant cell biotechnology have to be the priority in future national biotechnology programmes.

TÌNH HÌNH PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ GENE Ở VIỆT NAM

Lê Trần Bình

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. VỊ TRÍ CỦA CÔNG NGHỆ GENE TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Công nghệ gene được coi là chìa khoá của công nghệ sinh học. Sự thật, kể từ khi kỹ thuật DNA tái tổ hợp ra đời thông qua các loại enzyme hạn chế (restriction enzymes) các nhà nghiên cứu có khả năng cắt, gọt, lắp ghép các đoạn phân tử DNA tạo nên những phân tử mới với những đặc tính di truyền mới, những gene mới thì công nghệ sinh học mới trở thành một ngành khoa học công nghệ cao có ý nghĩa kinh tế xã hội to lớn, được các nước coi là hướng ưu tiên phát triển, được hàng loạt công ty lớn đầu tư khối lượng lớn vốn vào nghiên cứu, phát triển và triển khai sản xuất. Trên giác độ khoa học thì "Công nghệ sinh học được coi là ngành khoa học công nghệ của việc chuyển nạp gene (DNA) vào tế bào hay cơ thể chủ nhằm khai thác một cách công nghiệp các sản phẩm của gene đó phục vụ đời sống và phát triển kinh tế".

II. NHỮNG NGHIÊN CỨU VỀ BỘ GENE HỌC (GENOMICS)

Công nghệ gene theo nghĩa rộng được coi là lĩnh vực nghiên cứu và phát triển công nghệ liên quan đến việc:

1. Nghiên cứu toàn bộ genome của những loài chọn lọc như chương trình đọc trình tự genome người với tổng chi phí trên 3 tỉ đô la Mỹ; Chương trình đọc trình tự genome cây lúa với sự tham gia của hầu hết các nước trồng lúa có tiềm lực khoa học công nghệ mạnh; Chương trình đọc trình tự genome cây *Arabidopsis*, đọc trình tự genome tế bào nấm men *Saccharomyces*, trình tự genome tuyến trùng ...
2. Thiết lập bản đồ gene của nhiều tính trạng di truyền quan trọng của người, của cây trồng và vật nuôi nhằm phục vụ tốt việc chữa bệnh và cải tiến giống.
3. Việc lấy dấu DNA hay tìm kiếm các chỉ thị phân tử cho genome của từng cá thể, dòng, giống đang được quan tâm nhiều cho mục tiêu phân loại như xác định chi, loài, cho công tác chọn giống và đặc biệt là trong khoa học hình sự nhằm xác định đối tượng nghi vấn.

Trong điều kiện Việt Nam hiện nay một số kỹ thuật sinh học phân tử được đưa vào ứng dụng chủ yếu trên 4 lĩnh vực:

1. Chẩn đoán bệnh ở người và pháp y;
2. Đánh giá và bảo vệ giống vật nuôi;

3. Đa dạng sinh học tài nguyên động thực vật, trong đó có mục tiêu phân loại và định tên loài;
4. Phục vụ việc tạo và chọn giống cây trồng (năng 1).

Bảng 1. Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán, nghiên cứu đa dạng di truyền và phục vụ công tác giống

Đối tượng	Kỹ thuật	Cơ quan
Chẩn đoán bệnh và pháp y		
Virus viêm gan B	Nested PCR	Viện Công nghệ Sinh học;
Sốt rét	Nested PCR	Viện Sốt rét & Ký sinh trùng
Gôpd	So sánh hoạt tính	Viện Công nghệ Sinh học;
Sốt xuất huyết	RT-PCR	Viện Vệ sinh dịch tễ Hà Nội
Bệnh lao	PRC	Trường Đại học Y Dược TP HCM
Ung thư vòm	PCR	Viện Công nghệ Sinh học, Trường ĐH Y Hà Nội,
Chẩn đoán giới tính	PCR gene TDF	Viện Ứng dụng Kỹ thuật hạt nhân
Pháp y và hình sự	DNA Fingerpriting, PCR	Viện Khoa học Hình sự, Trường Đại học Y Hà nội
Đánh giá giống vật nuôi		
Gen kháng bệnh ở lợn	PRC	Viện Chăn nuôi
Gene hướng sữa	PCR gene k- casein và β -lactoglobulin	Viện Công nghệ Sinh học;
Xác định giới tính phôi bò	PCR	Viện Công nghệ Sinh học;
Nhiễm <i>Samonella</i>	PCR	Viện Công nghệ Thực phẩm
Mẩn bệnh trong nước uống		Viện Vệ sinh Dịch tễ Hà Nội
Đa dạng sinh học, môi trường		
Định tên loài động thực vật	Phân tích trình tự gen, quan hệ chủng loại	Viện Công nghệ Sinh học;
Đa dạng sinh học ở lúa	PCR, SSR, So sánh gene waxy	Viện Nghiên cứu lúa đồng bằng sông Cửu Long; Viện Di truyền Nông nghiệp,
Đa dạng di truyền thực vật, tảo	Chỉ thị phân tử	Viện Công nghệ Sinh học; Trường Đại học Khoa học tự nhiên,
Gene phân huỷ nhiên dầu	PCR	Viện Công nghệ sinh học;
C. Chọn tạo giống		
Tạo chọn giống lúa	Chọn dòng, RAPD	Viện Công nghệ Sinh học;
Bệnh đạo ôn ở lúa	Lập bản đồ gene	Viện Di truyền Nông nghiệp,
Gene BĐĐ ở lúa	Lập bản đồ gene	Viện Di truyền Nông nghiệp,
Tính kháng rầy	Lập bản đồ gene	Viện Nghiên cứu lúa đồng bằng sông Cửu Long
Tính chịu mặn ở lúa	Lập bản đồ gene	Viện Công nghệ sinh học;

III. GENOMICS CHỨC NĂNG, PHÂN LẬP VÀ BIỂU HIỆN GENE

Phân lập và thiết kế gene nhằm đưa ra các phân tử DNA với những tính năng mới hoặc chuyên dụng. Đây là những sản phẩm công nghệ, có tới 95% thuộc bản quyền của các công ty công nghệ sinh học lớn, chúng thường được bảo vệ chặt chẽ bằng quyền tác giả và luật sở hữu trí tuệ. Hiện nay vấn đề sở hữu trí tuệ đối với các loại gene đang gây ra không ít các cuộc tranh luận và cũng đang gây cản trở đáng kể cho việc sử dụng rộng rãi các loại gene này. Nghiên cứu về điều khiển hoạt động của gene thông qua các đoạn DNA điều khiển, đoạn kích hoạt, đoạn cảm ứng, đoạn chuyển tải ... đang là mục tiêu chạy đua của những phòng thí nghiệm tiên tiến về nghiên cứu genomics chức năng.

Những gene có giá trị trong phát triển ngành công nghệ sinh học tương lai của nước ta đã bắt đầu được tiếp cận nghiên cứu. Bảng 2 trình bày một số thành tựu ban đầu rất khiêm tốn mà cán bộ khoa học của Việt Nam đã làm được trong vòng 5 năm trở lại đây. Đáng chú ý là những cố gắng nghiên cứu tạo chủng vi sinh sản sinh enzyme công nghiệp dạng tái tổ hợp và tiếp cận công nghệ chế tạo vaccine tái tổ hợp. Điều nổi bật là nhà nước thông qua Bộ KH&CN&MT đã tập trung đầu tư trang thiết bị đồng bộ cho 2 cụm PTN về Công nghệ gen và công nghệ lên men tại Viện Công nghệ Sinh học để cán bộ của nhiều cơ quan cùng có thể tiến hành những thí nghiệm về gene và lên men từ khâu ban đầu nhất như phân lập gene, xác định trình tự nucleotide, thiết kế, biểu hiện, phân tích sản phẩm và đến khâu cuối cùng tạo ra sản phẩm ở qui mô bình lên men 100 lít.

Bảng 2. Một số gene có giá trị công nghệ sinh học đang được nghiên cứu

TT	Gene	Mục đích sử dụng	Tiến độ
1	Amylase	SX enzyme CN	Có chủng VSV tái tổ hợp
2	Pectinase	SX enzyme CN	Đang biểu hiện gene
2	RIPs	Thuốc chữa bệnh	Đang biểu hiện gene
3	Lipase	SX enzyme CN	Có chủng tái tổ hợp
4	Fab	SX kháng thể	Có chủng mang gene
5	DNA polymerase	Sinh học phân tử	Đang sàng lọc
6	HbsAg	Vaccine tái tổ hợp	Đang biểu hiện gene

Danh sách các gene có giá trị ngày càng được nối dài. Vào những năm 1980-1990 hầu hết chỉ có các gene liên quan đến khả năng chống chịu sâu bệnh, chống chịu chất diệt cỏ được nói đến nhiều. Từ 1990 đến nay những nhóm gene liên quan đến tính chống chịu điều kiện ngoại cảnh bất lợi và gene di truyền số lượng liên quan đến năng suất và chất lượng cây trồng và vật nuôi được đề cập đến và đưa vào ứng dụng. Làn sóng thứ ba của gene có giá trị thuộc nhóm các gene có giá trị là các gene làm gia tăng giá trị dinh dưỡng và giá trị sử dụng của các sản phẩm nông nghiệp. Và nhóm thứ tư kể đến là các gene mã hoá các protein được chất có giá trị sử dụng và thương mại cao cũng đang được tập trung nghiên cứu và khai thác.

IV. CHUYỂN GENE VÀ GMOS

Chuyển gene để tạo ra các sinh vật được cải biến di truyền (genetically modified organisms = GMOs). Riêng doanh số của giống cây trồng chuyển gene hiện nay đã đạt con số hàng tỷ đô la Mỹ. Chính vì vậy mà vấn đề GMOs đang được dư luận chú ý nhiều cả trên khía cạnh kinh tế lẫn trên khía cạnh an toàn sinh học và an toàn thực phẩm.

Tại các PTN của nước ta các cán bộ nghiên cứu bằng nhiều con đường khác nhau đã thu thập hay tự phân lập ra được những gene có ý nghĩa dùng trong nông nghiệp (bảng 3), nhưng điều đáng lưu ý là nơi cung cấp mới chỉ cho phép sử dụng các gene trên vào mục đích nghiên cứu, rộng hơn là dùng trong sản xuất nội địa.

Về cơ sở vật chất, năng lực phòng thí nghiệm và cán bộ thực hiện kỹ thuật chuyển gene ở cả nước hiện có 4 đơn vị có khả năng tạo sinh vật chuyển gene nông nghiệp: Viện Công nghệ sinh học, Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Di truyền Nông nghiệp và Viện Nghiên cứu lúa đồng bằng sông Cửu Long. Đối tượng chủ yếu là cây lúa, cũng có nghiên cứu về bắp cải, thuốc lá, khoai lang, đu đủ. Về lực lượng cán bộ các Viện và Trường đã cử được một số cán bộ đi thực tập ở những phòng thí nghiệm tiên tiến của Mỹ, Pháp, Đức, Australia, Bỉ. Số lượng khoảng 16 người, chủ yếu tập trung ở Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long 3 người, Viện Sinh học nhiệt đới 3, Viện Di truyền Nông nghiệp 4 người, Viện Công nghệ Sinh học 5 người, Viện Cây Lương thực và Thực phẩm 1 người cộng với số đào tạo trong nước thì con số đó đạt khoảng 30 người.

Bảng 3. Các loại gene có ích đang cho thực vật và động vật ở các PTN Việt Nam

TT	Gene	Tình trạng	Nguồn gốc
	Cho cây trồng		
1	CryIA (a,b,c,d)	Kháng sâu	ĐHTH Ottawa, Canada
2	GNA	Kháng rầy	John Inne Intitute, Anh
3	Xa21	Kháng bạc lá VK	UC, Davis, Hoa Kỳ
4	Asp1	Tăng protein dự trữ	Demegen, Hoa Kỳ
5	Chitinase	Kháng bệnh nấm	Uni Genf, Bỉ
6	P5CS	Chịu hạn	VUB, Bỉ
7	OAT	Chịu hạn	VUB, Bỉ
8	HAL	Chịu hạn	PUV, Tây Ban Nha
9	nha	Chịu mặn	PUV, Tây Ban Nha
10	Bar	Kháng thuốc trừ cỏ	PMB, Pháp
11	Dhpds	Chịu hạn	VUB, Bỉ
12	CP	Kháng bệnh đốm vòng	IBT, Việt Nam
13	ACC antisense	Làm chín chậm	IBT, Việt Nam
14	Chil442	Chịu rét	IBT, Việt Nam
15	Tps	Chịu hạn	PUV, Tây Ban Nha
16	Gene họ myb	Cải tiến giống lúa	NIAR, Nhật
	Cho vật nuôi và môi trường		
17	Growth hoormon	Tăng trưởng nhanh	Berlin, Đức
18	CryIII	Diệt bọ gây muỗi	IBT, Việt Nam, ICGB Ấn Độ

V. VẤN ĐỀ AN TOÀN SINH HỌC CỦA GMOS VÀ AN TOÀN THỰC PHẨM GMOS

So với một số nước nông nghiệp cùng nhóm trong khu vực thì Việt Nam đang còn chậm một nhịp, ít nhất là 3-5 năm trên lĩnh vực GMOs. Trước hết về sự chuẩn bị hành lang pháp lý cho GMOs hiện nay ở các nước như Thailand, Malaysia, Indonesia, Philippines họ đều đã có văn bản nhà nước hướng dẫn về việc thử nghiệm, đánh giá và cho phép sử dụng GMOs và các quốc gia ASEAN đã có văn bản hướng dẫn được thống nhất hoá cho cả khu vực để trình ký, còn ở Việt Nam các văn bản đó đang còn ở dạng dự thảo. Đây là điểm hạn chế làm chậm tiến độ hội nhập, nhiều công ty muốn giới thiệu các loại giống cây trồng chuyển gene vào Việt Nam đều đang mong muốn sớm có các văn bản pháp lý về GMOs.

VI. KẾT LUẬN

Mặc dù lực lượng về cán bộ, cơ sở vật chất và kinh nghiệm còn rất hạn chế, nhưng Việt Nam đã nhận thức đúng vai trò quyết định của công nghệ gene trong quá trình phát triển ngành công nghệ sinh học nên đã có những đầu tư thích đáng và tập trung lực lượng cán bộ có năng lực triển khai nghiên cứu trên các lĩnh vực chính của công nghệ gene và bước đầu đã thu được một số kết quả. Tuy nhiên trước mắt cần hoàn thiện gấp các văn bản pháp lý về an toàn sinh học và an toàn thực phẩm đối với các loài sinh vật được cải biến di truyền và sản phẩm của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO THÊM

1. Tóm tắt báo cáo, Abstracts: Hội nghị toàn quốc lần thứ nhất về công nghệ sinh học cây lúa, Huế, Việt Nam, 5-6/5/1998
2. Proceeding of Regional Symposium on Genetically Modified Foods: Benefits and Awareness, Bangkok, Thailand, March 17-18, 1999
3. Plant & Animal Genome V. The International Conference on the Status of Plant & Animal Genome Research, San Diego, CA, January 12-16, 1997

CURRENT STATUS OF GENETIC ENGINEERING RESEARCH IN VIET NAM

Le Tran Binh

SUMMARY

Genetic engineering is recognized as the key position for biotechnology development. The current status of research activities in Viet Nam on (i) genomics studies, (ii) gene isolation and construction, (iii) development of genetically modified organisms and (iv) the biosafety and food safety issues is presented. The paper is considering also problems related to manpower development as well as the preparation of regulatory documents for GMOs.

Phần I

CÔNG NGHỆ VI SINH

1.0.1

NGHIÊN CỨU SỰ PHÁT TRIỂN, TẠO BÀO TỬ VÀ TINH THỂ ĐỘC TỔ CỦA CHỦNG BS 2362 TRÊN MÔI TRƯỜNG SỬ DỤNG BỘT ĐẬU TƯƠNG THỦY PHÂN

Phạm Thu Trang, P.L. Rogers
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

I. MỞ ĐẦU

Bacillus sphaericus (Bs) là vi khuẩn Gram (+), hiếu khí nghiêm ngặt, trong quá trình hình thành bào tử nó có khả năng sinh ra tinh thể protein có tác dụng gây độc đối với một số loài muỗi truyền bệnh, đặc biệt là *Culex* và *Anopheles*-là các tác nhân truyền bệnh giun chỉ và sốt rét, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng. Ngoài ra vi khuẩn Bs còn có khả năng sinh sống trong môi trường nước ô nhiễm và tái phát triển tốt trong *Culex* (9).

Thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển, hình thành bào tử và tinh thể độc tố của chủng Bs. Xu hướng nghiên cứu tập trung vào môi trường nuôi cấy có sử dụng một số nguyên liệu sẵn có và rẻ tiền như hạt bông, hạt cải, rỉ đường, cao ngô, ... (3,5). Tuy nhiên các môi trường nuôi cấy có sử dụng các nguyên liệu trên riêng rẽ hoặc phối hợp với nhau thì sự tạo bào tử và tinh thể độc tố của chủng Bs đều phụ thuộc rất nhiều vào thành phần axit amin và hàm lượng cacbonhydrat (7). Chủng Bs phát triển tốt trên môi trường giàu protein, đặc biệt là protein được thủy phân không hoàn toàn (1), nhưng nó lại không có khả năng sử dụng các loại cacbonhydrat phức tạp làm nguồn cacbon và năng lượng chính cho sự phát triển, tạo bào tử và tinh thể độc tố, do chúng thiếu rất nhiều các enzym tham gia trong các con đường trao đổi chất Embden-Meyerhof, Entner-Doudoroff và hexosa monophotphat (8).

Nghiên cứu này nhằm mục đích điều tra khả năng sử dụng bột đậu tương thủy phân làm nguồn cacbon và nitơ chính cho sự phát triển, tạo bào tử và tinh thể độc tố của chủng Bs 2362.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vi sinh vật và nuôi cấy

- Chủng Bs 2362 được cung cấp bởi Prof. S.Singer, trường ĐHTH Western Illinois, Macomb, Illinois, USA.
- Môi trường giữ giống là NYMS (thạch dinh dưỡng có bổ sung thêm cao nấm men và một số muối khoáng) (4).

- Môi trường nhân giống bao gồm cao nấm men, axetat natri và một số muối khoáng (4). Giống nuôi ở 30°C, 24 giờ, trên máy lắc tròn với tốc độ 200 v/ph.
- Môi trường lên men được chuẩn bị như sau: Bột đậu tương được thủy phân bằng NaOH với các tỉ lệ từ 1.5-10% (w/w). Sau đó đem đun sôi 5 phút, làm nguội và ly tâm 17.000 v/ph trong 20 phút. Loại bỏ phần không hoà tan, phần dịch trong được bổ sung (g/l): $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.02; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.02; axetat natri 10. pH của môi trường được điều chỉnh 7.2 dùng HCl 1M.
- Nuôi cấy được tiến hành trên thiết bị lên men 2L chứa 1 lít môi trường lên men, nhiệt độ 30°C, pH 7.0 và oxy hoà tan 20% được điều chỉnh tự động, tốc độ khuấy đạt cố định ở 700 v/ph trong suốt quá trình nuôi cấy. Tỉ lệ nhân giống là 10%.

2. Phương pháp phân tích

- Tổng tế bào và bào tử tự do được xác định dùng buồng đếm Weber Thoma trên kính hiển vi đối pha (Model BHC Olympus) độ phóng đại 400 lần.
- Xác định sự tiêu thụ cơ chất axetat natri dùng kit phân tích sinh hoá enzym (Boelinger Mannheim).
- Phát hiện protein tinh thể độc tố bằng phương pháp điện di trên gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) và kỹ thuật vết thấm tách protein (Western blot) (6).
- Hiệu lực sinh học (bioassay) trên loài *Culex quinquefasciatus* được xác định theo chương trình phân tích probit (PA-mod) (2).

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Nghiên cứu ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy có sử dụng bột đậu tương được thủy phân bằng NaOH với các tỉ lệ khác nhau đến sự phát triển, hình thành bào tử và tinh thể độc tố của chủng Bs 2362

Chủng Bs 2362 được nuôi cấy trong các môi trường sử dụng bột đậu tương (BĐT) được thủy phân bằng NaOH với các tỉ lệ từ 1.5 - 10%, làm nguồn nitơ và carbon chính (bảng 1). Sau 72 giờ nuôi cấy ở 30°C trên máy lắc tròn (200 v/ph) nhận thấy rằng môi trường sử dụng BĐT thủy phân bằng 3.5% NaOH (MT 5) cho kết quả tổng số tế bào (TTB) đạt cao nhất là 4.01×10^8 TB/ml và 90% tạo tiền bào tử (TBT) và bào tử tự do (BTTD) (bảng 2). Kết quả này có thể so sánh được với môi trường nuôi cấy sử dụng cao nấm men (MT1). Tuy nhiên nếu nồng độ NaOH sử dụng cao hơn thì TTB và tỉ lệ bào tử bị giảm đi đáng kể. Điều này có thể do nồng độ kiềm cao sẽ ảnh hưởng đến chức năng sinh học của protein đậu tương, làm phá hủy một phần gốc axit amin chứa lưu huỳnh và đồng thời cũng làm giảm độ hoà tan của các hợp phần nitơ trong protein đậu tương. pH của dịch nuôi cấy tăng đến 9.4 ở cuối giai đoạn nuôi cấy do vi khuẩn sử dụng protein trong môi trường làm giải phóng ra các ion hydroxyl.

Bảng 1. Thành phần các môi trường nuôi cấy chủng Bs 2362

	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5	MT6	MT7	MT8
Nguồn C (g/l):								
Axetat natri	15	10	10	10	10	10	10	10
Nguồn nitơ (g/l) :								
Cao nấm men	10							
Bột đậu tương thủy phân bằng :								
0% NaOH		10						
1,5% NaOH			10					
2,5% NaOH				10				
3,5% NaOH					10			
5% NaOH						10		
7,5% NaOH							10	
10% NaOH								10
Muối khoáng (g/l)								
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Photphat (g/l)								
KH ₂ PO ₄	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

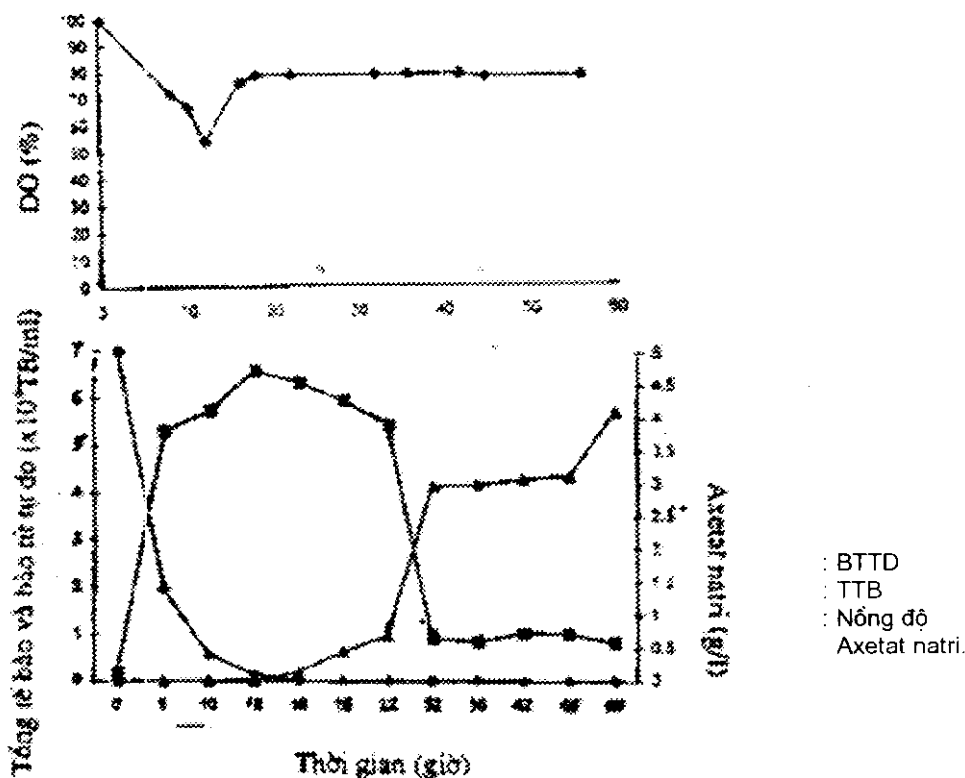
Bảng 2. Ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy khác nhau đến sự phát triển và tạo bào tử của chủng Bs 2362

Môi trường	Tổng tế bào (x10 ⁹ TB/ml)	Bào tử tự do (%)	pH cuối
MT1	4,48	96	9,45
MT2	2,56	73	9,2
MT3	3,30	82	9,4
MT4	3,31	87	9,34
MT5	4,01	90	9,4
MT6	3,09	57	9,12
MT7	2,83	58	9,13
MT8	2,44	53	9,12

2. Nghiên cứu động học chủng Bs 2362 nuôi cấy trên thiết bị lên men

Các yếu tố môi trường như nhiệt độ, pH, độ thông khí có ảnh hưởng quan trọng đến sự phát triển, tạo bào tử và tính thể độc tố (6). Chủng Bs 2362 được nuôi cấy theo mẻ trong thiết bị lên men 2L chứa 1 lít môi trường lên men (MT5). Các thông số nhiệt độ (30°C), pH (7,0) và oxy hòa tan (>20%) được đo và điều chỉnh tự động trong suốt quá trình nuôi cấy.

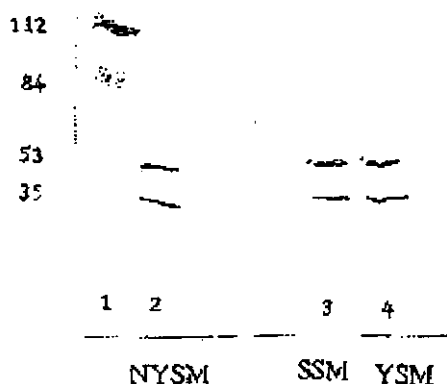
Kết quả cho thấy TTB đạt cao nhất sau 12 giờ nuôi cấy là $6,6 \times 10^8$ TB/ml. TBT bắt đầu hình thành sau 16 giờ và BTTD đạt 87% sau 60 giờ. Ở thời điểm tế bào đạt cực đại : cơ chất axetat natri được tiêu thụ hầu như hết; oxy hoà tan tiêu thụ hầu như tối đa khoảng 50% sau đó được duy trì ở 20% cho đến cuối quá trình nuôi cấy (hình1).



Hình 1. Động học của sự phát triển và tạo hóa của chủng Bs 2362 trên môi trường nuôi cấy sử dụng bột đậu tương thủy phân

3. Phát hiện protein độc tố của chủng Bs 2362

Chủng Bs 2362 được nuôi cấy trên môi trường BDT thủy phân (SSM) (60 giờ, trong thiết bị lên men). Dịch tinh thể-bào tử được thủy phân và đem phân tích thành phần protein (6). Bằng kỹ thuật vết thẩm tách protein phát hiện thấy 2 vạch protein trọng lượng phân tử 42- và 51 KDa xuất hiện như là các vạch chủ yếu (hình 2), với cường độ các vạch tương đương với khi chủng Bs 2362 được nuôi cấy trong môi trường cao nấm men (YMS) và môi trường dinh dưỡng+ cao nấm men (NYSM) (4).

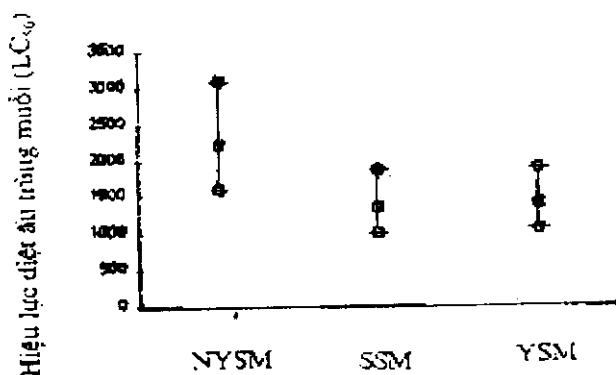


Hình 2. Phân tích protein độc tố của chủng Bs 2362 trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

- Đường 1: Protein chuẩn (antiserum mouse);
 Đường 2: Dịch thủy phân tinh thể-bào tử của chủng Bs 2362 trên môi trường dinh dưỡng+cao nấm men (NYSM).
 Đường 3: Dịch thủy phân tinh thể-bào tử của chủng Bs 2362 trên môi trường BDT thủy phân (SSM);
 Đường 4: Dịch thủy phân tinh thể-bào tử của chủng Bs 2362 trên môi trường cao nấm men (YSM);

4. Hiệu lực sinh học trên loài *Culex quinquefasciatus*

Kết quả thử hiệu lực sinh học trên loài *Culex quinquefasciatus* tuổi 3 cho thấy : chủng Bs 2362 được nuôi cấy trong môi trường SSM (87% tạo bào tử) có hiệu lực diệt bọ gây muỗi là $LC_{50} = 1,36 \times 10^3$ TB/ml, tương đương với kết quả thu được khi sử dụng môi trường nuôi cấy YSM (95% tạo bào tử) là $LC_{50} = 1,42 \times 10^3$ TB/ml và trong môi trường NYMS là $LC_{50} = 2,0 \times 10^3$ (hình 3)



Hình 3. Hiệu lực diệt ấu trùng muỗi (LC₅₀) của chủng Bs 2362 trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

Như vậy từ kết quả nghiên cứu thu được cho thấy rằng việc sử dụng BDT thủy phân bằng 3,5% NaOH đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng cho sự phát triển của chủng Bs 2362 và có thể thay thế được hoàn toàn cao nấm men trong môi trường nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anon, 1990.
Guidelines for production of *B.thuringiensis* H-14 and *B.sphaericus*.
Document TDR/BCV/90.1. Geneva : World Health Organization.
2. Finney D.J. 1971.
Probit analysis, Cambridge University, London.
3. Gangurde R.P. and Shethna Y.I., 1995.
Growth, sporulation and toxin production by *B.sphaericus* and *B.thuringiensis* subsp. *Israelensis* in media based on mustard-seed meal. World J.Microbiol. Biotechnol 11,202-205.
4. Karim et al. 1993.
The effect of oxygen on the sporulation and toxicity of *B.sphaericus* 2362. Biotechnol. Lett.15,47-50.
5. Obeta and Okafo, 1983.
Production of *B.sphaericus* strain 1593 primary powder on media made from locally obtainably Nigerian agriculture products. Canadian J.Microbiol. 29,704-709.
6. Osborne 1995.
Ph.D thesis, Biotechnology Dept., the University of New South Wales. Australia.
7. Rogoff and Yousten 1969.
Bacillus thuringiensis : microbial considerations. Ann. Rev of Microbiol. 23,357-386.
8. Russell et al. 1989.
Carbohydrate metabolism in the mosquito pathogen *B.sphaericus* 2362. Appl.Envir.Microbiol.55,294-297.
9. Singer S. 1981.
Potential of *B.sphaericus* and related spore-forming bacteria for pest control. In Microbiol control of pest and plant diseases. London: Academic Press, 283-298.

1.0.2

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI) CÓ HOẠT LỰC CAO VỚI ẤU TRÙNG MUỖI *Aedes aegypti*

Võ Thị Thứ¹⁾, Nguyễn Kim Thoa¹⁾, Nguyễn Thị Hương²⁾

(1): VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

(2): VIỆN SỐT RÉT, KỶ SINH TRÙNG VÀ CÔN TRÙNG, BỘ Y TẾ

Muỗi *Aedes aegypti* là vector truyền bệnh sốt xuất huyết cho người. Hàng năm, ở nước ta có đến hàng trăm nghìn người bị bệnh sốt xuất huyết và gần nửa triệu người mắc bệnh sốt rét.

Cho đến nay, việc phòng và chống các vector truyền bệnh chủ yếu là sử dụng hoá chất. Bởi vậy gây nên tình trạng kháng thuốc của côn trùng, ô nhiễm môi trường và không diệt trừ tận gốc mầm bệnh. Thực tế đòi hỏi phải có biện pháp an toàn và hiệu quả hơn để phòng và chống các bệnh do muỗi truyền. Một trong những biện pháp được tổ chức Y tế Thế giới khuyến khích là sử dụng chế phẩm sinh học diệt muỗi sản xuất từ chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti).

Từ vài thập kỷ nay, nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới đã thường xuyên phân lập và tuyển chọn các chủng Bti có hoạt lực cao với ấu trùng muỗi nhằm đưa ra chế phẩm mới sử dụng hiệu quả hơn. Ở Việt Nam cũng bắt đầu quan tâm nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm sinh học diệt muỗi.

Việc phân lập và tuyển chọn thường xuyên các chủng tự nhiên có hoạt lực diệt muỗi cao và đổi mới công nghệ sản xuất chế phẩm là hai hướng nghiên cứu để nâng cao hiệu quả sử dụng chế phẩm sinh học diệt muỗi.

Bài báo này trình bày kết quả phân lập và tuyển chọn chủng Bti có hoạt lực cao với ấu trùng muỗi *Aedes aegypti*.

1. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

- Chủng Bti ORN-60A, nhận được từ Trung tâm Quốc tế về Công nghệ gen và Công nghệ Sinh học, New Dehli.
- Chủng Bti 1884, nhận được của Trung tâm Quốc tế về *Bacillus* diệt côn trùng, Viện Pasteur Paris.
- Các chủng Bt phân lập.

* Chân thành cảm ơn Dr. M.M.Lecadet, Trung tâm Quốc tế về *Bacillus* diệt côn trùng đã giúp đỡ trong việc xác định typ huyết thanh các chủng phân lập.

2. Phương pháp

- Phương pháp phân lập Bt theo Travers và cộng sự, 1987 [8].
- Kỹ thuật PCR theo Carrozi và cộng sự, 1991 [2].
- Điện di protein theo Laemmli và cộng sự, 1970 [5].
- Tạo chế phẩm Bt theo Dulmage và cộng sự, 1970 [3].
- Thử nghiệm hoạt lực diệt ấu trùng muỗi theo Lacey, 1990 [6].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập Bt

Bti là loài phụ của Bt, có hoạt lực diệt côn trùng hai cánh (muỗi, ruồi đen). Để nhận được chủng Bti, trước hết phải phân lập được các chủng Bt. Chúng tôi sử dụng môi trường LB + axetat kết hợp với xử lý nhiệt để phân lập Bt dựa trên đặc điểm của loài Bt là không có khả năng nảy mầm trên môi trường có axetat [8]. Tuy vậy, trên thực tế có một số loài *Bacillus* khác cũng nảy mầm trên môi trường có axetat. Do đó, việc tuyển chọn thật chính xác các chủng nghiên cứu có tầm quan trọng đặc biệt trong quá trình nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm.

Từ các mẫu thu thập được ở các địa phương trong nước, đã phân lập được một số chủng Bt với đặc điểm: Gram⁺, hình que, có bào tử oval, không phình, sản sinh katalaza và tổng hợp tinh thể (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả phân lập các chủng Bt

Ký hiệu chủng	Đặc điểm	Katalaza	Hình dạng tinh thể	Đặc điểm phân lập
VN 1	Gram ⁺ , bào tử không phình	+	hình cầu	Đông Anh, HN
VN 2	Gram ⁺ , bào tử không phình	+	hình cầu	Đông Anh, HN
VN 3	Gram ⁺ , bào tử không phình	+	hình cầu	Cổ Nhuế, HN
VN 4	Gram ⁺ , bào tử không phình	+	hình cầu	Từ Liêm, HN
VN 5	Gram ⁺ , bào tử không phình	+	hình cầu	Cổ Nhuế, HN
VN 6	Gram ⁺ , bào tử không phình	+	hình cầu	Hoài Đức, HT
VN 7	Gram ⁺ , bào tử không phình	+	hình cầu	Hoài Đức, HT
VN 8	Gram ⁺ , bào tử không phình	+	hình tháp đôi	Quảng ninh, QB
VN 9	Gram ⁺ , bào tử không phình	+	hình tháp đôi	Kiến Thụy, HP

2. Phân loại Bt

Cho đến nay, việc phân loại loài Bt thành các loài phụ chủ yếu là dựa vào đặc điểm huyết thanh học [1]. Có đến 63 loài phụ Bt được phân loại trên cơ sở 50 typ huyết thanh, trong đó loài phụ Bti thuộc typ huyết thanh H₁₄.

9 chủng Bt phân lập được phân loại thành loài phụ trên cơ sở đặc điểm typ huyết thanh. Kết quả cho thấy có 6 chủng thuộc typ huyết thanh H₁₄, được phân vào loài phụ *Bacillus thuringiensis israelensis*, 1 chủng thuộc typ huyết thanh H 3a, 3b, 3c (*Bacillus thuringiensis kurstaki*) và 1 chủng thuộc typ huyết thanh H 11a, 11b (*Bacillus thuringiensis toumanoffi*) (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả phân loại các chủng Bt phân lập

Ký hiệu chủng	Typ huyết thanh	Phân loại
VN 1	H 14	<i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i>
VN 2	H 14	<i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i>
VN 3	H 14	<i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i>
VN 4	H 14	<i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i>
VN 5	H 14	<i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i>
VN 6	H 14	<i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i>
VN 7	H 3a, 3b, 3c	<i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i>
VN 8	H 11a, 11b	<i>Bacillus thuringiensis subsp. toumanoffi</i>

Mặc dù đặc điểm typ huyết thanh được sử dụng như chìa khoá để phân loại loài Bt thành các loài phụ, nhưng người ta cũng thấy rằng nếu phân loại Bt chỉ dựa vào đặc điểm huyết thanh học thì không phản ánh được mối liên hệ với hoạt lực diệt côn trùng (một trong những đặc điểm quan trọng trong việc phân lập và tuyển chọn những chủng Bt có giá trị sử dụng). Một số ý kiến cho rằng phải có hệ thống phân loại mới đối với *Bacillus* diệt côn trùng [7]. Hofte và Whiteley đã đưa ra những bằng chứng đầu tiên về sự liên quan giữa các lớp gen cry, thành phần protein, hình dạng tinh thể và hoạt lực diệt côn trùng [4]. Chúng tôi cũng dựa trên các đặc điểm đó để tuyển chọn các chủng Bti có hoạt lực diệt muỗi.

3. Tuyển chọn Bti diệt muỗi

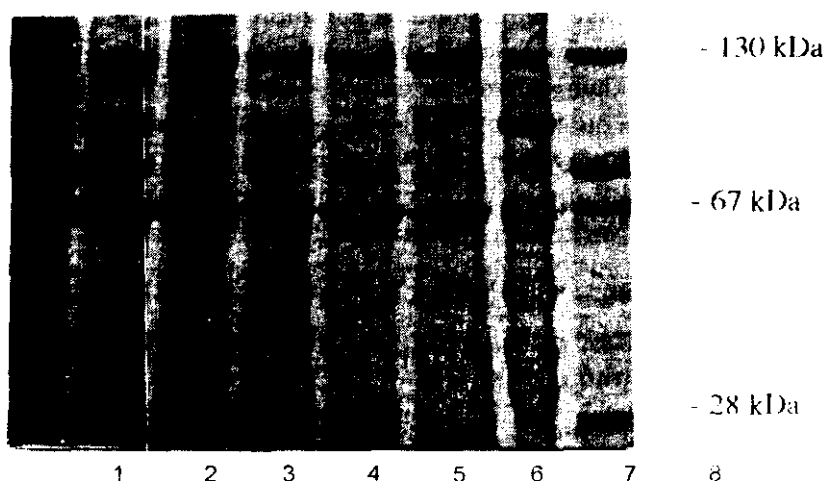
Thành phần protein, hình dạng tinh thể và hoạt lực diệt côn trùng có mối quan hệ chặt chẽ với nhau. Thực tế cho thấy rằng các chủng Bt có hình dạng tinh thể hình tháp đôi, phần lớn có hoạt lực diệt côn trùng cánh vảy và cánh cứng. Các chủng Bt có tinh thể hình cầu thường có hoạt lực diệt côn trùng hai cánh (muỗi, ruồi đen). Bởi vậy, dạng tinh thể hình cầu là một trong những đặc điểm để tuyển chọn các chủng có khả năng diệt muỗi. 6 chủng Bti phân lập đều có tinh thể dạng hình cầu (bảng 3).

Mặt khác, sự có mặt gen cry IV có thể khẳng định hoạt lực diệt muỗi của chủng phân lập. Để phát hiện sự hiện diện gen cry IV, chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR với 6 cặp mồi đặc trưng cho gen cry IV, cry III, cry I. Các chủng Bt mang gen cry IV sẽ có đoạn ADN khuếch đại với độ dài 1290 bp và 790 bp [2]. Kết quả cho thấy cả 6 chủng Bti phân lập đều có sản phẩm PCR: 1290 và 790 bp (bảng 3). Qua đó có thể cho rằng cả 6 chủng đều mang gen cry IV và dự đoán có hoạt lực với ấu trùng muỗi.

Đồng thời protein tinh thể của các chủng Bti cũng được hòa tan trong NaOH, SDS và β -mercaptoethanol, xác định trọng lượng phân tử trên gel acrylamit. Kết quả cho thấy cả 6 chủng đều tổng hợp các protein có hoạt lực diệt muỗi (130, 67, 28 kDa) giống chủng chuẩn Bti ORN-60A (bảng 3, hình 1). Các protein 130, 67, 28 kDa đều có hoạt lực diệt ấu trùng muỗi khi sử dụng riêng lẻ từng protein hoặc kết hợp cả 3 protein. Thực tế cho thấy khi sử dụng hỗn hợp cả 3 protein, hoạt lực diệt muỗi cao gấp nhiều lần so với sử dụng từng protein riêng lẻ. Điều đó có nghĩa là có sự tương tác giữa các thành phần protein.

Bảng 3. Kết quả tuyển chọn chủng Bti có hoạt lực với ấu trùng muỗi

Ky hiệu chủng	Hình dạng tinh thể	Thành phần protein (kDa)	Sản phẩm PCR (bp)	Gen	Dự đoán hoạt lực
VN 1	hình cầu	130, 67, 28	1290 790	cry IV	diệt muỗi
VN 2	hình cầu	130, 67, 28	1290 790	cry IV	diệt muỗi
VN 3	hình cầu	130, 67, 28	1290 790	cry IV	diệt muỗi
VN 4	hình cầu	130, 67, 28	1290 790	cry IV	diệt muỗi
VN 5	hình cầu	130, 67, 28	1290 790	cry IV	diệt muỗi
VN 6	hình cầu	130, 67, 28	1290 790	cry IV	diệt muỗi



Hình 1. Điện di protein của các chủng Bti phân lập trên gel acrylamit

Cột 1: Bti VN 1; Cột 2: Bti VN 2; Cột 3: Bti VN3; Cột 4: Bti VN 4; Cột 5: Bti VN 6; Cột 6: Bti VN 6; Cột 7: protein chuẩn (phosphorylase: 97,4 kDa; bovine serum albumin: 66,2 kDa; glutamate dehydrogenase: 55 kDa; ovalbumin: 42,7 kDa; aldolase: 40 kDa); Cột 8: Bti chuẩn ORN-60A.

4. Thử nghiệm hoạt lực diệt ấu trùng muỗi

Thông qua việc nghiên cứu hình dạng tinh thể, thành phần protein tinh thể, sự tồn tại gen cry IV có thể thấy rằng đã nhận được 6 chủng Bti có khả năng diệt muỗi.

Để khẳng định kết quả nghiên cứu, chúng tôi đã nuôi cấy các chủng Bti trên môi trường thích hợp và đánh giá hiệu lực diệt bọ gây muỗi *Aedes aegypti* (muỗi truyền bệnh sốt xuất huyết). Kết quả cho thấy cả 6 chủng Bti phân lập đều có khả năng diệt bọ gây muỗi *Aedes aegypti* (bảng 4).

Bảng 4. Khả năng diệt bọ gây muỗi *Aedes aegypti* của các chủng Bti phân lập

Ký hiệu chủng	Dịch nuôi cấy (µl)	Lượng nước (ml)	Ấu trùng muỗi (con)	Tỷ lệ chết sau 28 giờ (%)
VN 1	100	100	20	85
VN 2	100	100	20	80
VN 3	100	100	20	95
VN 4	100	100	20	90
VN 5	100	100	20	95
VN 6	100	100	20	95
1884	100	100	20	80
ĐC	100	100	20	5

Để so sánh hiệu lực diệt bọ gây muỗi của chủng phân lập với 2 chủng chuẩn có hoạt lực cao: ORN-60A và Bti 1884 (chủng được Trung tâm Quốc tế về *Bacillus* diệt côn trùng sử dụng để tạo chế phẩm diệt muỗi chuẩn IPS 78 và IPS 82), chúng tôi đã tạo chế phẩm Bti dạng bột và thử nghiệm với *Aedes aegypti* và *Anopheles dirus*. Kết quả cho thấy chế phẩm Bti tạo ra từ chủng phân lập VN 6 có hoạt lực cao hơn. Các chủng Bti từ các chủng chuẩn 1884 và ORN-60A trong cùng điều kiện như nhau. LC_{50} của chế phẩm Bti VN 6: 0,03 mg/l trong khi chế phẩm Bti 1884: 0,05 mg/l, chế phẩm Bti ORN-60A: 0,23 mg/l (bảng 5).

Bảng 5. Kết quả thử chế phẩm Bti với bọ gây *Aedes aegypti*

Ký hiệu chế phẩm	LC_{50} (mg/l)	LC_{90} (mg/l)
Bti VN 6	0,0302	0,1023
Bti 1884	0,0542	0,1514
ORN-60A	0,2344	0,8414

III. KẾT LUẬN

- Đã phân lập và phân loại thành loài phụ 8 chủng Bt trên cơ sở typ huyết thanh. Có 6 chủng thuộc typ huyết thanh H14 (*Bacillus thuringiensis israelensis*), 1 chủng thuộc typ huyết thanh H 3a, 3b, 3c (*Bacillus thuringiensis kurstaki*) và 1 chủng thuộc typ huyết thanh H 11a, 11b (*Bacillus thuringiensis toumanoffi*).
- Đã tuyển chọn các chủng Bti diệt muỗi dựa trên các đặc điểm về hình dạng tinh thể, typ huyết thanh, thành phần protein tinh thể và lớp gen cry.
- Đã nhận được chủng Bti VN 6 có hoạt lực cao với ấu trùng muỗi *Aedes aegypti* (muỗi truyền bệnh sốt xuất huyết) tương đương và cao hơn chủng chuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barjac.H and Frachon.E, 1990.
Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. 35 (2): 233-240.
2. Carozzi N.B, Kramer V.C, Warren G.W, Evola.S and Koziel M.G, 1991.
Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *App. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.
3. Dulmage H.T, Correa J.A and Martiniz A.J, 1970.
Co-precipitation with lactose a means of recovering the spore crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J.Invert.Parhol.* 15: 15-20.
4. Hofte.H and Whiteley H.R, 1989.
Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
5. Lammli U.K, 1970.
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Natural* 227: 680-685.
6. Lacey A.L, 1997.
Laboratory bioassay of bacteria against aquatic insects with emphasis on larvae of mosquitoes and black flies. *Manual of Techniques in insect pathology*. ISBN 0-12-432555-6. Academic press limited: 80-90.
7. Thiery and Frachon.E, 1997.
Identification, isolation, culture and preservation of Entomopathogenic bacteria. *Manual of Techniques in Insect pathology*. ISBN 0-12-432555-6. Academic press limited: 56-57.
8. Travers R.S, Martin P.A and Reichelderfer C.F, 1987.
Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1263-1266.

ISOLATION AND SELECTION OF *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* WITH HIGH TOXICITY AGAINST *Aedes aegypti* LARVAE

Vo Thi Thu, Nguyen Kim Thoa, Nguyen Thi Huong

SUMMARY

8 *Bacillus thuringiensis* strains were isolated from samples collected in Vietnam. The classification of *Bacillus thuringiensis* isolates according to H serotype showed that 6 isolates were grouped into serotype H14 (*Bacillus thuringiensis israelensis* -Bti), one was belong to serotype H3a, 3b, 3c (*Bacillus thuringiensis kurstaki*) and the last was *Bacillus thuringiensis toumanoffi* (H 11a, 11b).

The toxicity against mosquito larvae of Bti isolates were screened on the base of shapes of crystal inclusions, protein composition and cry genes. The laboratory bioassay of Bti isolates against *Aedes aegypti* showed that the isolate Bti VN 6 induced as high toxicity as International standard Bti strain 1884.

1.0.3

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC DIỆT ẤU TRÙNG MUỖI

Nguyễn Kim Thoa⁽¹⁾, Nguyễn Thị Hoa⁽¹⁾, Trần Văn Sỹ⁽¹⁾

Đinh Thị Ngọc Tuyết⁽²⁾, Võ Thị Thứ⁽¹⁾

(1): VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

(2): VIỆN PASTEUR NHA TRANG

I. MỞ ĐẦU

Hiện nay, một trong những biện pháp an toàn và hiệu quả được Tổ chức Y tế thế giới (W.H.O) lựa chọn để diệt trừ tận gốc bệnh sốt rét, sốt xuất huyết và những bệnh do muỗi truyền là sử dụng chế phẩm sinh học được sản xuất từ loài *Bacillus sphaericus* (Bs) và loài phụ *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Chế phẩm sinh học có ưu điểm hơn các chế phẩm hoá học khác là không gây ô nhiễm môi trường, đặc biệt là không ảnh hưởng đến sức khoẻ của cộng đồng.

Ở Việt Nam, các nhà nghiên cứu và sản xuất rất quan tâm đến việc sản xuất ra loại chế phẩm sinh học diệt trừ ấu trùng muỗi nhằm hạn chế những ảnh hưởng của biện pháp diệt muỗi hoá học. Với mục đích này, chúng tôi đã nghiên cứu quy trình lên men các chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* và thăm dò việc thu hồi chế phẩm *Bacillus thuringiensis israelensis* trong phạm vi phòng thí nghiệm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

- Chủng Bti 1884 nhận từ Trung tâm Quốc tế về *Bacillus* diệt côn trùng, Viện Pasteur Paris.
- Chủng Bti ORN-60A nhận từ Trung tâm Quốc tế về Công nghệ Gen và Công nghệ Sinh học, New Delhi, Ấn Độ.
- Chủng Bti VN6 phân lập ở Hoài Đức, Hà Tây, Việt Nam

2. Phương pháp

- Định lượng protein tổng số theo Lowry [1].
- Điện di protein theo Laemmli [5].
- Chuẩn bị chế phẩm Bti và đánh giá khả năng diệt muỗi [4].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu có nguồn gốc khác nhau. Chủng Bti 1884 do Singer, S và Margalit phân lập tại Israel năm 1979. Chủng có hoạt lực cao với bọ gây *Aedes aegypti* nên được Trung tâm Quốc tế về *Bacillus* diệt côn trùng (B.E.C) sử dụng để sản xuất chế phẩm IPS 82 chuẩn. Chủng Bti ORN-60A (HD 567) được Margalit phân lập ở Israel năm 1977 và chủng Bti VN6 được phân lập ở Hoài Đức, Hà Tây, Việt Nam. Cả 3 chủng đều được Trung tâm Quốc tế về *Bacillus* diệt côn trùng, Viện Pasteur Paris xác định typ huyết thanh H₁₄. Theo De Barjac, hầu hết các chủng *Bacillus thuringiensis* thuộc typ huyết thanh H₁₄ đều có hoạt lực diệt côn trùng 2 cánh (muỗi, ruồi đen) [3].

Mục đích của chúng tôi là chọn được chủng có khả năng tổng hợp protein cao và nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy nhằm đưa ra được quy trình sản xuất chế phẩm sinh học diệt muỗi trong phạm vi phòng thí nghiệm.

1. Lựa chọn chủng thích hợp

Môi trường GYS (cao men, K₂HPO₄, glucoza) được sử dụng để nghiên cứu so sánh khả năng tổng hợp protein của các chủng nghiên cứu trong điều kiện nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở 28°C. Kết quả cho thấy, sau 24 giờ lên men, 3 chủng nghiên cứu đã đạt tới pha sinh trưởng ổn định và lượng protein ở mức tối đa. Lượng protein tổng hợp được của chủng VN6 và chủng 1884 tương đương (khoảng 300µg/ml) và cao hơn chủng ORN-60A (bảng 1). Bởi vậy, chúng tôi chọn chủng Bti VN6 và 1884 để nghiên cứu lên men, thu hồi chế phẩm diệt muỗi.

Bảng 1. Sinh tổng hợp protein của các chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* trên môi trường GYS

Chủng	Thời gian lên men (giờ)					
	24		48		72	
	OD (660nm)	protein (µg/ml)	OD (660nm)	protein (µg/ml)	OD (660nm)	protein (µg/ml)
1884	0.85	305	0.85	310	0.85	310
ORN-60A	0.80	275	0.80	280	0.80	285
VN6	0.80	295	0.80	295	0.81	305

2. Lựa chọn môi trường thích hợp

Việc lựa chọn chủng thích hợp không thể tách rời việc lựa chọn môi trường thích hợp. Lựa chọn được môi trường thích hợp với chủng nghiên cứu sẽ mở ra triển vọng lớn trong việc nâng cao hiệu quả sản xuất chế phẩm *Bacillus thuringiensis* nói chung và Bti nói riêng. Vai trò của môi trường là cung cấp chất dinh dưỡng, năng lượng cho vi

khuẩn sinh trưởng và phát triển. Các chủng khác nhau có nhu cầu dinh dưỡng khác nhau. Chúng tôi đã lên men 2 chủng 1884 và VN6 cùng trên các môi trường LB (NaCl, cao men, peptone), NB (cao thịt, peptone, NaCl), GYS (cao men, glucoza, K_2HPO_4) và G (glucoza, các muối khoáng). Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh tổng hợp protein của chủng 1884 và VN6 trên các môi trường nuôi cấy

Môi trường	24 giờ				48 giờ			
	OD (660nm)		protein ($\mu\text{g/ml}$)		OD (660nm)		protein ($\mu\text{g/ml}$)	
	1884	VN6	1884	VN6	1884	VN6	1884	VN6
LB	0.98	0.90	380	365	0.99	0.89	405	360
NB	0.32	0.42	60	100	0.41	0.43	80	110
GYS	1.00	0.90	370	340	1.02	0.93	370	345
G	0.80	0.78	285	190	0.82	0.78	295	215

Qua đó thấy rằng 2 loại môi trường LB và GYS đều thích hợp để nuôi cấy 2 chủng 1884 và VN6. Trên 2 loại môi trường này cả 2 chủng đều tổng hợp lượng protein tương đương nhau, khá cao. Chúng tôi cũng chạy điện di protein tinh thể của chủng VN6 trên gel acrylamit (SDS-PAGE) để xem xét sự tồn tại các protein có hoạt lực diệt muỗi của tinh thể khi nuôi cấy trên các môi trường khác nhau (G, GYS, LB, Chess). Kết quả được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Điện di protein của chủng VN6 trên gel acrylamit

Cột 1: protein chuẩn (Phosphorylaza B: 97,4 kDa; Bovine Serum Albumin: 66,2 kDa; Glutamate dehydrogenaza: 55,0 kDa; ovalbumin: 42,7 kDa; Aldolaza: 40,0 kDa; Carbonic Anhydratase: 31,0 kDa); Cột 2: protein chủng VN 6 trên môi trường LB; Cột 3: protein chủng VN 6 trên môi trường Chess; Cột 4: protein chủng VN 6 trên môi trường GYS; Cột 5: Chủng VN 6 trên môi trường G

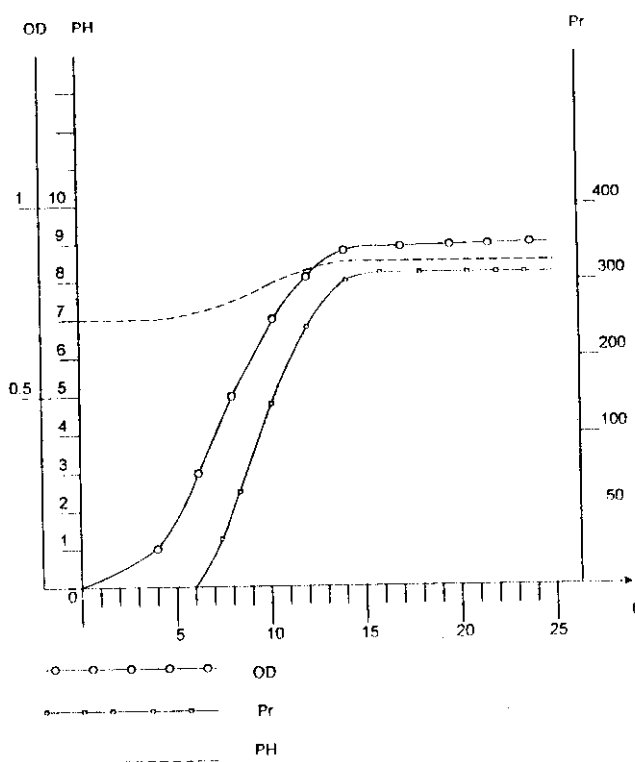
Qua hình 1 thấy rằng trên các môi trường GYS, LB, Chess sau 48 giờ đều phát hiện thấy các protein (130 kDa, 67 kDa, 28 kDa) của chủng Bti, song trên môi trường G vì lượng protein được tổng hợp ít hơn nên các protein có hoạt lực diệt muỗi cũng có nhưng không rõ.

3. Nghiên cứu động thái sinh trưởng và tổng hợp protein của 2 chủng *Bacillus thuringiensis israelensis* VN6 và 1884

Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học diệt muỗi, chúng tôi đã khảo sát sự phát triển, tổng hợp protein, sự biến đổi pH của môi trường khi nuôi cấy chủng 1884 và VN6 trên máy lắc với môi trường LB. Kết quả thu được thấy rằng sau 8 giờ nuôi cấy, chủng Bti 1884 bắt đầu tổng hợp protein và đạt cực đại vào giờ thứ 14. Từ giờ thứ 4 đến giờ thứ 6, chủng bước vào pha phát triển logarit và đạt cực đại về sinh trưởng vào giờ thứ 14 (hình 2). Đồng thời, giá trị pH cũng biến đổi đáng kể trong pha phát triển logarit.

Bảng 3. Sự sinh trưởng, tổng hợp protein và biến đổi pH của chủng 1884 theo thời gian lên men

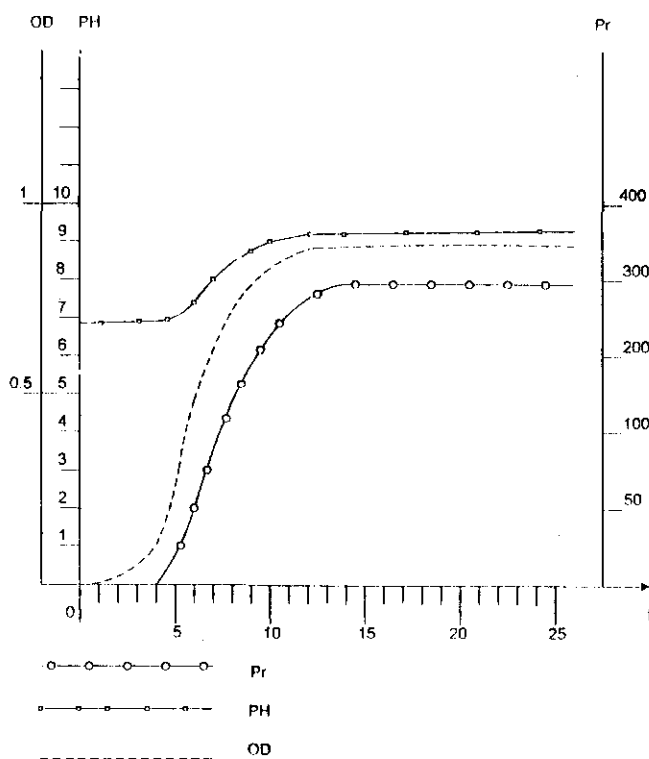
Thời gian (giờ)	OD (660 nm)	pH	protein ($\mu\text{g/ml}$)
2	0,025	7,0	0
4	0,12	7,0	0
6	0,31	7,18	0
8	0,51	7,46	50
10	0,70	7,53	130
12	0,80	7,97	240
14	0,89	8,5	315
16	0,89	8,5	320
18	0,89	8,5	315
20	0,89	8,6	315
22	0,89	8,51	315
24	0,89	8,52	315



Hình 2. Động thái phát triển của chủng 1884

So với chủng Bti 1884, chủng Bti VN6 có thời gian thích ứng với môi trường nhanh hơn (sau 4 giờ). Cả 2 chỉ tiêu OD (biểu thị mật độ quang sinh khối) và tổng hợp protein đều đạt giá trị cực đại vào giờ thứ 12 (hình 3). Qua đó thấy rằng với chế độ lên men được thực hiện (bình tam giác 500ml với 150ml môi trường, lắc 200 vòng/phút ở 28°C), sự tổng hợp protein và sự sinh trưởng của cả 2 chủng gần như xảy ra đồng thời. Sau 14 giờ nuôi cấy, chủng Bti 1884 đã tổng hợp được lượng protein ở mức tối đa còn chủng Bti

VN6 chỉ sau 12 giờ. Điều đó rất có ý nghĩa trong việc lên men chế phẩm sinh học diệt muỗi.



Bảng 4. Sự sinh trưởng, tổng hợp protein và biến đổi pH của chủng VN 6 theo thời gian lên men

Thời gian (giờ)	OD (660 nm)	pH	protein (µg/ml)
2	0,03	6,96	0
4	0,15	6,96	0
6	0,51	7,58	50
8	0,72	7,79	155
10	0,88	8,0	250
12	0,90	8,20	295
14	0,90	8,25	295
16	0,88	8,25	295
18	0,90	8,50	295
20	0,90	8,50	295
22	0,90	8,50	295
24	0,90	8,50	295

Hình 3. Động thái phát triển của chủng VN 6

4. Kết quả thử nghiệm hoạt lực diệt bọ gây muỗi *Aedes aegypti*

Chúng tôi đã nghiên cứu tạo chế phẩm Bti dạng bột và kết hợp với Viện Pasteur Nha Trang thử nghiệm hiệu lực diệt bọ gây muỗi *Aedes aegypti* tuổi 3 đầu tuổi 4 của 2 chủng 1884 và VN6. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả các lần thử tương tự nhau và được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thử nghiệm khả năng diệt bọ gây muỗi *Aedes aegypti*

Chế phẩm	Liều thử (mg/l)	Số lượng bọ gây (con)	Tỷ lệ (%) bọ gây chết với thời gian thử (giờ)				
			30 phút	1 giờ	1 giờ 30	2 giờ	24 giờ
1884	100	20	85	100	100	100	100
VN6	100	20	95	100	100	100	100
ĐC	0	20	0	0	0	0	0

Qua nghiên cứu chúng tôi thấy rằng chủng VN6 phân lập ở Việt Nam có hoạt lực diệt bọ gây không kém gì chủng chuẩn 1884 được dùng để điều chế chế phẩm Bti chuẩn IPS 82.

Chúng tôi cũng thăm dò liều thử thích hợp của chủng Bti 1884. Với liều thử thay đổi từ 100mg/l đến 1mg/l đều có thể diệt 100% bọ gây chỉ sau 2 giờ thử nghiệm. Điều này cũng có nghĩa rằng nồng độ 1mg/l vẫn còn là quá cao vì vậy cần phải thăm dò liều thử thích hợp để tìm giá trị LC_{50} .

Bảng 6. Kết quả thăm dò liều thử chế phẩm Bti 1884

Liều thử (mg/l)	Số lượng bọ gây (con)	Tỷ lệ % bọ gây chết với thời gian thử				
		30 phút	1 giờ	1 giờ 30	2 giờ	24 giờ
100	20	100	100	100	100	100
50	20	95	100	100	100	100
25	20	85	90	100	100	100
10	20	75	90	95	100	100
1	20	60	85	90	95	95
ĐC	20	0	0	0	0	0

Với những kết quả bước đầu như trên cho phép chúng tôi hy vọng và mong muốn sẽ nghiên cứu hoàn thiện quy trình lên men để sản xuất ra những chế phẩm diệt muỗi phục vụ cho việc phòng chống những căn bệnh trung gian do muỗi truyền sang cho người.

IV. KẾT LUẬN

- Đã lựa chọn được chủng Bti 1884 và Bti VN6 thích hợp cho việc sản xuất chế phẩm sinh học diệt muỗi.
- Đã khảo sát động thái sinh trưởng, tổng hợp protein của 2 chủng VN6 và 1884.
- Tạo chế phẩm Bti dạng bột và thử nghiệm hiệu lực diệt bọ gây muỗi *Aedes aegypti* (muỗi truyền bệnh sốt xuất huyết) của chủng VN6 và 1884. Kết quả cho thấy chế phẩm Bti của cả 2 chủng đều diệt 100% bọ gây chỉ sau 1 giờ thử nghiệm với nồng độ 100 mg/l.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lân Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đào Đức Trạch, Phạm Văn Ty, 1972.

Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật. Tập I, II. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật Hà nội.

2. Andrew.E.R, et al 1981.

Solubility of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* and presence of toxin protein during sporulation, germination and outgrowth. In sporulation and germination of *Bacillus*. Edited by Hillel. S. Levinson, American Society for Microbiology, Washington D.C.

3. Barjar.D & Frachon.E, 1990.

Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga 35(2): 233-240.

4. Barjar. H & Sutherland.D.J, 1990.

Bacterial control of Mosquitoes and Black flies. Rut gens University press.

5. Laemmli U.K, 1970.

Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Natural 227: 680-685.

STUDYING ON LARVAE MOSQUITO TOXIN PRODUCTION

Nguyen Kim Thoa, Nguyen Thi Hoa,
Tran Van Sy, Dinh Thi Ngoc Tuyet, Vo Thi Thu

SUMMARY

Two strains (Bti VN6 and the standard strain Bti 1884) were studied on production of mosquito toxin proteins. Both of them are able to grow and synthesise protein in LB and GYS media with large amount.

The pattern of growth and crystal toxin protein in LB medium of Bti VN6 and Bti 1884 were studied. Within the first 4-6 hours, the cells of both strains entered stationnary phase and a maximum level of growth and protein observed by 14 hours (Bti 1884) and 12 hours (Bti VN6).

The toxin activities for larvae mosquitoes were tested against *Aedes aegypti*. Bioassay showed that product of isolated VN6 were as toxic as product of standard Bti 1884. Both of them could kill 100% larvae mosquitoes with concentration 1 mg/l within hour.

1.0.4

SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC DIỆT SÂU *Bacillus thuringiensis* TRÊN HỆ THỐNG LÊN MEN CHÌM

Nguyễn Văn Thuởng, Nguyễn Quỳnh Châu, Ngô Đình Quang Bình*
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Ngày nay việc dùng tràn lan các loại thuốc hoá học trong công tác bảo vệ thực vật đã đem lại nhiều tác dụng xấu cho môi trường, ảnh hưởng tới sức khoẻ con người, động-thực vật và một số côn trùng có ích. [4; 5; 6]. Do vậy nhiều nước trên thế giới đã và đang tìm kiếm các loại thuốc sinh học an toàn hơn để hạn chế và thay thế dần các loại thuốc hoá học phổ biến hiện nay. [15]. Trong số các loại thuốc trừ sâu sinh học thương phẩm thì các chế phẩm từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (BT) chiếm tới 90%. Loại chế phẩm này đem lại hiệu quả rất lớn và đang có xu hướng được chú trọng phát triển vì tính không độc của nó đối với người, động vật, thực vật, môi trường và khả năng diệt sâu một cách chọn lọc.

Khả năng gây bệnh và tính đặc hiệu của chế phẩm *Bacillus thuringiensis* được xác định là các tinh thể độc tố có bản chất protein, chủ yếu là các loại delta-endotoxin (δ -endotoxin). Protein tinh thể được tổng hợp ở giai đoạn hình thành bào tử và tập trung tạo ra hệ tinh thể nội bào tử điển hình. Tinh thể có thể chiếm tới 30% trọng lượng của bào tử và phần lớn các chủng *Bacillus thuringiensis* tổng hợp ra nhiều dạng protein tinh thể. [4]. Từ những dạng khác nhau, có nhiều loại δ -endotoxin cùng họ, gắn với nhau bằng cầu disulfur và liên kết kỵ nước. Hình dạng của các protein tinh thể khác nhau: hình thoi, hình tháp, hình tròn, hình vuông và vô định hình. [9, 14]. Tới nay, qua nhiều nghiên cứu người ta đã biết có 25 gen mã hoá tổng hợp protein tinh thể mà mỗi gen mã hoá cho một loại δ -endotoxin. Gen khu trú trong các plasmid của tế bào. Trọng lượng phân tử của endotoxin là khoảng 130 hoặc 70 kDa. Sau khi được côn trùng tiêu hoá loại 130 kDa bị các enzym proteaza trong ruột phân cắt thành 2 đoạn: 60 kDa (phần đầu -C) và 70 kDa (phần đầu -N) chỉ có loại sau có tính độc. Cry 130 kDa là những tiền độc tố (protoxin), phần đầu -C được gắn vào quá trình tinh thể hoá.

Khi sâu ăn phải BT, vài phút sau khi tiêu hoá rình thể đi vào ruột giữa hoà tan và giải phóng độc tố hoặc tiền độc tố. Các chất này được các enzym proteaza tiêu hoá chuyển thành các đoạn mang độc tính, gồm khoảng 620 axit amin dễ gắn chặt vào các thụ thể màng ruột. Lúc này tế bào ruột bị biến đổi và tạo thành các lỗ rò để cho nước và các ion chảy vào làm cho tế bào phình lên, côn trùng ngừng ăn và chết. Ở những điều kiện thích hợp bào tử tái sinh và nhân lên rất nhanh, ruột hoàn toàn bị phá huỷ vì khuẩn tràn vào cả khoang nội cơ thể côn trùng. Vào giai đoạn cuối vòng nhiễm bệnh, xác côn trùng bị tan rữa và giải phóng bào tử vào môi trường bên ngoài.

Trên thế giới thị trường thương mại về thuốc BT đã có từ rất sớm. Được phát hiện từ đầu thế kỷ và đến giữa thế kỷ (1951- 1954) đã có các sản phẩm BT thương mại. Ngày nay các sản phẩm này rất phong phú. Ở Việt Nam do thói quen sử dụng thuốc hoá học vẫn còn do vậy việc ứng dụng thuốc trừ sâu vi sinh rất ít, một phần cũng do công nghiệp sản xuất chế phẩm sinh học chưa phát triển. Trong bài báo này chúng tôi giới thiệu qui trình sản xuất chế phẩm sinh học diệt sâu BT trên hệ thống lên men chìm ở dạng qui mô nhỏ và cũng hi vọng rằng Việt Nam sẽ sớm có nhà máy để sản xuất Bt công nghiệp.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên vật liệu

- Vật liệu dùng cho môi trường lên men Bt gồm có :

Nguồn hydrat cacbon gồm: Glucoza, Tinh bột, Bột ngô, Sacaroza, Rỉ đường, dầu thực vật.

Nguồn nitơ gồm Bột cá, bột đậu tương, khô lạc và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, casein.

Nguồn phosphat gồm : K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 .

Nguồn khoáng và vitamin gồm: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CaCO_3 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Nấm men.

2. Vi sinh vật

Các chủng *Bacillus thuringiensis* được phân lập, thu thập ở các tỉnh khác nhau của Việt Nam được giữ ở bộ sưu tập giống Viện Công nghệ Sinh học [3, 8, 9, 17]. VCM (Vietnam Collection Microorganisms).

3. Phương pháp

- Lên men được tiến hành theo phương pháp nuôi cấy chìm trên nổi lên men Bioflo III (6L), Bioflo IV (20L) và Bioflo 5000 (80L). Hệ thống lên men của Mỹ được lắp đặt tại Viện Công nghệ Sinh học.
- Thử hoạt tính các chủng phân lập trong phòng thí nghiệm theo phương pháp nhúng đĩa lá và thức ăn nhân tạo [9].
- Chế phẩm sau lên men được sử lý ở 2 dạng (sữa (lỏng) và bột thấm nước) và được bổ sung một số chất phụ gia như chất bảo quản, chất bám dính, v.v...

- Hiệu lực sinh học của chế phẩm được xác định theo phương pháp đếm bào tử và tính thể và thử hiệu quả diệt sâu trên các loại sâu tơ (*Plutella xylostella*) và sâu khoang (*Spodoptera litura*) trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng theo phương pháp của thạc sĩ Hoàng Thị Việt [4, 1].
- Phân tích Protein tính thể theo phương pháp của M. Marguerite 1992.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Lựa chọn môi trường tối ưu cho sản xuất chế phẩm BT

Môi trường thức ăn hết sức quan trọng cho sinh trưởng, phát triển và tổng hợp protein tính thể. Do vậy để lựa chọn được môi trường vừa cân đối về mặt dinh dưỡng cho sinh trưởng, phát triển và hình thành tính thể mặt khác lại vừa phù hợp với điều kiện sẵn có về nguyên liệu ở Việt nam và giá thành thấp là rất cần thiết. Chúng tôi đã sử dụng 9 môi trường có thành phần cơ bản giống nhau và bổ sung một số nguồn đường và nitơ khác nhau. Lên men trong thiết bị Bioflo III có dung tích 6L, pH=7, nhiệt độ 30°C, tốc độ thông khí 1 L/ph, DO $\approx$ 50-100%, tốc độ khuấy 250 v/ph. Thời gian lên men 48-72 giờ, đếm bào tử và tính thể trên buồng đếm hồng cầu Beker. Kết quả nêu ở bảng 1.

Bảng 1. Sự phát triển của Bt trên các môi trường

STT	Thành phần môi trường				Số lượng bào tử/ml
	Môi trường cơ sở	Bột đậu	Bột cá	Khô lạc	
1	+	5	0	0	$1,7 \times 10^8$
2	+	5	10	0	$4,32 \times 10^8$
3	+	1	15	0	$3,09 \times 10^8$
4	+	5	20	0	$2,58 \times 10^8$
5	+	0	0	15	$2,9 \times 10^8$
6	+	15	10	10	$4,38 \times 10^9$
7	+	15	10	15	$1,36 \times 10^9$
8	+	15	10	20	$2,2 \times 10^9$
9	Môi trường NB (đối chứng)				$9,7 \times 10^8$

Qua bảng 1 ta thấy các môi trường 6, 7, 8 thích hợp cho chủng Bt phát triển. Tính thể hình thành nhiều, kích thước lớn (1-2 μ l) bắt màu đẹp khi nhuộm với fushin base. Số bào tử khi kết thúc khá cao MT6: $4,38 \times 10^9$, MT7: $1,36 \times 10^9$, MT8: $2,2 \times 10^9$ bào tử/ml. Giá thành môi trường thấp và thời gian lên men ngắn 45-50 giờ.

2. Quy trình lên men *Bacillus thuringiensis*

Chuẩn bị 50 lít môi trường số 6 có công thức như ở trên và cho vào nồi lên men Bioflo 5000 có dung tích 80 lít. Thanh trùng 121°C với thời gian là 30 phút, làm lạnh tới 30°C thì cấy giống [7]. Giống Bt từ ống đông khô được hoạt hoá sang ống thạch nghiêng rồi môi trường nhân giống cấp 1 (bình tam giác), cấp 2 (Nồi lên men Bioflo III). Kiểm tra thấy giống sạch và phát triển tốt thì cấy giống vào nồi lên men, tỷ lệ cấy giống từ 2,5-5%.

- **Chế độ nhiệt:** Nhiệt độ của quá trình lên men được duy trì ở 30°C. Nếu nhiệt độ thấp hơn 25°C thì giống phát triển yếu và hiệu suất lên men thấp, còn nếu nhiệt độ cao hơn 35°C thì giống vẫn phát triển nhưng tinh thể hình thành rất bé. Nhiệt độ được duy trì ổn định nhờ hệ thống điều khiển nhiệt độ tự động bằng nước làm mát đã được khử ion Ca^{++} và Mg^{++} .
- **Chế độ pH:** pH của quá trình lên men được điều chỉnh tự động ở pH=7 nhờ có 2 bơm chứa 2 dung dịch KOH 2,5N và axit H_2SO_4 10%. Mặc dù chủng Bt có thể phát triển được trong khoảng pH từ 5,5-8,5.
- **Chế độ khuấy và thông khí:** Do môi trường giàu protein và dễ lắng nên trong quá trình lên men ta phải khuấy cho đều. Tốc độ khuấy là 250 v/ph, tốc độ này phụ thuộc vào từng giai đoạn phát triển của chủng mà có thể thay đổi. Tốc độ cấp khí là 1 lít/phút/lít môi trường và cũng điều chỉnh tùy vào từng giai đoạn phát triển của chủng. Nếu để thấp hơn thì giống phát triển nhanh và thời gian lên men ngắn nhưng tinh thể lại nhỏ.
- **Chế độ chống bọt:** Do môi trường giàu dinh dưỡng, khuấy và thông khí tạo bọt nhiều. Nếu chúng ta không phá bọt thì khi bọt dâng cao sẽ tự động bị đẩy ra ngoài làm giảm hiệu suất lên men. Dùng những chất chống bọt hữu cơ không ảnh hưởng tới quá trình lên men như Silicon, Polypropylen glycon, dầu đậu tương, dầu lạc..
- **Kết quả lên men:** Quá trình lên men được kết thúc khi mật độ bào tử và tinh thể đạt cực đại (trên 95%). Trong quá trình lên men chúng tôi tiến hành lấy mẫu định kỳ và kiểm tra sự sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp protein tinh thể bằng kính hiển vi quang học và bằng các phương pháp sinh học, sinh hoá. Tùy vào bản chất của giống, môi trường thức ăn và các điều kiện phát triển khác nhau mà quá trình lên men có thể kết thúc từ 36-72 giờ nuôi cấy. Chúng tôi đã tìm được quy trình lên men ổn định cho sản xuất của từng chủng Bt đối với từng loại chế phẩm.

Nếu sản xuất kéo dài liên tục trên cùng một thiết bị thì cứ sau vài mẻ ta lại thay đổi chủng một lần để tránh sự nhiễm phage. Tuy nhiên với thiết bị lên men của Viện Công nghệ sinh học có hệ thống thanh trùng tự động, thiết bị hoàn toàn kín khít và hệ thống cấp khí vô trùng chúng tôi chưa gặp phải hiện tượng này.

3. Thu hồi chế phẩm BT

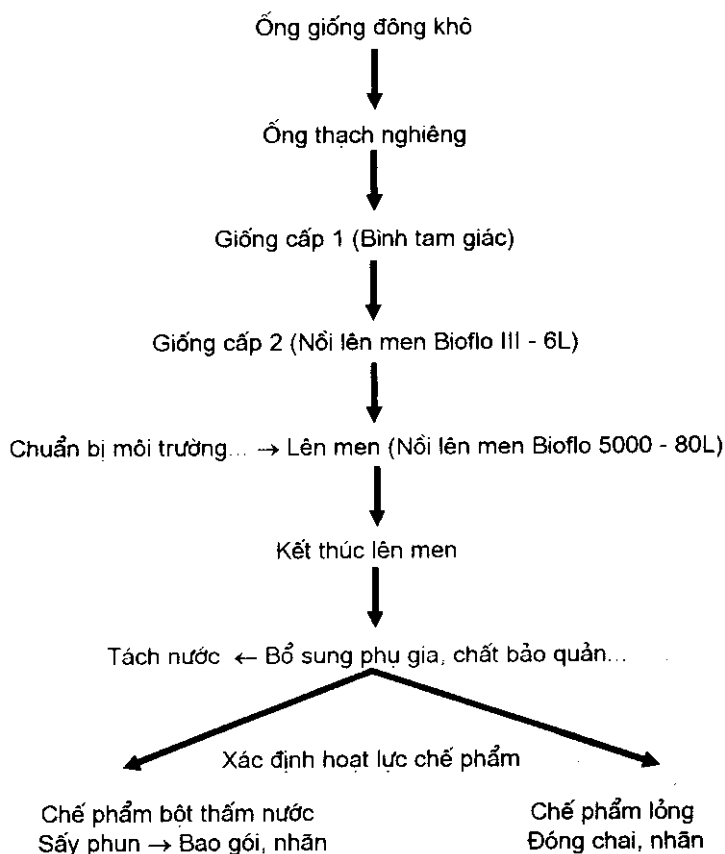
Dịch Bt sau khi lên men được giảm thể tích nước bằng cách ly tâm sau đó bổ sung chất bảo quản, chất đệm, chất bám dính... Cuối cùng được giữ ở 2 dạng:

- Dạng sữa (suspension): Chứa 4000 và 8000 IU/ml được đóng trong các chai màu 150-500ml. Tùy theo từng loại sâu, tuổi sâu có thể dùng từ 1-2L/ha.
- Dạng bột thấm nước (Wetable powder): Từ dịch lên men được tách bớt nước và sấy phun bằng máy sấy phun của Virtis (Mỹ), chứa 8000 và 16000 IU/mg.

4. Định lượng vi sinh vật và xác định hoạt tính chế phẩm

Sản phẩm được kiểm tra số bào tử sống bằng phương pháp đếm các bào tử nảy mầm trên đĩa thạch và protein tinh thể được phân tích theo phương pháp Marguerite và protein tổng số của Keldal [4]. Xác định hoạt lực của chế phẩm bằng phương pháp sinh học với chế phẩm chuẩn HD 1-5-1980 (Mỹ). Sau mỗi mẻ lên men chúng tôi đều gửi chế phẩm đến phòng Đấu tranh sinh học, Viện Bảo vệ thực vật để thử hoạt tính của chế phẩm trên sâu trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng. Đồng thời còn kiểm tra khả năng bảo quản chế phẩm định kỳ 3, 6, 9, 12 và 24 tháng [4].

5. Sơ đồ quy trình công nghệ



IV. KẾT LUẬN

- Đã lựa chọn được một môi trường thích hợp cho chủng Bt 12-3 sinh trưởng, phát triển và hình thành tinh thể cho lên men sản xuất chế phẩm BT chất lượng cao, nguyên liệu rẽ tiền và sẵn có.
- Đã xây dựng được một qui trình lên men thích hợp cho sản xuất chế phẩm BT với: Môi trường lên men rẽ và sẵn có; Nhiệt độ: 30°C; pH = 7; Tốc độ khuấy: 250 v/ph; Tốc độ thông khí: 1:1:1 (khí:lít/phút); Tỷ lệ cấy giống: 2,5-5%. Hoạt tính chế phẩm dạng sữa có 4000 và 8000 UI/ml, dạng bột thấm nước có 8000 và 16000 UI/mg.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Công Bình, Phạm Bá Nhạ, Ngô Đình Quang Bình, Lê Xuân Thuận, Lê Chiền Phương, Trần Lan Phương, 1978.
Hiệu lực diệt sâu của chế phẩm *Bacillus thuringiensis* sản xuất trong điều kiện phòng thí nghiệm. Báo cáo nghiên cứu khoa học 228-236.
2. Nguyễn Công Bình, Phạm Bá Nhạ, Ngô Đình Quang Bình, Lê Chiền Phương, Trần Lan Phương, 1982.
Kết quả nghiên cứu phương pháp sản xuất chế phẩm vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* diệt sâu. Báo cáo nghiên cứu khoa học Sinh vật học 247-253.
3. Ngô Đình Quang Bình, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn Văn Thường, Phạm Minh Hương, Vi Thị Đoàn Chính, 1995.
Nghiên cứu bảo quản lâu dài chủng giống vi sinh vật. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. 378-383.
4. Ngô Đình Quang Bình, Nguyễn Văn Thường, Nguyễn Quỳnh Châu, 1998.
Bảo cáo kết quả nghiên cứu sản xuất và ứng dụng thuốc trừ sâu vi sinh vật *Bacillus thuringiensis*. Đề tài KHCN 02-07.
5. Nguyễn Lân Dũng, 1981.
Sử dụng vi sinh vật để phòng trừ sâu hại cây trồng. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
6. Nguyễn Công Thuật, 1975.
Phòng trừ tổng hợp sâu bệnh hại cây trồng. nghiên cứu và ứng dụng. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.

7. Arcar. J., Yantorno O. et. al., 1984.

A new medium for growth and Delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*. Biotechnology letters. V6, N°8. 495-599.

8. Aronson A. I., 1994.

Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains and microsopic observation. International centre for Genetic Engineering & Biotechnology. 51.

9. Binh N. D., N. Q. Chau, N. V. Thuong, V. D. Chinh, N. H. Tram, Y. H. Je, J. H. Chang, S. K. Kang, 1998.

Isolation, Screening and Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Vietnam. Conference on 21 Century Biopesticides. Muju, Korea. October. 30-31.

10. Carlton B. C and Gonzalez J. M., 1985.

The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. D. A Dubnau (ed). The Molecular Biology of the Bacillus. 2. 211-249.

11. Dulmage H. T., 1970.

Production of the Spore delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two Fermentation media. Journal of Invertebrate Phatology. 16. 385-389.

12. Ertolar R., 1987.

Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. Argentina.

13. Luthy L., 1980.

Insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbial. Lett. 8. 1-7.

14. Philip F. Entwistle, Jenny S. Cory, Mark J. Bailey, Stephen Higgs, 1993.

Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice. John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane. Chichester. West Sussex PO19 1UD. England.

15. Powles R. J, Rogers P. L., 1989.

Bacillus toxins for insect control. A review Australian Journal of Biotechnology. V3. N°3. 223-228.

16. Su Y. Ch., Huang W. L., 1992.

Production and application of Spore-crystal complex from *Bacillus thuringiensis* culture. J. Chinese Agric. Chem. Soc. 30(4). 569-581.

17. Thiery and E. Frachon., 1997.

Identification, Isolation culture and preservation of entomopathogenic Bacteria. Biological techniques Manual of Technology in Insect Pathology. A academic press. 55-77.

PRODUCTION OF BIOINSECTICIDE FROM *Bacillus thuringiensis* IN THE SINK FERMENTATION SYSTEM

Nguyen Van Thuong, Nguyen Quynh Chau,
Ngo Dinh Quang Binh

SUMMARY

Today Bacillus thuringiensis is not only the most successful commercial microbial insecticide with worldwide application for improving the productivity of agriculture and health of forest ecosystem but it is also starting to replace conventional chemical insecticides in several areas of application.

A technological process of BT production in the sink fermentation system (capacity 6L, 20L, 80L) was developed two main BT preparation (suspension and wettable powder) have been formulated the suspensions concentrated (liquid formulations) contain 4-8000 IU/mL. The wettable powder with potency of 8000 and 16000 IU/mg were developed with the use Spray drying technique. BT suspension and wettable powder are able to retain their activity when stored at room temperature for 6 and 24 months respectively.

1.0.5

PHÁT TRIỂN VIRUS *Autographa californica* NUCLEAR POLYHEDRAL BACULOVIRUS (ACNPV) LÀM THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC

Vân Thị Hạnh⁽¹⁾, Nguyễn Thu Hằng⁽¹⁾,
Nguyễn Văn Uyển⁽¹⁾, Nguyễn Trọng Bình⁽²⁾

(1) : VIỆN SINH HỌC NHIỆT ĐỚI - TP. HỒ CHÍ MINH

(2) : 3191 WHITE SAND DRIVE SAN JOSE CA, USA

I. MỞ ĐẦU

AcNPV là một baculovirus được phân lập từ sâu đo cỡ linh lăng, là một virus được nghiên cứu rộng rãi nhất và là mô hình cho các nghiên cứu baculovirus hiện nay. Trong khi việc sử dụng đa số các baculovirus bị hạn chế bởi sự gây nhiễm rất đặc hiệu chủng, loài thì AcNPV có thể gây nhiễm ít nhất 32 loài trong số 12 họ còn trùng *Lepidoptera* [1]. Thuốc trừ sâu sinh học baculovirus có ưu điểm là dễ sử dụng, không gây ô nhiễm môi trường và vô hại đối với người, vật nuôi và cây trồng. Việc nuôi sâu *Spodoptera exigua* (Se) bằng thức ăn nhân tạo làm thuốc trừ sâu sinh học đã được tiến hành tại Viện Sinh học nhiệt đới. Se cũng bị gây nhiễm rất mạnh bởi virus AcNPV, do đó việc phát triển AcNPV làm thuốc trừ sâu sinh học có tác dụng kiểm soát đồng thời một số còn trùng gây bệnh địa phương. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành nhân AcNPV trên Se nuôi nhân tạo và nghiên cứu giảm thời gian gây chết sâu bằng cách bổ sung thêm một số chất hữu cơ sinh học.

II. VẬT LIỆU PHƯƠNG PHÁP

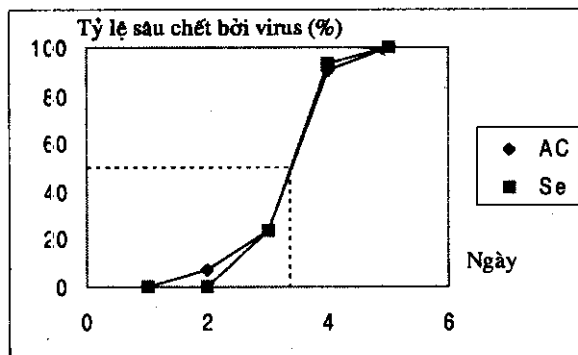
1. Tế bào côn trùng Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (Vaughn et al ..., 1977, ATCC, CRI 1711) nuôi cấy trong môi trường Sf - 900 theo phương pháp Max D. Summers và Gale E. Smith [2].
2. AcNPV (ATCC) nhân stock trong tế bào côn trùng Sf9 theo phương pháp Max D. Summers và Gale E. Smith [2].
3. *Spodoptera exigua* nuôi tại xưởng sản xuất thuốc trừ sâu sinh học Hóc môn Tp.HCM.
4. Chất bổ sung SA và B51 sản xuất tại phòng Vi sinh, Viện Sinh học nhiệt đới.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Gây nhiễm *Spodoptera exigua* với virus AcNPV và virus *Spodoptera exigua* (SeNPV) (hình 1)

Sâu ở giai đoạn tuổi 3 và 4. Mật độ dung dịch virus 3×10^6 PIB/ml. liều gây nhiễm 10 μ l/sâu. Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm

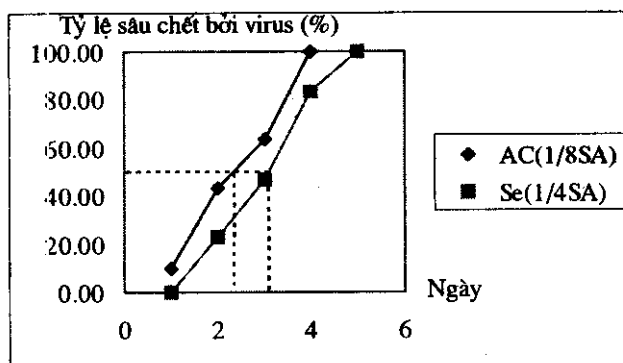
Kết quả cho thấy AcNPV có khả năng gây nhiễm giống như SeNPV. Sâu nhiễm với AcNPV thường có thể chết ngay một ngày sau khi gây nhiễm. Thời gian gây chết trên 50% sâu trong vòng 4 ngày



Hình 1. Khả năng gây nhiễm của AcNPV và SeNPV trên sâu

2. Ảnh hưởng của chất bổ sung SA đến tỷ lệ chết của sâu (hình 2)

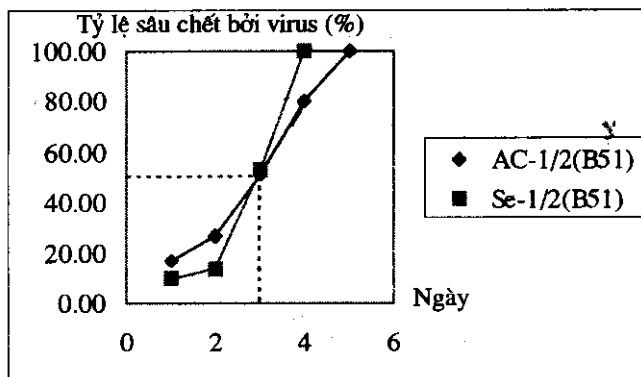
Sử dụng dung dịch SA 1% pha loãng 1/8 và 1/4 vào dung dịch virus AcNPV và SeNPV gây nhiễm cho sâu. Kết quả cho thấy sử dụng chất bổ sung làm giảm thời gian gây chết sâu chỉ còn trong vòng 3 ngày và tăng 10% tỷ lệ chết đối với AcNPV, 23% đối với SeNPV.



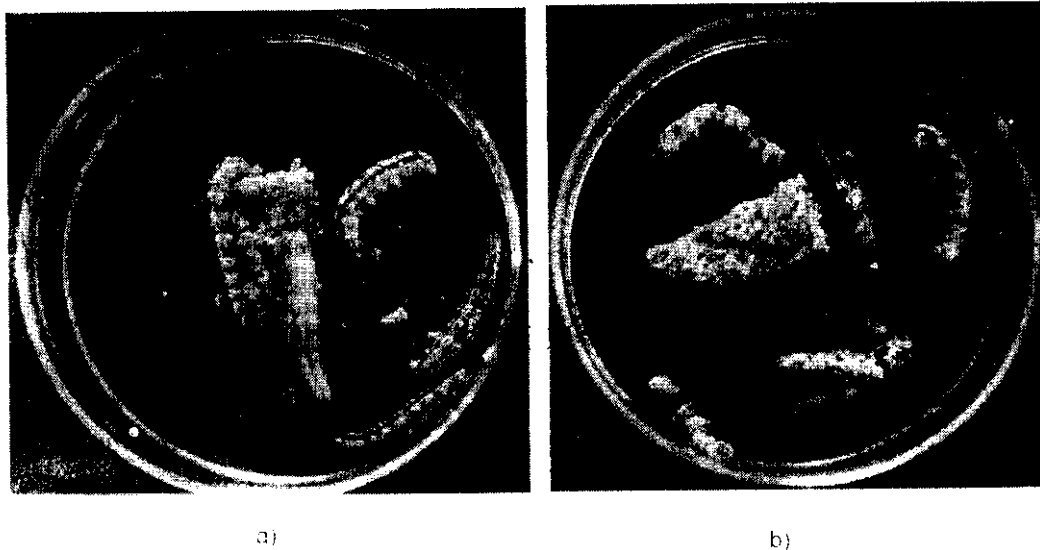
Hình 2

3. Ảnh hưởng của chất bổ sung B51 đến tỷ lệ chết của sâu (hình 3)

Sử dụng dung dịch B51 1%, pha loãng 1/2 đối với cả hai loại virus có tác dụng gây chết sâu ngay ở ngày đầu đối với AcNPV là 16% và 10% đối với SeNPV. Thời gian gây chết 50% giảm chỉ còn trong vòng 3 ngày.



Hình 3



Hình 4

- a) *Spodoptera exigua* đối chứng
b) *Spodoptera exigua* sau ba ngày gây nhiễm

IV. KẾT LUẬN

1. Kết quả thí nghiệm cho thấy AcNPV hoàn toàn có thể thay thế SeNPV trong việc kiểm soát sâu *Spodoptera exigua*.
2. Bổ sung các chất hữu cơ SA và B51 có tác dụng làm giảm thời gian gây chết 1 ngày và tăng tỷ lệ chết của sâu từ 10 - 49%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Volkman, L. E. and Keddie, B. A., 1990
Nuclear Polyhedrosis Virus Pathogenesis. Seminars in Virology, UC, Berkeley.
1:249 - 256.
2. Max D. Summers, Gale E. Smith, 1987
A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture
Procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, 1555: 5 - 8;
10 - 18.
3. Văn Thị Hạnh, Nguyễn Văn Uyên, 1997
Một số vấn đề trong nuôi cấy tế bào dòng côn trùng Sf9. Tạp chí Sinh học, 19
(1): 33 - 36.

**DEVELOPMENT OF AUTOGRAPHAL CALIFORNICA NUCLEAR
POLYHEDRAL VIRUS (ACNPV) AS BIOINSECTICIDE**

*Van Thi Hanh, Nguyen Thu Hang,
Nguyen Van Uyen, Nguyen Trong Binh*

SUMMARY

AcNPV is a baculovirus that can kill many kinds of insect. The use AcNPV supplemented with the bioorganic products produced in the Institute for Tropical Biology can decrease the time of killing insects and increase the number of mortality of insects from 10 to 40%.

1.0.6

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG NẤM CÓ ÍCH ĐỂ PHÒNG TRỪ CỎ LÔNG VỰC Ở VIỆT NAM

Nguyễn Văn Tuất, Trần Hữu Hạnh và CTV.

VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT

Cỏ dại là trở ngại chính ở vùng đồng bằng sông Hồng và đồng bằng sông Mê Kông - là hai vùng trồng lúa chính ở Việt Nam. Đã ghi nhận được 60 loài cỏ dại trên ruộng lúa cạn, 50 loài trên ruộng lúa nước và 37 loài trên ruộng lúa tưới. *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. và *Echinochloa colona* (L.) (cỏ lông vực nước và cỏ lông vực cạn) là hai loài phổ biến và gây hại nhất trên ruộng lúa, làm giảm đáng kể về năng suất và chất lượng lúa gạo.

Việc sử dụng ngày càng tăng thuốc trừ cỏ sẽ đẩy nhanh sự phát triển tính kháng thuốc trong quần thể cỏ dại và sẽ làm tăng mối lo ngại về môi trường và xã hội liên quan đến sử dụng thuốc bảo vệ thực vật. Sử dụng tác nhân sinh học phòng trừ cỏ dại là một trong các biện pháp chọn lọc hoặc là một biện pháp làm giảm sự phụ thuộc hoá chất trừ cỏ.

Từ năm 1996 đến nay, Viện Bảo vệ thực vật đã hợp tác với Viện nghiên cứu nông nghiệp Bang New South Wales, Orange, Úc để nghiên cứu các tác nhân sinh học, chủ yếu tập trung trong nhóm nấm để trừ cỏ lông vực trên ruộng lúa ở nước ta.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Điều tra cỏ dại, thu thập các mẫu cỏ bị bệnh được thực hiện ở các tỉnh trồng lúa chính của đồng bằng sông Hồng, miền Trung và Nam bộ. Thời gian điều tra thu mẫu ở các giai đoạn khác nhau của cây lúa và cỏ, chú trọng các giai đoạn phát triển muộn của cây lúa. Các triệu chứng được chú ý như thối thân, thối đỉnh cây và đóm lá chết hoại.

Nấm được phân lập từ các mẫu bệnh cỏ và giám định theo khoa phân loại nấm của CABL. Tên khoa học của nấm được gửi đi Anh để giám định. Thử độc tính của các chủng nấm được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới theo phương pháp của Viện Bảo vệ thực vật và IMI (Anh).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Điều tra phân lập và giám định nấm

Đã điều tra được 52 loài cỏ thuộc 11 họ trên ruộng lúa của 9 tỉnh (Hà Nội, Hà Tây, Hải Phòng, Hưng Yên, Hải Dương, Hà Nam, Nam Định, Quảng Ninh, Nghệ An). Đã

thu thập được 91 chủng nấm từ cỏ bị bệnh tại các tỉnh nêu trên, trong đó 72 chủng nấm được phân lập từ *Echinochloa* spp.

Triệu chứng bệnh bao gồm đốm nâu, khô vằn, thối bẹ, gỉ sắt, đốm kim và thối thân. Đã phân lập được 54 chủng nấm từ lá, 9 từ bẹ, 6 từ thân và 2 từ rễ. Đã gửi 37 mẫu nấm đi Úc và Anh để xác định tên khoa học của nấm.

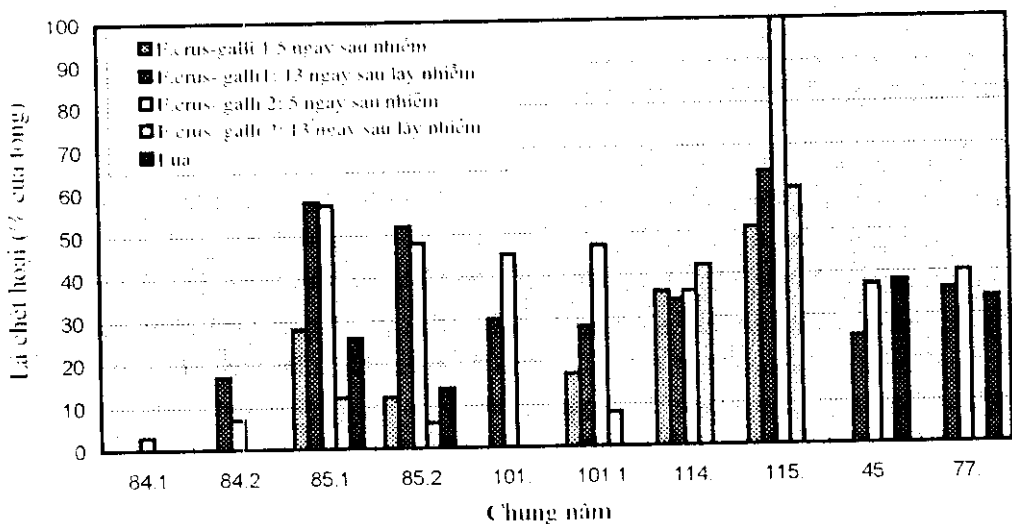
2. Thử độc tính bằng cách lây nhiễm đoạn lá cắt

Đã sử dụng các chủng nấm để đánh giá sức gây bệnh trên lúa (giống C71) và cỏ lông vện. Bằng phương pháp này đã xác định được 7 chủng gây bệnh đặc thù cho cỏ *Echinochloa crus-galli*, 10 chủng với lúa và 9 chủng nhiễm cho cả lúa và cỏ như nhau. Các chủng còn lại không gây được bệnh kể cả cho lúa cũng như *E. crus-galli*.

3. Thử độc tính lây nhiễm bằng cách lây nhiễm cây lúa.

Chiều cao của 2 loại hình *E. crus-galli* và 1 giống lúa (C71) được đo ở ngày thứ 17 sau khi lây nhiễm bằng 5 chủng *Exserohilum*. Đã xác định được 3 chủng (84.1; 84.2 và 85.2) làm giảm rõ rệt chiều cao cây của *E. crus-galli*. Chiều cao cây lúa hầu như không bị ảnh hưởng bởi các chủng đó.

Tỷ lệ diện tích lá bị nhiễm bệnh rất lớn trên cỏ *E. crus-galli* 2 (có bông màu hồng) khi lây bệnh bằng chủng 115. Chủng này cũng gây sự nhiễm bệnh cao cho lúa. Các chủng 84.1 và 84.2 tỏ ra gây bệnh nhẹ trên lúa (4.3% và 5.4% diện tích lá bị hại). Ba chủng 85.1; 85.2 đã có thể tiêu diệt một tỷ lệ cây của cả 2 dạng hình *E. crus-galli*, nhưng không hại lúa (hình 1).



Hình 1. Tỷ lệ chết hoại trên 2 dạng hình *E. Crus-galli* và 1 giống lúa ở thời kỳ 5 và 13 ngày sau lây nhiễm bằng 10 chủng *Exserohilum*. Đối chứng không lây nhiễm có tham gia trong thí nghiệm này và không có lá bị chết hoại

4. Thử nghiệm độc tính của các dòng nấm thuộc *Exserohilum monoceras***Bảng 1.** Tỷ lệ cây chết sau 10 và 15 ngày lây bệnh (%)

Chế độ sương (h)	Chủng nấm	Sau 10 ngày lây bệnh				Sau 15 ngày lây bệnh			
		CR203	IR50404	LV1	LV2	CR203	IR50404	LV1	LV2
8	85.1	0	0	85	95	0	0	100	100
	E10.97	0	0	65	100	0	0	100	100
	H6	0	0	0	0	0	0	0	10
	Đ/C	0	0	0	0	0	0	0	0
12	85.1	0	0	100	100	0	0	100	100
	E10.97	0	0	100	100	0	0	100	100
	H6	0	0	0	5	0	0	5	10
	Đ/C	0	0	0	0	0	0	0	0
24	85.1	0	0	100	100	0	0	100	100
	E10.97	0	0	100	100	0	0	100	100
	H6	0	0	10	5	0	0	20	10
	Đ/C	0	0	0	0	0	0	0	0

Ghi chú LV1: Cỏ lồng vực tím
LV2: Cỏ lồng vực trắng.

Kết quả trình bày trong bảng 1 cho thấy 2 chủng nấm thuộc *Exserohilum monoceras* 85.1 và E. 10.97 có độc tính cao đối với 2 loại hình cỏ lồng vực. Sau 10 ngày lây bệnh tỷ lệ cỏ chết là 85- 100% và sau 15 ngày thì cỏ lồng vực chết hoàn toàn bởi 2 chủng 85.1 và E. 10-97, trong khi đó chủng H6 chỉ gây chết cỏ 10- 20% sau 15 ngày lây bệnh và chế độ sương dài hơn (24 giờ). Thí nghiệm cũng cho thấy lúa ở tất cả các công thức đều không bị ảnh hưởng.

Theo dõi sự phục hồi của cỏ ở giai đoạn muộn hơn (25 ngày) cho thấy cỏ không có khả năng hồi phục.

Bên cạnh điều tra tỷ lệ cỏ chết, đã tiến hành theo dõi sự sinh trưởng của cỏ và lúa dưới tác động của các chủng nấm thông qua đo chiều cao cây. Nấm 85.1 và E. 10-97 có ảnh hưởng rõ rệt đến chiều cao cây cỏ lồng vực ngay từ ngày thứ nhất sau khi lây bệnh. Sau đó ở ngày thứ 5 một số cỏ đã bị chết và đến ngày thứ 10 đã biểu hiện cây bị lụi hết rõ rệt. Chiều cao của lúa không có sự sai khác giữa các công thức (giống CR 203 và IR 50404).

Trọng lượng khô là một chỉ tiêu để đánh giá về ảnh hưởng của quá trình bệnh lý đến cây trồng (bảng 2). Kết quả cho thấy 2 chủng nấm *Exserohilum monoceras* (85.1 và E10.97) gây hại nặng trên cỏ lồng vực nên trọng lượng khô cũng giảm hẳn so với công thức nấm H6 và đối chứng ở tất cả các chế độ sương và ở tất cả các lần lây bệnh khác nhau. Trọng lượng khô của lúa qua các lần lây nhiễm và ở các chế độ sương khác nhau nhìn chung có sự sai khác nhưng không rõ rệt.

Tóm lại qua 3 đợt thí nghiệm cho thấy rằng 2 chủng nấm 85.1 và E10-97 có độc tính cao đối với cỏ lồng vực và không ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và phát triển của lúa.

Bảng 2. Trọng lượng khô sau 15 ngày lây bệnh nhân tạo (mg)

Chế độ sương (h)	Chủng nấm	Cây trồng			
		CR 203	IR 50404	Cỏ LV tím	Cỏ LV trắng
	85.1	152.1b	145.7bc	0.0c	0.0b
	E10.97	150.6a	177.0a	0.0c	0.0b
8	H6	140.3ab	150.6bc	28.8b	34.0a
	Đ/C	105.2b	132.9c	35.9a	38.0a
	LSD05	41.7	19.4	3.95	8.03
	85.1	143.5b	179.6	0.0b	0.0b
	E10.97	202.2a	196.7	0.0b	0.0b
12	H6	156.6b	151.9	30.2a	35.9a
	Đ/C	158.3b	176.6	26.2a	36.1a
	LSD05	22.0	N.S	10.3	11.6
	85.1	83.8c	95.3	0.0c	0.0c
	E10.97	108.6a	112.4	0.0c	0.0c
24	H6	95.8b	98.8	10.5b	9.5b
	Đ/C	96.3b	89.0	17.2a	15.7a
	LSD05	8.19	N.S	4.46	4.7

III. KẾT LUẬN

Đã xác định được loài nấm *Exserohilum monoceras* (chủng 85.1) như là tác nhân sinh học có tiềm năng phòng trừ cỏ lồng vực trên ruộng lúa. Chủng 85.1 gây đốm lá và chết hoại hoàn toàn cây cỏ lồng vực ở giai đoạn 2-3 lá và trong điều kiện có thời gian phun sương là 8 giờ trở lên. Thời gian phun sương càng dài thì mức độ gây bệnh, tỷ lệ bệnh của nấm *Exserohilum monoceras* càng cao và cây bị chết càng sớm.

Nấm *E. monoceras* không gây hại đối với cây lúa cả về bệnh lý, triệu chứng bệnh, chiều cao cây và trọng lượng khô. Trên cơ sở đó đề nghị nghiên cứu các khía cạnh cần thiết để sử dụng nấm *E. monoceras* như là một loại thuốc trừ cỏ sinh học phòng trừ cỏ lồng vực ở nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Barker R., and Hayami Y, 1983.*

Weed control practices as a component of rice production systems. In "Proceedings of the Conference on weed control in rice". IRRI, Philippines.

2. *Watson A.K., 1992.*

Current status of bioherbicides development and prospects for rice in Asia. In "Proceedings of International Symposium on biological control and management of paddy and aquatic weeds in Asia". National Agricultural Research Center, Tsukuba, Japan.

3. *Nguyễn Văn Tuất, Hetherington S.D và Auld B.A, 1997.*

Triển vọng phòng trừ cỏ dại bằng biện pháp sinh học ở Việt Nam. Proceeding of a FAO Workshop. Ho Chi Minh City. 1997.

4. *Tuat N.V, S.D.Hetherington and B.A.Auld, 1999.*

A bioherbicide for *Echinochloa crus-galli* in Vietnam. Proceedings of the X Int'l Symposium on Biological control of weeds. Bozeman, Montana, USA. July 1999.

INVESTIGATION OF BENEFICIAL FUNGI TO CONTROL BARNYAS GRASS (*Echinochloa crus-galli*) IN VIETNAM

Nguyen Van Tuat, Tran Huu Hanh, et al.

SUMMARY

Grass weeds are a major problem in world agriculture because the principal food crops are member of the grass family. Selective control is difficult and expensive by conventional herbicides and hand- weeding is practised in many countries.

The use of naturally occurring fungal pathogens as bioherbicides is a possible alternative to control of grass weeds in rice.

*The work has identified species of *Exserohilum monoceras* as potential biological weed control agent. Isolates 85.1 and E. 10.97 cause leaf spots and blights and fully dead at 2-3 leaf stage and at 15 DAI with the minimum dew period of 8 h.*

The fungus does not cause any negative effect on the representative rice varieties, which are currently grown in the Red River and Mekong River Deltas of Vietnam.

*Weed are the major constraint on rice production in the Red River Delta and the Mekong Delta- Vietnam, which are the two most productive rice- growing areas. In Vietnam, there are 60 weeds species belonging to 16 families in upland rice, 50 species in wet- seeded rice and 37 species in transplanted rice. *Echinochloa crus-galli**

(barnyard grass) and *Echinochloa colona* (jungle rice) are the most common weeds in all rice growing provinces. The weeds cause a serious reduction in the quantity and quality of the rice crop.

Survey of the diseases of weeds on paddy field has been conducted in 9 provinces, on 52 weed species from 11 families. Ninety- one fungal isolates were collected from diseased weeds, of which seventy- two isolates were from *Echinochloa* spp. Isolation and identification of the disease symptoms have been undertaken both at NIPP, Australia and UK. Pathogenicity testing has been done in the two methods: inoculation of excised leaf pieces and of whole plants.

The isolates 85.1 and E.10.97 have been identified as *Exserohilum monoceras* showing very promising results on causing weed disease and plant death at 15 DAI and at 2-3 leaf old stage with the dew period ranged from 8- 24 h. These isolates appear to be safe to the rice plant, not causing any negative effect on the disease of plant, plant height and dry weight. The fungi can be used for the barnyard grass control in the rice field.

Địa chỉ: Nguyễn Văn Tuất

Viện Bảo vệ Thực vật

Chèm- Từ Liêm- Hà Nội

ĐT: 838 5578; Fax : 8363 563

E-mail: tuat@hn.vnn.vn.

1.0.7

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT VÀ THUỐC DIỆT KHUẨN LÊN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA VI SINH VẬT GÂY BỆNH TUA MỤC (WITCHES BROOM) TRÊN CÂY QUẾ TRÀ MY, QUẢNG NAM

Tống Kim Thuận, Bùi Thu Hà, Lý Kim Bàng
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

1. MỞ ĐẦU

Bệnh tua mục là một trong những bệnh nguy hiểm nhất đối với cây quế và Trà My, Quảng Nam. Khi bị bệnh tua mục, cây chậm phát triển [1], hàm lượng tinh dầu của cây quế bị giảm sút [2], gây tổn thất lớn cho ngành sản xuất quế.

Trên thế giới chưa có một công trình nào đề cập tới nguyên nhân gây bệnh tua mục trên cây quế và biện pháp phòng trừ. Cho đến năm 1995, ở Việt Nam chỉ có duy nhất một công trình về điều tra hiện trạng bệnh tua mục trên cây quế vùng Trà My và mối liên quan giữa căn bệnh này với các điều kiện ngoại cảnh (nhiệt độ, độ ẩm, độ cao so với mặt biển, giống cây ...) [1]. Lúc đầu, bệnh tua mục chỉ được phát triển ở trong rừng quế, nhưng về sau phát hiện thấy bệnh xuất hiện ở cả trong vườn ươm quế dưới dạng u, gai gần ngọn cây.

Trong các bài báo trước [3,4], chúng tôi đã trình bày kết quả phân lập vi sinh vật từ các bệnh phẩm của cây quế cũng như từ các côn trùng có mật độ cao trong rừng quế bị bệnh. Trong số các vi sinh vật đã phân lập được, tần suất gặp 2 chủng nấm sợi: *Mammaria cesati* M₉₆ và *Lacellinopsis subramanian* M₉₈ và một chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. TM₁ rất cao. Điều đó cho phép đưa ra giả định rằng, các chủng vi sinh vật này có nhiều khả năng gây bệnh tua mục ở cây quế Trà My. Để khẳng định giả định trên, chúng tôi đã tiến hành lấy nhiễm các chủng vi sinh vật đó vào 200 cây quế khỏe 2 năm tuổi tại vườn ươm Lâm trường Trà Giác, Trà My và quan sát khả năng nhiễm bệnh của chúng. Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở lô đối chứng không thấy xuất hiện các khối u, gai. Con trong tất cả các công thức của lô thí nghiệm đều quan sát thấy hiện tượng phát sinh u ở chỗ gây thương tích. Ở công thức thí nghiệm nhiễm hỗn hợp 2 loại nấm và 1 loại vi khuẩn thì tỉ lệ cây quế sinh khối u rất cao, tới 72%. Khi lấy nhiễm riêng lẻ từng loại vi sinh vật, tỉ lệ cây quế hình thành khối u rất thấp, chỉ đạt 2 - 8% [4]. Kết quả lấy nhiễm ngược này cho phép chúng tôi khẳng định sự hình thành khối u tại các điểm lấy nhiễm là kết quả của sự nhiễm vi sinh vật. Tác nhân gây nên khối u (giai đoạn đầu của bệnh tua mục) không phải là một loài vi sinh vật riêng rẽ mà là một hỗn hợp các vi sinh vật, cụ thể là hai loài nấm sợi *M. cesati* và *L. subramanian* và một loài vi khuẩn

Pseudomonas sp. Khối u trên cây quế thí nghiệm xuất hiện vào đúng thời gian bệnh tua mực phát triển ở môi trường tự nhiên.

Công việc nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi là tìm các biện pháp phòng trừ bệnh tua mực. Trong bài báo này, xin công bố kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) và thuốc diệt khuẩn lên sự sinh trưởng của các vi sinh vật gây bệnh tua mực cho cây quế Trà My.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

- 2 chủng nấm sợi *M. cesatii* M₂₉, *L. subramanian* M₂₈ và 1 chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. TM₁ được phân lập từ bệnh phẩm cây quế Trà My.
- Các loại thuốc BVTV: Viben-C50 BNT, Daconil 75 WP, Romycin 5 WP, Anvil, Tilt, Score của Việt Nam và được mua ở các cửa hàng thuốc BVTV Hà Nội.
- 2 loại thuốc diệt khuẩn: Chloramphenicol, Formaldehit 37% của Việt Nam, thuốc SEAL của Mỹ.
- Phương pháp thử hiệu lực diệt nấm của các thuốc BVTV lên sự sinh trưởng của 2 loài nấm gây bệnh tua mực: bổ sung vào môi trường thạch Czapek vô trùng các loại thuốc BVTV với các nồng độ khác nhau. Lắc đều, rồi đổ ra các đĩa Petri, sấy khô mặt thạch rồi cấy 2 loại nấm theo phương pháp cấy chấm ngược. Đĩa Petri được ủ ở nhiệt độ 30°C trong tủ ẩm. Sau 3 ngày, lấy ra quan sát và ghi kết quả. Hiệu lực của thuốc được biểu hiện qua đường kính của khuẩn lạc. Đĩa đối chứng không bổ sung thuốc BVTV.
- Phương pháp thử hiệu lực diệt khuẩn của các thuốc diệt khuẩn lên sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn *Pseudomonas* MT₁: nhỏ một giọt dịch huyền phù vi khuẩn lên đĩa thạch MPA và gạt đều. Lấy các mảnh giấy lọc tròn có đường kính 0,8cm thấm các loại thuốc diệt khuẩn với các nồng độ khác nhau đặt lên mặt thạch và ủ các đĩa Petri ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Sau đó, lấy ra quan sát và đo vòng vô khuẩn xung quanh giấy lọc.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thử nghiệm hiệu lực của một số thuốc BVTV lên sinh trưởng của hai loại nấm gây bệnh tua mực cho cây quế Trà My, Quảng Nam.

Từ bảng 1 cho thấy, với nồng độ thuốc chỉ dẫn thì trong 6 loại thuốc BVTV được thử nghiệm có 3 loại có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của cả hai loại nấm sợi. Đó là thuốc BVTV nhãn Tilt, Score và Viben.

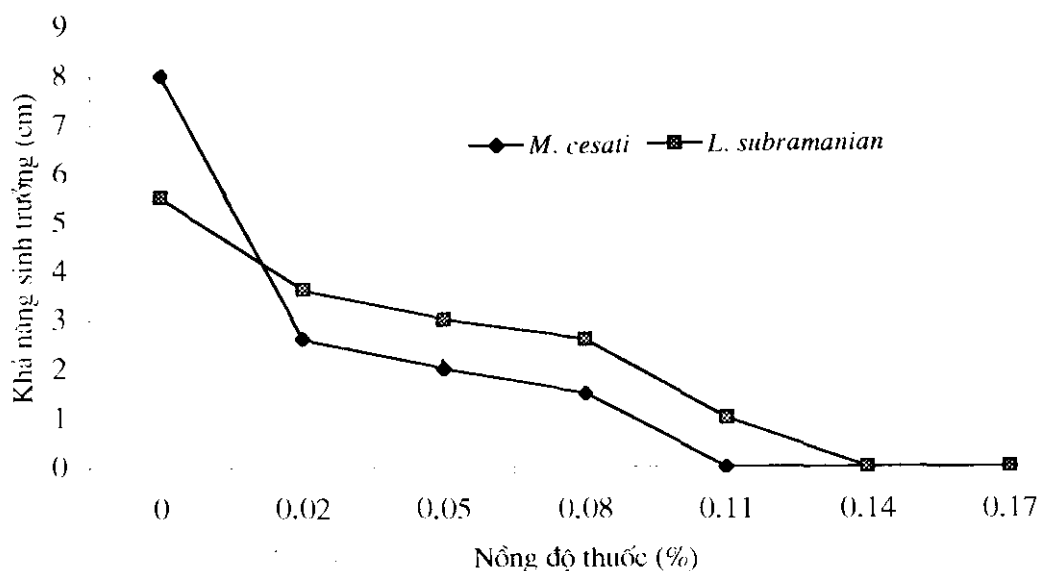
Ở nồng độ thuốc chỉ dẫn (0,01 và 0,11%), hai loại thuốc Anvil và Daconil chỉ có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của một loài nấm. Thuốc Anvil ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm *L. subramanian* và chỉ ức chế một phần sự sinh trưởng của nấm *L. cesatii*. Còn thuốc Daconil thì tác dụng ngược lại.

Bảng 1. Ảnh hưởng của một số thuốc BVTV lên sự sinh trưởng của 2 chủng nấm sợi gây bệnh tua mực cho cây quế Trà My.

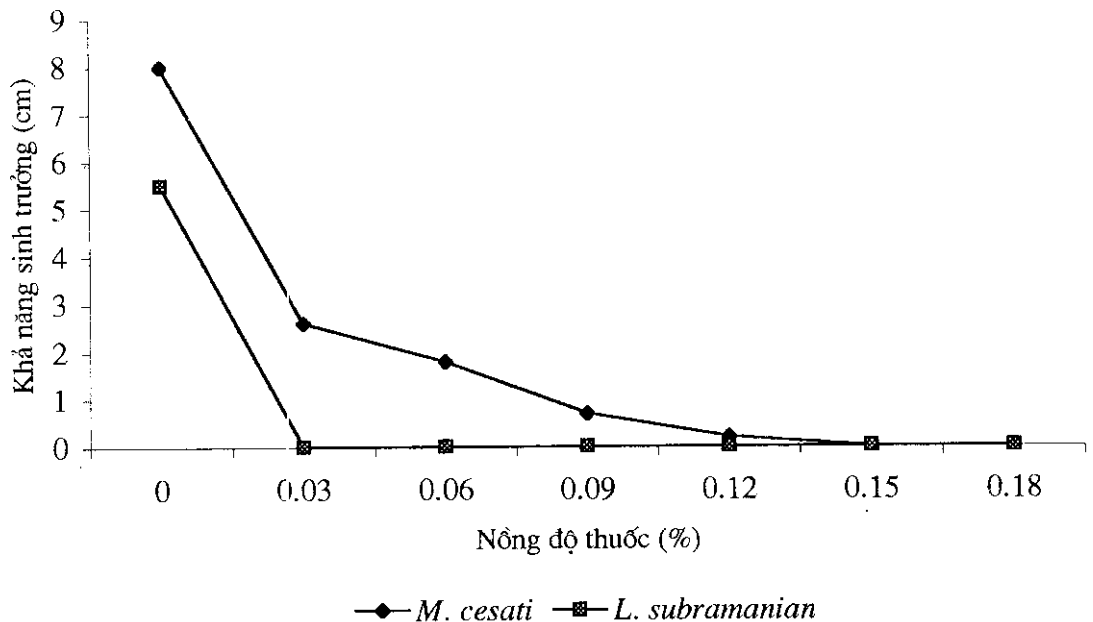
Số TT	Tên Thuốc	Nồng độ (%)	Đường kính khuẩn lạc (cm)				Tác dụng của thuốc	
			<i>L. subramanian</i> M ₂₈		<i>M. cesati</i> M ₂₉		<i>L. subramanian</i> M ₂₈	<i>M. cesati</i> M ₂₉
			ĐC	TN	ĐC	TN		
1	Viben-C50BNT	0,07	8	0	8	0	+++	+++
2	Daconil 75WP	0,11	8	3,3	8	0	++	+++
3	Anvil	0,01	8	0	8	1,5	+++	++
4	Romycin 5WP	0,12	8	8	8	8	-	-
5	Tilt	0,006	8	0	8	0	+++	+++
6	Score	0,02	8	0	8	0	+++	+++

Chú thích: +++: $0 < d < 1,5$ mạnh; ++: $1,6 < d < 4$ trung bình;
+: $4 < d < 8$ yếu; -: $d = 8$ không tác dụng

Trong 6 loại thuốc BVTV, duy nhất chỉ có thuốc Romycin không có tác dụng ức chế sự sinh trưởng của cả hai loại nấm trên. Thuốc này dễ bị vi sinh vật phân hủy làm mất hoạt tính diệt nấm. Thuốc Romycin là thuốc đặc trị đối với nấm *Rhizoctonia solani*, gây bệnh khô vằn trên lúa. Người ta cũng dùng loại thuốc này để phòng bệnh khoang dưa hấu, nấm hồng cao su [5].



Đồ thị 1. Ảnh hưởng của các nồng độ thuốc Daconil lên sự sinh trưởng của hai loại nấm *M. cesati* và *L. subramanian* gây bệnh tua mực cho cây quế Trà My, Quảng Nam



Đồ thị 2. Ảnh hưởng của các nồng độ thuốc Anvil lên sự sinh trưởng của hai loại nấm *M. cesati* và *L. subramanian* gây bệnh tua mực cho cây quế Trà My, Quảng Nam

Để tìm ra nồng độ tối ưu của thuốc Anvil và Daconil lên quá trình ức chế sinh trưởng của hai loại nấm gây bệnh tua mực cho cây quế. Chúng tôi tiến hành thí nghiệm với các nồng độ thuốc khác nhau.

Từ đồ thị 1, 2 ta thấy, sự sinh trưởng của hai loài nấm tỉ lệ nghịch với nồng độ thuốc trong môi trường. Nồng độ càng cao thì sự sinh trưởng càng giảm. Đối với thuốc Daconil thì nồng độ 0,14% ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của hai loại nấm. Riêng với thuốc Anvil, nồng độ thuốc ức chế sự sinh trưởng của hai loài nấm hoàn toàn khác nhau. Ở nồng độ thuốc rất thấp (0,03%) sự sinh trưởng của nấm *L. subramanian* đã hoàn toàn bị ức chế, còn đối với nấm *M. cesati* thì nồng độ thuốc phải tăng gấp 5 lần (0,15%) mới ức chế được sự sinh trưởng của chúng. Như vậy, có thể chọn nồng độ thuốc Anvil 0,15% để phòng trừ hai loại nấm trên.

2. Kết quả thử nghiệm hiệu lực của một số thuốc diệt khuẩn lên sự sinh trưởng của vi khuẩn *Pseudomonas* sp. TM₁

Từ bảng 2 ta thấy, 3 loại thuốc được thử nghiệm đều có hiệu lực diệt vi khuẩn *Pseudomonas* sp. TM₁. Hiệu lực diệt khuẩn tỉ lệ thuận với nồng độ của thuốc trong môi trường. Nồng độ thuốc càng cao thì đường kính vòng vô khuẩn càng lớn. Kết quả từ bảng 2 cho thấy, nồng độ thuốc tối ưu để ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn như sau: Chloramphenicol: 0,25%; SEAL: 0,05%; Formaldehit: 0,37%.

Bảng 2. Hiệu lực của thuốc diệt khuẩn đối với vi khuẩn *Pseudomonas* sp. TM, ở các nồng độ khác nhau

Số TT	Tên thuốc	Nồng độ thuốc (%)	Đường kính mảnh giấy tẩm thuốc (cm)	Đường kính vòng vô khuẩn d_1 (cm)	Đánh giá tác dụng thuốc
1	Chloramphenicol	2,5	0,8	2,7	+++
		0,25	0,8	2,6	+++
		0,19	0,8	1,9	++
		0,12	0,8	1,2	+
		0,06	0,8	0,8	-
2	SEAL	0,2	0,8	2,9	+++
		0,15	0,8	2,8	+++
		0,1	0,8	2,0	+++
		0,05	0,8	2,0	+++
3	Formaldehyt	3,7	0,8	2,7	+++
		0,37	0,8	2,6	+++
		0,27	0,8	1,7	++
		0,18	0,8	1,3	+
		0,09	0,8	0,8	-

Chú thích: +++ $1,9 < d_1 < 3,0$ mạnh; ++, $1,4 < d_1 < 1,9$ trung bình;
- $d_1 = 0,8$ không có tác dụng

3. Kiến nghị và biện pháp phòng trừ

Vì nguyên nhân gây bệnh tua mực là một hỗn hợp các vi sinh vật, bao gồm hai loại nấm mốc và một loại vi khuẩn nên trong việc phòng trừ phải sử dụng đồng thời cả hai loại thuốc: BVTV và diệt khuẩn. Từ những kết quả thí nghiệm nêu trên, kết hợp với các kết quả điều tra bệnh tua mực ở các rừng quế và vườn ươm ở Trà My, Quảng Nam [1]. Chúng tôi có thể đưa ra một số kiến nghị và biện pháp phòng trừ như sau:

Đối với cây quế trong vườn ươm và rừng quế dưới 5 tuổi: để diệt vi sinh vật gây bệnh tua mực cho cây quế Trà My nên sử dụng một trong những loại thuốc BVTV kết hợp với thuốc diệt khuẩn, có nồng độ như sau: Daconil: 0,14%; Viben: 0,07%; Anvil: 0,15%; Tilt: 0,006%; Score: 0,02%; Formaldehyt: 0,37%; SEAL: 0,05%; Chloramphenicol: 0,25%. Phải loại bỏ ngay các cây quế con bị bệnh trong vườn ươm.

Khi sử dụng thuốc cần có các dụng cụ bảo hộ lao động, tránh hiện tượng ngộ độc thuốc để bảo vệ sức khỏe cho công nhân.

Đối với những rừng quế từ 5 năm tuổi trở lên: không thể sử dụng các loại thuốc trên để phun vì cây quế cao và rậm, theo chúng tôi nên hạn chế bệnh hại bằng cách áp dụng các biện pháp phòng trừ như sau:

- Quế cần được trồng ở những điều kiện sinh thái thích hợp, không nên trồng ở những nơi đất trũng khó thoát nước, đặc biệt không nên trồng cây quế ở những vùng thấp vì đặc tính sinh học của cây quế chỉ thích hợp với vùng đất có độ cao từ 300 - 1000m.
- Sớm tỉa cành dưới tán và những cành, nhánh bị bệnh. Cắt bỏ những bộ phận bị bệnh hoặc có thể chặt bỏ những cây bị bệnh nặng.
- Thu nhặt các lá, cành, nhánh bị bệnh đem đốt hay đào hố sâu 20 - 30 cm chôn kín để diệt trừ nguồn bệnh lây lan.
- Thường xuyên làm đất và vệ sinh vườn trồng. Các biện pháp thường hay sử dụng là: xới, xáo đất, đào rãnh thoát nước, làm cỏ ... Qua đó, làm thay đổi điều kiện ngoại cảnh, tạo ra những điều kiện thuận lợi cho sinh trưởng và phát triển của cây quế.
- Cần phải trồng quế với một mật độ hợp lý, phù hợp cho sinh trưởng, phát triển của cây. Không nên trồng với mật độ quá dày để tránh xảy ra hiện tượng cạnh tranh về chất dinh dưỡng và ánh sáng giữa các cây chủ, làm giảm sức sinh trưởng và tính kháng bệnh của chúng.
- Sau 5 - 6 năm đầu, cần thường xuyên tỉa thưa những cành nhánh thấp, loại bỏ bớt những cây bị bệnh qua nặng, tạo cho khu vườn có độ thoáng cao. Qua đó, làm giảm sự tập trung sinh sống của các loại côn trùng truyền bệnh và hạn chế sự sinh trưởng phát triển của nấm bệnh, không chế sự lây lan của bệnh.

IV. KẾT LUẬN

1. 5 loại thuốc BVTV Viben - C50BN T, Daconil 75WP, Anvil, Tilt, Score và 3 loại thuốc diệt khuẩn SEAL, Formaldehit, Chloramphenicol đều có khả năng diệt vi sinh vật gây bệnh tua mực cho cây quế Trà My, Quảng Nam.
2. () nồng độ thuốc chỉ dẫn, 3 loại thuốc BVTV Viben, Tilt, Score có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của hai loại nấm *M. cesatii* M₇₈ và *L. subramanian* M₇₉. Hai loại thuốc Daconil và Anvil chỉ có khả năng kìm hãm một trong hai loài nấm trên.
3. Nồng độ tối ưu để diệt các vi sinh vật gây bệnh tua mực cho cây quế Trà My trong vườn ươm và rừng quế dưới 5 tuổi là : Daconil: 0,14%; Viben: 0,07%; Tilt: 0,006%; Score: 0,02%; Anvil: 0,15%; SEAL: 0,05%; Formaldehit: 0,37%.
4. Đối với cây quế trên 5 tuổi phải sử dụng các biện pháp phòng trừ. Trong đó, biện pháp vệ sinh rừng trồng quế là rất cần thiết. Đặc biệt, phải chú ý tới các biện pháp kĩ thuật lâm sinh như: giống cây, điều chỉnh mật độ, xử lý thực bì, phương thức trồng ...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Bá Hùng, 1996.

Bước đầu tìm hiểu một số bệnh chủ yếu gây hại quế ở huyện Trà My, Tỉnh Quảng Nam. Đà Nẵng. Luận văn cử nhân sinh học Huế.

2. Phạm Văn Lực, 1997.

Tìm hiểu nguyên nhân gây bệnh tua mực cho cây quế Trà My, Quảng Nam và biện pháp phòng chống Báo cáo sơ kết đề tài 2 năm 1996 - 1997. Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Hà Nội.

3. Tống Kim Thuận, Lý Kim Bằng, Phạm Văn Lực, 1998.

Phân lập và nghiên cứu các vi sinh vật có khả năng gây bệnh tua mực cho cây quế ở Trà My, Quảng Nam. Tạp chí Sinh học. Tập 20. Số 4. Trang 20 - 24.

4. Lý Kim Bằng, Tống Kim Thuận, Phạm Văn Lực, Hoàng Tiến Nam, 1999.

Vi sinh vật gây bệnh tua mực (witches broom) trên cây quế vùng Trà My, Quảng Nam. Tạp chí Sinh học năm 1999 (đang in).

5. Lương Duy Kính, Võ Văn Đức, 1992.

Sổ tay sử dụng nông dược (Hóa chất bảo vệ mùa màng và tăng trưởng cây trồng). Công ty thuốc sát trùng Việt Nam.

USING BIOCIDES IN PROTECTION OF THE CASSIA TREES FROM "WITCHES BROOM" DISEASE

Tong Kim Thuan, Bui Thu Ha, Ly Kim Bang

SUMMARY

Influence of the biocides as Daconil, Viben, Anvil, Tilt, Score, SEAL, Formaldehit and Chloramphenicol on the growth of microorganisms (M. cecati, L. subramanian and Pseudomonas sp.), caused "witches broom" disease on the cassia trees in Quangnam province was studied in the laboratory condition.

The obtained results show that:

- 1. All of 7 biocides were able to kill the microorganisms caused "witches broom" disease on the cassia trees in Quangnam province.*
- 2. The optimum concentrations of the biocides for killing microorganisms were below (%): Daconil 0,14; Viben 0,07; Anvil 0,15; Tilt 0,006; Score 0,02; SEAL 0,05; Formaldehit and Chloramphenicol 0,37.*

1.0.8

TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG *Bacillus subtilis* SINH ITURIN A NHƯ LÀ CHẤT DIỆT NẤM SINH HỌC TỪ ĐẤT VÀ LÁ CÂY VÀ NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ITURIN A.

Nguyễn Thụy Châu, Nguyễn Hương Trà, Bùi Hải Hoà,

Trương Thanh Bình, Trần Văn Tuan, Lê Hữu Hiền

BỘ MÔN VI SINH- VIỆN CÔNG NGHỆ SAU THU HOẠCH

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc sử dụng quá mức các thuốc trừ dịch hại hoá học đã gây nên sự ô nhiễm môi trường và các tác dụng độc hại đối với người và động vật kinh tế. Do đó việc sử dụng các tác nhân phòng chống sinh học để phòng trừ dịch hại, trong đó có các nấm mốc và độc tố của chúng đã thu hút sự chú ý của nhiều nhà khoa học. Vi khuẩn gram âm, đặc biệt là các *Pseudomonas* đã được tập trung nghiên cứu như là tác nhân phòng chống sinh học. Vi khuẩn gram dương như các loài *Bacillus* được xem như là tác nhân phòng chống sinh học an toàn. Trong những năm gần đây nhiều công trình nghiên cứu của một số nước như Nhật bản, Hàn quốc, Pháp, Mỹ đã nghiên cứu việc sản xuất kháng sinh Iturin A từ *Bacillus subtilis*. Iturin A là lipopeptid mạch vòng gồm 7 gốc aminoacid L- Asp-D-Tyr-D-Asp-L-Gln-L-Pro-D-Asp-L-Ser và một gốc β -aminoacid. Hoạt tính kháng sinh của Iturin A rất mạnh. [13] Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành phân lập tuyển chọn các chủng *Bacillus subtilis* sinh Iturin A và nghiên cứu công nghệ sản xuất Iturin.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

1. Đối tượng nghiên cứu

- 115 mẫu lá cây, 110 mẫu đất ở các vùng khác nhau của miền Bắc.

2. Các môi trường

Môi trường lên men vi khuẩn *Bacillus subtilis*

- Môi trường MT1 (g/l): Dịch chiết khoai tây 1000ml; 20g glucoza; pH: 6,7-6,8.
- Môi trường MT2(g/l): 30 g sacaroza; 10 g soybean, 5g cao nấm men; 5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5g K_2HPO_4 ; 0,5g MgSO_4 ; 0,004g MnCl_2 ; 0,005g CaCl_2 ; 0,025g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7.

- Môi trường MT3 (g/l): 20g Saccaroza, 4g cao nấm men, 4g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5g K_2HPO_4 , 0.5g MgSO_4 , 0.004g MnCl_2 , 0.005g CaCl_2 , 0.025g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7.
- Môi trường MT4 (g/l): 1g cao nấm men, 250ml nước chiết thịt; 7.5g pepton, 5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5g K_2HPO_4 , 0.5g MgSO_4 , 0.004g MnCl_2 , 0.005g CaCl_2 , 0.025g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7.

2. Phương pháp

1. Phân lập và phân loại *Bacillus subtilis* từ lá, đất

Cần 1g mẫu lá hoặc 0.5g đất cho vào mỗi ống nước đã thanh trùng. Lắc các ống nghiệm trong 30 phút ở 30°C, sau đó diệt thực thể ở nhiệt độ 80°C/3-5 phút. 0.2ml hỗn dịch trên cho vào đĩa Petri có chứa môi trường MT1, trang đều bằng que gạt thủy tinh. Nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, sau 24 giờ lấy ra quan sát và phân loại *Bacillus subtilis* theo khoa phân loại Bergey.

2. Lên men *Bacillus subtilis* cho sự tạo Iturin A

Tiến hành theo phương pháp của N.Kimura và M.Ono [7].

Môi chủng *Bacillus subtilis* được lên men ở 4 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau là MT1, MT2, MT3, MT4 trên máy lắc trong thời gian từ 2-4 ngày. Dịch lên men được ly tâm 7000/10 phút, loại bỏ kết tủa, thu dịch nổi.

3. Thử khả năng ức chế của Iturin A sinh ra từ *Bacillus subtilis* lên sự phát triển của nấm mốc *Aspergillus flavus*.

Tiến hành theo phương pháp của N.Kimura và M.Ono [7].

Môi trường PDA có chứa 2 ml dịch nổi có Iturin A thu được sau khi ly tâm dịch lên men *Bacillus subtilis* được phân phối vào các đĩa petri vô trùng. Cấy vào giữa đĩa 1 vòng que cấy dịch bào tử nấm mốc *Aspergillus flavus* có mật độ 10^7 bào tử/ml. Nuôi ở nhiệt độ 28°C, đo đường kính khuẩn lạc của nấm mốc *Aspergillus flavus* để xác định khả năng ức chế ở khoảng thời gian 3, 5, 7 ngày, theo thứ tự. Hoạt tính ức chế nấm mốc của Iturin A sinh ra từ *Bacillus subtilis* được đánh giá gián tiếp bằng đường kính khuẩn lạc của *A.flavus* phát triển trên môi trường PDA có bổ sung 5% dịch Iturin A.

4. Thu kết tủa từ dịch nổi

Tiến hành 3 phương pháp để thu kết tủa.

- Phương pháp thu tủa bằng cồn.

Tiến hành theo phương pháp của N.Kimura và M.Ono [7]

- Phương pháp thu tủa ở điểm đẳng điện.

Tiến hành theo phương pháp của Bok. S. H. và cộng sự [3]

- Phương pháp thu tủa bằng sunphat amôn

Tiến hành theo phương pháp của P.R. Foster [5]

5. Phương pháp sắc ký bản mỏng định tính axit amin có trong kết tủa

Tiến hành theo phương pháp của Bok. S. H. và cộng sự [3].

6. Thử hoạt tính ức chế aflatoxin của Iturin A thô trên các chất mang khác nhau

- Tiến hành theo phương pháp của N.Kimura và M.Ono [7]
- Phân tích aflatoxin bằng sắc ký bản mỏng: Tiến hành theo phương pháp Doronina và Maksimenko. Dựa trên cơ sở của phương pháp CB (AOAC) có cải tiến.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tuyển chọn chủng *Bacillus subtilis* có khả năng sinh Iturin A ức chế sự phát triển của *Aspergillus flavus*

Bảng 1. Khả năng ức chế sự phát triển *Aspergillus flavus* của Iturin A sản sinh từ các chủng *Bacillus subtilis* phân lập từ lá cây

Đường kính khuẩn lạc <i>A.flavus</i> của mẫu đối chứng sau 8 ngày (cm)	8.7				
Đường kính khuẩn lạc <i>A.flavus</i> của mẫu thử sau 8 ngày phân theo các mức (cm)	0 - 2	2 - 4	4 - 6	6 - 8	> 8
Số chủng <i>Bacillus subtilis</i> trong các mẫu thử có đường kính tương ứng	2*	0	88	25	0
Tổng số chủng <i>Bacillus subtilis</i> được thử	115				

Hoạt tính ức chế nấm mốc của Iturin A sản sinh từ *Bacillus subtilis* được đánh giá gián tiếp bằng đường kính khuẩn lạc *A.flavus* nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung 1% Iturin A. Kết quả ở bảng 1 cho thấy ở mẫu đối chứng đường kính khuẩn lạc *A.flavus* phát triển trên môi trường PDA không bổ sung 1% Iturin A là 8,7 cm. Trong 115 chủng *Bacillus subtilis* phân lập được từ lá cây, có 2 chủng *Bacillus subtilis* có hoạt tính ức chế nấm mốc cao nhất, thể hiện qua đường kính khuẩn lạc *A.flavus* từ 0-2cm, 88 chủng *Bacillus subtilis* có hoạt tính ức chế nấm mốc ở mức độ trung bình, thể hiện qua đường kính khuẩn lạc *A.flavus* từ 4-6cm, 25 chủng *Bacillus subtilis* có hoạt tính ức chế nấm mốc ở mức độ yếu thể hiện qua đường kính khuẩn lạc *A.flavus* từ 6-8cm. Như vậy từ 115 mẫu lá, chúng tôi đã phân lập được 115 chủng *Bacillus subtilis* nhưng chỉ có 2 chủng *Bacillus subtilis* có hoạt chất ức chế nấm *A.flavus*.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, trong 110 chủng *Bacillus subtilis* phân lập từ đất, có 2 chủng *Bacillus subtilis* sinh Iturin A kháng nấm cực mạnh, thể hiện qua đường kính khuẩn lạc *A. flavus* từ 0,2 đến 0,5 cm. Có 15 chủng *Bacillus subtilis* có khả năng sinh Iturin A khá mạnh, thể hiện qua đường kính khuẩn lạc *A. flavus* từ 1-3 cm. Có 89 chủng *Bacillus subtilis* có khả năng sinh Iturin A kháng nấm yếu.

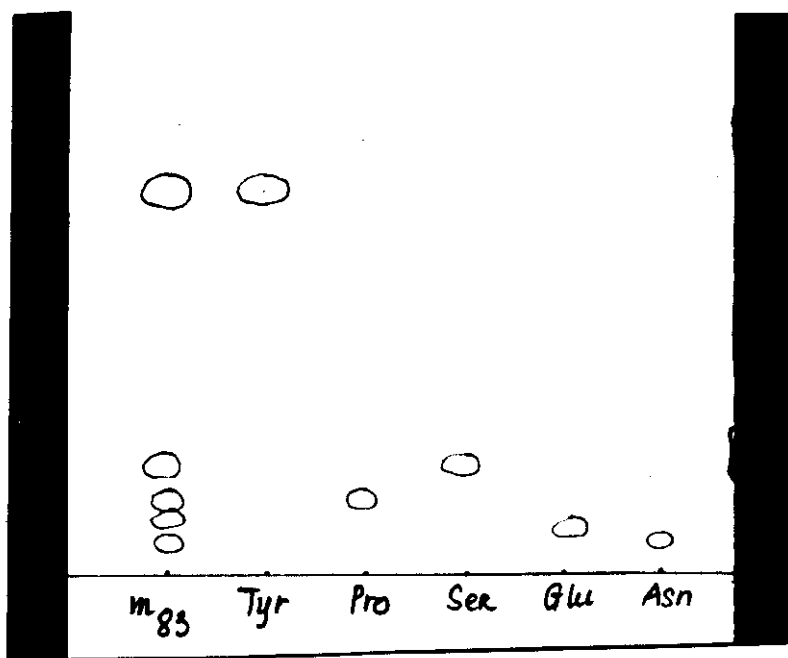
Bảng 2. Khả năng ức chế sự phát triển *Aspergillus flavus* của Iturin A sản sinh từ các chủng *Bacillus subtilis* phân lập từ đất.

Đường kính khuẩn lạc <i>A. flavus</i> của mẫu đối chứng sau 8 ngày (cm)	8,7			
Đường kính khuẩn lạc <i>A. flavus</i> của mẫu thử sau 8 ngày phân theo các mức (cm)	0	0,2-0,5	1-3	>3
Số chủng <i>Bacillus subtilis</i> trong các mẫu thử có đường kính tương ứng	2	4	15	89
Tổng số chủng <i>Bacillus subtilis</i> được thử	110			

So sánh các chủng *Bacillus subtilis* chúng tôi phân lập với các chủng *Bacillus subtilis* của N. Kimura và M. Ono [7], ba chủng ký hiệu ATCC 10774, NK 330, NKC3 đều có đường kính khuẩn lạc *A. flavus* phát triển trên môi trường PDA là 0cm. Như vậy hai chủng *Bacillus subtilis* chúng tôi phân lập và tuyển chọn được so với các chủng của Norio Kimura, Nhật bản là gần như tương đương.

2. Xác định thành phần axit amin có trong kết tủa thu từ dịch nổi của chủng *Bacillus subtilis* 61s.

Chúng tôi sử dụng phương pháp sắc ký bản mỏng để xác định sơ bộ thành phần axit amin có trong chất kết tủa thu từ dịch nổi sau khi ly tâm dịch lên men của chủng 61s.



Ảnh 1. Phân tích định tính thành phần axit amin của kết tủa thu từ dịch nổi sau khi ly tâm dịch lên men của *B. subtilis* 61s

Kết quả thu được sau khi chạy sắc ký chất kết tủa thu được từ dịch nổi của chủng 61s đã cho các vết có Rf tương đương với Rf của 5 axit amin chuẩn là tyrosin, prolin, asparagin, glutamin, serin.

Sơ sánh với kết quả phân tích trên sắc ký bản mỏng của C. G. Phae [11] và S. H. Bok [3] chúng tôi nhận thấy thành phần axit amin có trong kết tủa thu được từ chủng 61s hoàn toàn phù hợp với thành phần axit amin cần có trong Iturin A.

Các chất kết tủa thu được từ chủng *Bacillus subtilis* 61s đã thể hiện các đặc tính chủ yếu của Iturin A là:

- Có hoạt tính ức chế sự phát triển nấm mốc *Aspergillus flavus*.
- Có thành phần của 5 axit amin là Tyrozin, Prolin, Asparagin, Glutamin, Serin.

Kết hợp tất cả các yếu tố cần thiết đó, chúng tôi kết luận chất ức chế đã được kết tủa mà chủng *Bacillus subtilis* 61s tạo ra khi lên men trên môi trường MT1 chính là chất kháng sinh chống nấm Iturin A.

3. Thu hồi Iturin A từ hỗn dịch lên men *Bacillus subtilis*

Bảng 3. Lượng Iturin A thu hồi từ hỗn dịch lên men *Bacillus subtilis* bằng các phương pháp khác nhau

Các phương pháp kết tủa	Kết tủa bằng cồn	Kết tủa bằng đẳng điện	Kết tủa bằng sunphat amôn (60% bão hoà ở 20°C)
Lượng Iturin A thu được (g/l)	3,5	6,9	7
Hiệu quả diệt nấm của Iturin A sau và trước kết tủa bằng các phương pháp khác nhau (%)	60	30	100

Với phương pháp thu hồi bằng cồn, chúng tôi thu được 3,5 g kết tủa/1 lít dịch lên men. Bằng phương pháp kết tủa đẳng điện, chúng tôi thu hồi được 6,9g kết tủa/1 lít dịch lên men. Với phương pháp thu kết tủa bằng sunphat amôn, chúng tôi thu được 7 g kết tủa/1 lít dịch lên. Hoạt tính diệt nấm của Iturin A thu được từ phương pháp kết tủa bằng cồn, đẳng điện và bằng sunphat amôn là 60%, 30% và 100%, theo thứ tự. Như vậy có thể nói rằng phương pháp thu hồi bằng sunphat amôn có thể ứng dụng cho công nghệ sản xuất Iturin A. Các tác giả như S. H. Bok [3], N. Kimura và M. Ono [7] đã công bố phương pháp kết tủa Iturin A bằng cồn và bằng đẳng điện và không công bố hiệu quả diệt nấm của hoạt chất. Những kết quả của chúng tôi được xem như là những phát hiện có giá trị về công nghệ thu hồi Iturin A.

4. Tuyển chọn môi trường lên men *Bacillus subtilis* cho khả năng tạo Iturin A cao

Kết quả ở bảng 4 cho thấy khi bổ sung 5% dịch lên men Iturin A thu từ chủng 61s trên các môi trường dinh dưỡng MT1, MT2, MT2, MT4, đường kính khuẩn lạc *Aspergillus flavus* là 1cm, 0cm, 1,3cm và 1,5cm, theo thứ tự. Như vậy ta có thể nói rằng môi trường MT2 thích hợp cho sự tạo Iturin A của *B. subtilis*, sản lượng Iturin A đạt cao nhất trên môi trường này.

Bảng 4. Hoạt tính ức chế *A. flavus* của dịch lên men chủng 61s lên men trên 4 môi trường dinh dưỡng khác nhau

Tên chủng <i>Bacillus subtilis</i>	Đường kính khuẩn lạc <i>Aspergillus flavus</i> sau 7 ngày (cm)			
	Các môi trường lên men			
	MT ₁	MT ₂	MT ₃	MT ₄
61s	1,0	0	1,3	1,5
Đối chứng	8			

Bảng 5. Sản lượng Iturin A thu được từ chủng *Bacillus subtilis* 61s khi lên men trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau

Tên chủng <i>Bacillus subtilis</i>	Lượng Iturin A (g/l)			
	Các môi trường dinh dưỡng lên men			
	MT1	MT2	MT3	MT4
61s	2,437	4,012	1,910	1,978

Kết quả ở bảng 5 cho thấy lượng Iturin thu được từ chủng *Bacillus subtilis* 61s lên men trên các môi trường MT1, MT2, MT3, MT4 là 2,437 g/l; 4,012 g/l; 1,910 g/l và 1,978 g/l. theo thứ tự. Kết quả này một lần nữa khẳng định sự tối ưu của môi trường MT2 cho việc lên men tạo Iturin A của *Bacillus subtilis*.

Theo nghiên cứu của N. Kimura và M. Ono [7], chủng *Bacillus subtilis* NK330 và ATCC10774 có hoạt lực tạo Iturin A cao khi lên men trên môi trường có nguồn dinh dưỡng chính là đường –khoai tây, giống thành phần dinh dưỡng của môi trường MT1.

S. H. Bok [3] đã lên men chủng *Bacillus subtilis subsp krichtiensis* ATCC 55079 và ATCC 55078 trên môi trường có nguồn dinh dưỡng chính là muối amonium sulfate, dầu cọ, đường sacaroza và một số nguyên tố khoáng khác.

C. G. Phae, M. Shoda, H.Kubota [12] đã lên men chủng *Bacillus subtilis* NB22 trên môi trường dinh dưỡng có thành phần chủ yếu là trypton, đường glucoza cùng một số muối phosphat, sulfate khác.

Dựa trên cơ sở của kết quả trên đây, chúng tôi đã chọn môi trường dinh dưỡng MT2 cho nghiên cứu công nghệ sản xuất Iturin A.

5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đối với khả năng tạo Iturin A của chủng *Bacillus subtilis* 61s.

Kết quả bảng 6 cho thấy khi lên men ở nhiệt độ 30°C lượng Iturin A thu được cao nhất, là 4.986 (g/l).

Khi lên men ở nhiệt độ 35°C, lượng Iturin A thu được là 4.053(g/l), giảm hơn so với ở nhiệt độ 30°C.

Khi lên men ở nhiệt độ 25°C và 40°C, lượng Iturin A thu được là 3.072; 3.157(g/l), giảm hơn hẳn so với Iturin A thu được khi lên men ở nhiệt độ 30 và 35°C.

Như vậy nhiệt độ 30°C là thích hợp cho quá trình tạo Iturin A của vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các kết quả nghiên cứu của Ohno, A., Ano, T., Shoda, M. [10] đã công bố nhiệt độ thích hợp cho *Bacillus subtilis* tạo sản lượng Iturin A cao là > 25°C, nhiệt độ không phù hợp là > 35°C.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ khác nhau đối với khả năng tạo Iturin A của chủng *Bacillus subtilis* 61s

Nhiệt độ	Lượng Iturin A thu hồi (g/l)
25 C	3.072
30 C	4.986
35 C	4.053
40 C	3.175

6. Ảnh hưởng của thời gian lên men đối với khả năng tạo Iturin A của chủng *Bacillus subtilis* 61s

Kết quả trình bày ở bảng 7 cho thấy tại thời gian lên men 48 giờ, lượng Iturin A tạo ra là 3.539 (g/l). Khi lên men 72 giờ lượng Iturin A tạo ra là 4.756 (g/l), cao nhất trong các giai đoạn lên men. Lượng Iturin A thấp nhất thu được là 3.052 (g/l) khi lên men 96 giờ. Như vậy thời gian tối ưu để lên men *Bacillus subtilis* tạo sản lượng Iturin A cao là 72 giờ. Chúng tôi cho rằng protease sinh ra từ *Bacillus subtilis* đã làm giảm lượng Iturin A thu được sau 72 giờ lên men.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các kết quả nghiên cứu của A. Ohno, T. Ano, M. Shoda [10] và S. H. Bok [3] công bố thời gian tối ưu cho *Bacillus subtilis* tạo sản lượng Iturin A là 72 giờ.

Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng tạo Iturin A của chủng *Bacillus subtilis* 61s

Thời gian lên men	Lượng Iturin A thu hồi (g/l)
48 giờ	3.539
72 giờ	4.756
96 giờ	3.052

Lần đầu tiên ở Việt Nam công nghệ sản xuất Iturin A đã được nghiên cứu và chứng minh khả năng ức chế nấm mốc của hoạt chất này. Nghiên cứu này đã cho thấy rằng Iturin A hoàn toàn có thể sản xuất được bằng công nghệ sinh học ở Việt Nam. Nó cũng mở ra khả năng ứng dụng rộng rãi hoạt chất này vào việc phòng chống nấm mốc và độc tố mốc bằng phương pháp sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Asaka, O., and Shoda, M., 1996.
Biocontrol of Rhizoctonia solani Damping-Off of Tomato with Bacillus subtilis RB14. Appl. and Environ. Microbiol, Nov.1996, p.4081-4085.
2. Besson, F., Chevanet, C., Michel, G.
Influence of the Medium on the production of Iturin A by Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiology. 133: 767-772.
3. Bok, S. H., Kim, S. U., Son, K. H., Kim, S. K., Young K. Kim, Hang W. Lee, Jee W. Lee., 1992
Culture of Bacillus subtilis (patent number:5,115,041)., 1992.
4. Chevanet, C., Bensson, F., Michel, G.
Effect of growth conditions on spore formation and bacillomycin L production in Bacillus subtilis. Can. J. Microbiol. 32(3): 254-258.
5. Foster, P. R.
Protein precipitation. Engineering processes for Bioseparations. p. 73-109
6. Gueldner, R. C., and Cutler, H. G.
Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with Bacillus subtilis. J. Agric. Food Chem. 36: 336-370.
7. Kimura, N., Ono, M., 1989.
Prevention of aflatoxin contamination in cereals and nuts by applying Iturin A there to. Australian patent office. AU-A-39235.
8. Klich, M. A., Lax, A. R., Bland, J. M.
Inhibition of some mycotoxigenic fungi by Inturin A. a Peptidolipid produced by Bacillus subtilis. Mycopathologia, 116: 77-80.
9. Makasaki, K., Sasaki, M., Shoda, M., Kubota, H.
Characteristics of Medophilic bacteria Isolated during Thermophilic composting of Sewage Sludge. App. and Environ. Microbiol. 49(1): 42-45.
10. Ohno, A., Ano, T., Shoda, M.
Effect of temperature change and aeration on the production of the antifungal peptide antibiotic Iturin by Bacillus subtilis in liquid cultivation. J. Fermentation and Bioeng. 75 : 1-7.
11. Phae, C. G., Shoda, M..
Investigation of optimal conditions for foam separation of inturin, an antifungal peptide produced by Bacillus subtilis. Fermentation and Bioeng. 71(2): 118-121.

12. Phae, C. G., Shoda, M., Kubota, H.
Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. J. Fermentation and Bioeng. 69 (1): 1-7.
13. Pusey, P. L.
Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. Pestic. Sci. 27: 133-140.
14. Sandrin, C., Peypoux, F., Michel, G.
Coproducts of surfacin and iturin A, Lipopeptides with surfactant and Antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. Biotech. and App. Biochem. 12: 370-375.
15. Shoda, M., and Ano, T., 1993.
Basic Analysis of *Bacillus subtilis* NB22 and Its Application to Biological Control. Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications. Inc. December, 1993.
16. Tokuda, Y., Ano, T., Shoda, M.
Survival of *Bacillus subtilis* NB22 and its transformant in soil. Applied Soil Ecology 2 (1995) 85-94.
17. Wakayama, S., Ishikawa, F., Oishi, K.
Micocerein, a Novel antifungal peptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 26(6): 939-940.

THE SCREENING OF *Bacillus subtilis* ISOLATES PRODUCING ITURIN A AS ANTIFUNGAL SUBSTANCE FROM SOIL AND LEAF SAMPLES AND STUDY ON ITURIN A PRODUCTION TECHNOLOGY

Nguyen Thuy Chau, Nguyen Huong Tra, Bui Hai Hoa,
Truong Thanh Binh, Tran Van Tuan, Le Huu Hieu

SUMMARY

We isolated 115 *Bacillus subtilis* isolates from leaf samples and 110 *Bacillus subtilis* isolates from soil and the total 4 isolates having high ability to produce Iturin A as antifungal substance. The production technology of Iturin A was investigated. The media with glucose, potato extract, hydrolysed soybean, yeast extract and mineral elements were used for fermentation for Iturin A production. We found that the highest yield of Iturin A in the medium containing hydrolysed soybean, yeast extract and mineral elements. The highest antifungal activity also obtained in this medium. The precipitation by amoni sulphate was the best method for Iturin A recovery. We also found that the optimal temperature for Iturin A production was 30°C. The fermentation period for the highest yield of Iturin A was 72 hours. This is the first study on Iturin A production in Vietnam.

1.0.9

NGHIÊN CỨU SINH TỔNG HỢP KHÁNG SINH TỪ HAI CHỦNG *Micromonospora* N^o9 VÀ N^o108.

Cao Văn Thu, Nguyễn Thế Đông, Nguyễn Thị Hoa

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

I. MỞ ĐẦU

Micromonospora, chi xạ khuẩn hiếm đang được các nhà nghiên cứu quan tâm. Việc phân lập, thử khả năng sinh tổng hợp kháng sinh, nghiên cứu các đặc tính sinh hóa, hình thái của các *Micromonospora* đã được tiến hành từ một vài năm nay tại Trường Đại học Dược Hà Nội. Tiếp tục các nghiên cứu đó nhằm cải tạo chủng giống, nghiên cứu công nghệ lên men, chiết tách tinh chế là những bước nghiên cứu tiếp theo được công bố trong công trình này.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vi sinh vật: Hai chủng *Micromonospora* N^o9 và N^o108 là hai chủng được phân lập tại Việt Nam, khá ổn định về di truyền sinh học, có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh hoạt phổ rộng (tác dụng diệt khuẩn trên 10 vi khuẩn thử trong đó có 5 Gram- và 5 Gram+) do Tổ môn Vi nấm- kháng sinh của Trường Đại học Dược Hà Nội cấp.

Vi sinh vật kiểm định: Chủng *Bacillus pumilus* ATCC 10241 là vi sinh vật có độ mẫn cảm với hai kháng sinh này khá cao trong số 10 vi sinh vật và đã được thử nhạy cảm.

Môi trường: Sử dụng môi trường Gauze I để giữ giống, môi trường Gauze I lỏng để nhân giống cấp I và cấp II, cũng như làm môi trường nền để tối ưu hoá. Môi trường thạch thường và canh thang dùng nuôi cấy vi sinh vật kiểm định.

Phương pháp giữ giống: Vi sinh vật sinh tổng hợp kháng sinh được giữ giống trên môi trường thạch nghiêng trong tủ lạnh 4-10°C kết hợp với chọn lọc ngẫu nhiên để duy trì hoạt lực kháng sinh.

Phương pháp lên men: Lên men trên quy mô phòng thí nghiệm được tiến hành trên hai mức: lên men trên máy lắc và lên men trên bình lên men 15l (hệ thống Italy). Môi trường lên men trên máy lắc được cấy giống cấp I 48 giờ tuổi và lắc 250-300^v/phút trong 120 giờ với t° = 30-32°C.

Môi trường lên men (9 lít) trong bình 15l được cấy 1lít giống cấp II 36-48 giờ tuổi và tiến hành nuôi cấy 30-32°C trong 120-132 giờ, vận tốc khuấy 250-300^v/phút, tốc độ

cấp khí là 0,8-1,0 VVM. Thường sau 12-24 giờ tiến hành lấy mẫu vô trùng để làm các phân tích.

Phương pháp đột biến: Chiếu tia UV $\lambda=260$ nm trong 4-5', kết hợp với phân lập sàng lọc sau đột biến được ứng dụng để cải tạo giống vi sinh vật.

Phương pháp khoan giấy lọc, khối thạch và đục lỗ thạch được ứng dụng linh hoạt để xác định hoạt lực kháng sinh của các mẫu thử.

Phương pháp Schoorl-Regenbogen được sử dụng để định lượng đường glucoza.

Phương pháp quy hoạch đơn hình được ứng dụng để tối ưu hoá thành phần môi trường lên men, có tính toán giả định để tiết kiệm thời gian thực nghiệm. Gọi x_1 là nồng độ [%] KNO_3 , x_2 là nồng độ [%] KH_2PO_4 , x_3 là nồng độ [%] tinh bột. Với $a_1=0,2\%$, $a_2=0,1\%$, $a_3=2,5\%$ lần lượt là các mức tác nhân cơ bản tương ứng và $c_1=0,1$, $c_2=0,05$, $c_3=0,5$ lần lượt là các bước biến đổi. Bảng quy hoạch ban đầu được giới thiệu ở bảng 1.

Bảng 1. Bảng quy hoạch đơn hình ban đầu

Đỉnh	Tác nhân		
	x_1	x_2	x_3
1	1	1	1
2	-1	1	1
3	0	-2	1
4	0	0	-3

Giá trị thực nghiệm của đơn hình S_0 được tính theo công thức:

$$X_i = a_i + c_i \cdot x_i \quad (1)$$

Giá trị đỉnh mới của đơn hình tiếp theo được tính theo công thức:

$$X'_i = \frac{2}{k} \left(\sum_{i=1}^k X_i - X_{i_{\min}} \right) - X_{i_{\min}} \quad (2)$$

Hoặc: $X'_i = (1 + \alpha) \times X_{0i} - \alpha X_{i_{\min}}$ (3)

với: k là số tác nhân,
 α là hệ số ảnh hưởng.

và X_{0i} được tính theo công thức :

$$X_{0i} = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^{k+1} X_i \quad (4)$$

với: $i \neq i_{\min}$.

Tiêu chuẩn kết thúc thí nghiệm khi có một đỉnh nằm trong $k+2$ đơn hình, miền tối ưu đã được tìm cận.

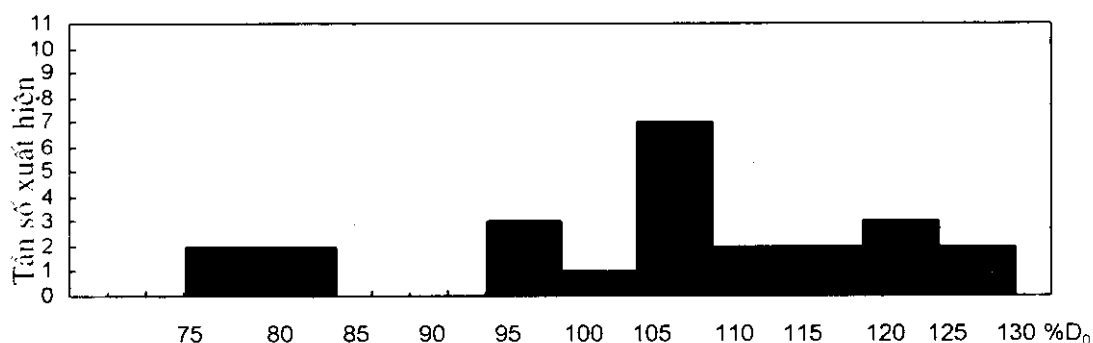
Để nghiên cứu chiết tách kháng sinh chúng tôi đã sử dụng *phương pháp chiết bằng dung môi hữu cơ đơn cấp hoặc nhiều cấp*, trên các pH khác nhau để tìm kiếm dung môi và điều kiện thu hồi kháng sinh tốt nhất.

Phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký giấy được ứng dụng để nghiên cứu thành phần và sơ bộ định tính kháng sinh.

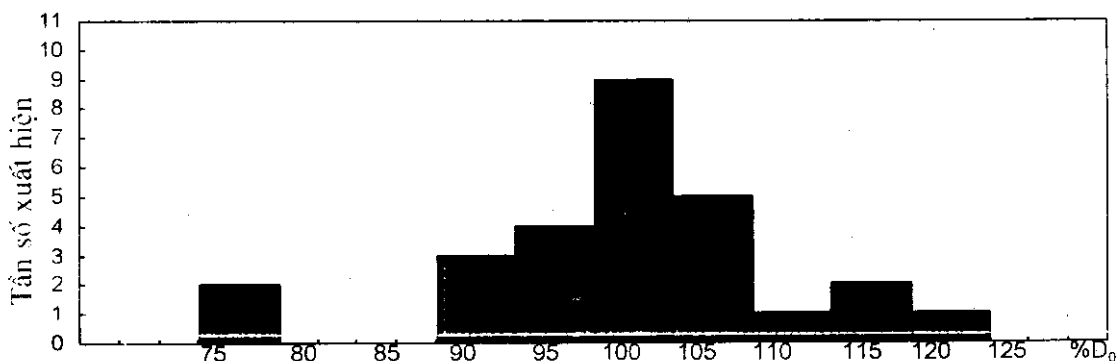
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát sự tạo thành kháng sinh của hai chủng *Micromonospora* N^o9 và N^o108 bằng lên men trên máy lắc chúng tôi nhận thấy sau 24 giờ lên men kháng sinh hầu như chưa hoặc mới được tạo thành rất ít. Từ 48-96 giờ kháng sinh tăng mạnh và tại 120 giờ đạt cực đại; sau 120 giờ kháng sinh không tăng hoặc giảm chút ít. Như vậy tại thời điểm 120 giờ kết thúc lên men là tốt nhất.

Đột biến cải tạo giống bằng tia tử ngoại với thời gian chiếu tia là 4'-5' kết hợp sàng lọc ngẫu nhiên sau đột biến cho phép thu được biến chủng dương có hoạt tính tăng mạnh, các kết quả được giới thiệu ở biểu đồ tần số hình 1 và hình 2.



Hình 1. Biểu đồ tần số xuất hiện các biến chủng có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh đã thay đổi theo tỷ lệ % so với chủng gốc ($D_0=100\%$) khi chiếu tia UV 4', $D_0=17,83\text{mm}$.



Hình 2. Biểu đồ tần số xuất hiện các biến chủng có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh đã thay đổi theo tỷ lệ % so với chủng gốc ($D_0=100\%$) khi chiếu tia UV 5' (lần thứ hai), $D_{01}=20,93\text{mm}$.

Qua hình 1, hình 2 có thể thấy rằng đột biến bằng tia UV trong bốn phút cho kết quả tốt hơn đột biến năm phút.

Cũng nhằm nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp kháng sinh các đột quy hoạch đơn hình đã được thiết lập và thực hiện. Kết quả tổng hợp đối với *Micromonospora* N⁰9 giới thiệu ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả tổng hợp quy hoạch đơn hình

Đơn hình	Đỉnh	Tác nhân			Kết quả	
		x_1	x_2	x_3	D[mm]	S
	1	0,3	0,15	3,00	20,43	0,75
$S_0(1,2,3,4)$	2	0,1	0,15	3,00	20,94	1,02
	3	0,2	0,00	3,00	18,93	1,06
	4	0,2	0,10	1,00	19,97	0,89
$S_1(1,2,4,5)$	5	0,2	0,27	3,67	22,17	1,21
$S_2(1,2,5,6)$	6	0,2	0,28	5,40	23,02	1,15
$S_3(2,5,6,7)$	7	0,00	0,32	5,00	19,95	0,73
$S_4(2,5,6,8)$	8	0,33	0,15	3,04	22,88	0,81
$S_5(5,6,8,9)$	9 ⁺	0,38	0,30	5,07	20,39	1,08
$S_6(5,6,8,10)$	10	0,10	0,15	2,80	21,26	1,19

Đỉnh 5,6 thoả mãn tiêu chuẩn kết thúc thí nghiệm (nằm trong k+2 đơn hình) nên có thể coi là toạ độ tối ưu, toạ độ đỉnh 8 cũng đáng quan tâm. Tuy nhiên đỉnh 6 được chọn là hợp lý. Quy hoạch đơn hình với *Micromonospora* N⁰108 đã thu được kết quả tốt nhất tại đỉnh 1 và đỉnh 8. Sau khi làm thí nghiệm kiểm tra đỉnh 8 đã được chọn với các toạ độ là $x_1(KNO_3)=0,46\%$; $x_2(MgSO_4 \cdot 7H_2O)=0,36\%$; x_3 (tinh bột)=3,16%.

Từ cơ sở các kết quả lên men trên máy lắc, lên men trong bình lên men 15l đã được thực hiện các kết quả chính được giới thiệu ở bảng 3.

Bảng 3 cho thấy rằng sau 120 giờ lên men kháng sinh được tạo thành là nhiều nhất. Tuy nhiên từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 5 vận tốc tạo kháng sinh đã giảm đáng kể. Mặt khác cuối quá trình lên men pH tăng mạnh, mà hydratcacbon vẫn còn dư (38,70%).

Các kết quả nghiên cứu chiết tách cho thấy có thể sử dụng các loại dung môi n-butanol, etylaxetat, butylaxetat, clorofoc để chiết kháng sinh tại pH=9 (từ *Micromonospora* N⁰9) hoặc tại pH=11 (từ *Micromonospora* N⁰108). Các kết quả sắc ký lớp mỏng cho phép sơ bộ đánh giá các kháng sinh này có ít nhất hai thành phần có hoạt tính. Các nghiên cứu này vẫn đang được tiếp tục.

Bảng 3. Kết quả lên men trong bình lên men 15l (D[mm] là đường kính vòng vô khuẩn, $t_{(g)}$ là thời gian lên men tính theo giờ) của *Micromonospora* N^o108

Kết quả \ $t_{(g)}$	0	24	48	72	96	120	132
pH	7,0	6,5	6,8	7,5	7,8	8,2	8,5
Glucosa (g/l)	35,10	26,92	22,14	17,36	15,06	13,92	13,59
D[mm]	0	9,02	10,21	12,06	15,93	15,97	15,22
S	0	0,51	0,42	0,67	0,32	0,47	0,58

IV. KẾT LUẬN

Từ hai chủng *Micromonospora* N^o9 và N^o108 đã nghiên cứu đột biến cải tạo giống sử dụng tia UV kết hợp với phân lập sàng lọc thu được các biến chủng dương có hoạt tính tốt. Quy hoạch đơn hình cho phép xác định thành phần môi trường lên men tối ưu cho từng chủng. Kết quả sắc ký lớp mỏng và sắc ký giấy sơ bộ cho thấy các kháng sinh này có ít nhất hai thành phần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hollo J. et al., 1978.
The Chemistry's Newer Results (Hung.), Academic Publ.House. Budapest.
2. Crueger W., Crueger A., 1987.
Biotechnology (Hung). Agr. Publ. House. Budapest.
3. Zsuzsa Sz., 1984.
Zeitschrift fur allgemeine Mikrobiologie. 24 (1984)9, 649-53.
4. Wagman, G.H. & M.J., 1980.
Weinstein: Antibiotics from Micro., Ann.Rev.Microbio. (1980) 34:537-57.
5. Thu C.V., Hoa N.T., 1999.
Tạp chí Dược học số 1 (1999), p.12-14.
6. Spenley W., Hext G.R., Himsworth F.G., 1962.
Technometrics., 4, 441 (1962).

STUDIES ON THE BIOSYNTHETICAL FERMENTATION OF ANTIBIOTICS FROM TWO STRAIN *Micromonospora* N^o9 AND N^o108

Cao Van Thu, Nguyen The Dong, Nguyen Thi Hoa

SUMMARY

*With two *Micromonospora* N^o9 and N^o108 the strain improvement has been studied by using UV mutations. Following selections have allowed to receive good positive mutants. The successful application of the simplex method has allowed to determine the optimal composition of fermentation medium for each strain. As the result of thin-layer chromatography and paper chromatography, these antibiotics have at least two components.*

1.0.10

TÁC DỤNG TĂNG TRƯỞNG ĐỐI VỚI GIA CẦM CỦA CHẾ PHẨM VI SINH VẬT PRO99*

Lê Thanh Bình, Phạm Thị Ngọc Lan, Yoshimi Benno*

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng vi khuẩn lactic(LAB) ở dạng probiotics nhằm tăng cường sức khỏe và dinh dưỡng là một vấn đề đang được quan tâm đặc biệt(1-4). Bởi lẽ không chỉ vì LAB được coi là vi sinh vật an toàn (GRAS, general recognized as safe), mà còn bởi vì nó có thể đóng vai trò điều chỉnh những sai lệch bất lợi ở hệ vi sinh vật đường ruột, hậu quả gây ra của các chứng bệnh nhiễm vi khuẩn, virus, dị ứng thức ăn(2,5-8)... Những phát hiện mới đây về khả năng tăng cường miễn dịch, chống ung thư, giảm thiểu cholesterol trong máu đang thực sự mở ra triển vọng áp dụng mới trong thế kỷ tới (8). Những LAB được dùng làm probiotics thường thuộc các giống *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*(9) và *Streptococcus*(10). Những nghiên cứu sử dụng chế phẩm probiotics cho mục đích chăn nuôi đã bắt đầu từ thập kỷ 80 đối với lợn nhỏ (11). Trong những năm gần đây đã có những công trình chứng minh về tác dụng phòng chống bệnh và kích thích tăng trưởng của chế phẩm probiotic từ *Lactobacillus* sp TSC-66 đối với lợn(14), *Lactobacilli* và *Enterococci* đối với cá(15).

Dưới đây chúng tôi trình bày những kết quả nghiên cứu về tác dụng tăng trưởng của chế phẩm probiotic tạo thành từ hỗn hợp hai chủng vi khuẩn lactic đối với gà thịt.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

Các chủng vi khuẩn lactic được sử dụng làm probiotic là những chủng được lựa chọn, tạo các đặc tính sao cho đáp ứng được các chuẩn mực của probiotic. Cho thí nghiệm trên chúng tôi lựa chọn gà A707 được nuôi tại xí nghiệp chăn nuôi gà Cầu Diễn, Hà Nội. Thức ăn cũng là loại mà các chủ trại gà đang dùng là loại HI-GRO có thành phần như sau: protein 21%, chất béo 2%, xơ 4%, độ ẩm 14%, canxi 0.7%, photpho 0.5%, NaCl 0.3%. Chế phẩm PRO99 được trộn đều với thức ăn trên trước khi cho gà ăn. Chế độ ăn uống giữ nguyên theo quy trình của chủ nhân.

* Collection of Microorganisms, the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako-shi, Saitama 351-01 Japan.

• Công trình có sự hỗ trợ kinh phí của chương trình nghiên cứu cơ bản và Mạng lưới nghiên cứu vi sinh vật học châu Á (ANMR)

Phân tích vi sinh vật dùng các môi trường sau, MRS (Difco Bacto) cho vi khuẩn lactic, DHL (Eiken Co. Ltd) để xác định *E.coli*. EG(Eiken Co. Ltd) và BL (Blood Liver, Eiken Co. Ltd) để phân biệt *Lactobacilli* và *Enterococci*. Nuôi cấy kỵ khí dùng thiết bị Gas Pak Anaerobic System(BBL). Quan sát hình thái tế bào sử dụng kính hiển vi quang học Olympus CH-2 (Nhật bản).

2. Phương pháp

Chế phẩm PRO99 được trộn đều với thức ăn HI-GRO theo tỷ lệ sao cho sản phẩm cuối cùng có số tế bào đạt 10^9 /g. Hỗn hợp này được dùng cho các thí nghiệm tiếp theo sau.

Để nghiên cứu tác dụng tăng trưởng của chế phẩm nói trên đối với gà thịt, chúng tôi đã chọn ngẫu nhiên 40 con gà ở độ tuổi 15 ngày. Số gà này được chia thành hai lô, thí nghiệm và đối chứng, được ký hiệu là P và C. Số gà thuộc nhóm P ăn thức ăn có bổ xung chế phẩm PRO99. Trọng lượng tổng số cũng như trung bình được tính tại ngày thứ 15 là ngày thí nghiệm bắt đầu và sau đó cân theo dõi sự tăng trưởng của gà theo chu kỳ 10 ngày là ngày thứ 15, 25, 35 và ngày cuối cùng của thí nghiệm. Mọi tính toán dựa theo các số trung bình thu được tại các ngày cân.

Phân tích vi sinh vật nhằm xác định số lượng vi khuẩn lactic gồm *Lactobacilli* và *Enterococci*, trong khi *Enterobacteria* chỉ tập trung vào *E. coli*. Cho thí nghiệm phân tích này, các mẫu phân được thu thập càng mới càng tốt và phải luôn luôn bảo quản trong điều kiện lạnh. Kết quả phân tích sẽ là kết quả trung bình của 10 mẫu phân tích lấy từ lô đối chứng và lô thí nghiệm. Phân tích vi sinh vật sẽ tiến hành hai lần, lần thứ nhất sau 4 ngày và lần thứ hai tiến hành vào ngày cuối cùng, ngày thứ 50. Những phương pháp phân tích vi sinh vật theo tác giả Benno và cộng sự (16-17).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tác dụng tăng trọng

Những kết quả trình bày tại bảng 1 biểu diễn trọng lượng tổng số cũng như trọng lượng trung bình cân được của gà thuộc hai nhóm C và P tại các khoảng thời gian như đã nói ở phần phương pháp.

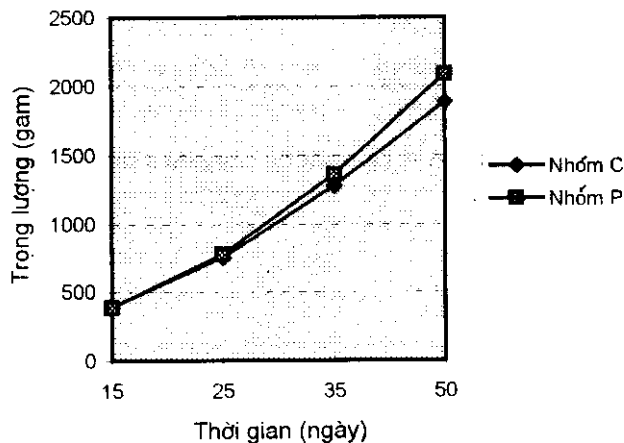
Bảng 1. Kết quả cân theo dõi sự tăng trưởng

Nhóm TN	Trọng lượng(g) cân tại các ngày							
	15		25		35		50	
	Tg/số	Tr/bình	Tg/số	Tr/bình	Tg/số	Tr/bình	Tg/số	Tr/bình
C	7730.0	386.5	15040.	752.0	25540.	1227.0	37700.	1885.0
P	7760.0	388.0	15580.	779.0	27170.	1358.0	41730.	2086.5

Chú thích :

- Trọng lượng tổng số : Tg/số
- Trọng lượng trung bình : Tr/bình

Tổng trọng lượng của gà thuộc nhóm C cân tại ngày đầu tiên của thí nghiệm là 7730 g, trọng lượng trung bình là 3865 g, trong khi tổng trọng lượng của gà thuộc nhóm P cũng xấp xỉ như vậy là 7760 g và trung bình là 388 g. Các kết quả cân theo dõi tăng trưởng tại các ngày thứ 25, 35 và 50 cho thấy rõ tác dụng của chế phẩm PRO99. Chẳng hạn như vào ngày thứ 35, tại đó tổng trọng lượng của gà thuộc nhóm C là 25540g, trọng lượng trung bình là 1277g cho một gà trong khi đó tại nhóm P, tổng trọng lượng đạt 27170 g và trọng lượng trung bình là 1358 g cho một gà. Sự khác biệt trọng lượng hai nhóm thấy rõ hơn vào ngày cuối cùng, tại đây chúng ta thấy, nếu như tổng trọng lượng của gà thuộc nhóm C là 37700 g, trọng lượng trung bình là 1885 g thì tổng trọng lượng gà thuộc nhóm P là 41730 g và trọng lượng trung bình là 2086.5 g. Từ kết quả trên tính ra được tác dụng tăng trọng của chế phẩm PRO99 là khoảng trên 11% và có thể thấy rất rõ mức độ tăng trưởng tại hình 1 dưới đây.



Hình 1. Tác dụng tăng trưởng của chế phẩm PRO99

2. Phân tích vi sinh vật

Sự hiện diện của vi khuẩn lactic mà chủ yếu gồm *Lactobacilli* và *Enterococci* trong hệ đường ruột của động vật được đánh giá là đóng vai trò quan trọng trong việc chống lại các thay đổi bất lợi. Ngược lại sự có mặt của các nhóm vi sinh vật khác mà điển hình là *E. coli* lại liên quan đến các ảnh hưởng không tốt đối với quá trình chăn nuôi. Bởi vậy việc phân tích vi sinh vật nhằm tìm hiểu tác động của chế phẩm PRO99 đối với sự phân bố số lượng các vi sinh vật chính nói trên được tiến hành tại thời điểm ban đầu và giai đoạn cuối cùng của thí nghiệm. Kết quả đó được biểu diễn tại các bảng 3 và 4 cho chúng ta thấy rõ sự khác nhau về số lượng vi sinh vật giữa nhóm C và P. Bảng 3 dưới đây chỉ rõ sự khác nhau thế nào về sự phân bố vi sinh của các nhóm chính nêu trên sau 4 ngày thí nghiệm.

Bảng 3. Sự phân bố vi sinh vật ở giai đoạn nghiệm ban đầu

Loại vi sinh vật	Nhóm C		Nhóm P	
	CFU/g	%	CFU/g	%
<i>Lactobacilli</i>	1.4×10^8	71.8	5.3×10^8	72.6
<i>Enterococci</i>	1.9×10^7	9.7	1.3×10^7	17.8
<i>E. coli</i>	3.6×10^7	18.5	7×10^7	9.6
Total	1.95×10^8	100	7.3×10^8	100

Kết quả cho thấy số lượng *Lactobacilli* và *Enterococci* có mặt trong nhóm P là cao hơn so với nhóm đối chứng. Điều thú vị là, tại các mẫu do sử dụng chế phẩm PRO99 số lượng *E. coli* chỉ chiếm 9.6% trong khi tại mẫu đối chứng là 18.5%. Kết quả cũng diễn ra tương tự như vậy tại những mẫu phân tích vào giai đoạn cuối cùng của đợt thí nghiệm (bảng 4). Tại đây tỷ lệ *E. coli* của mẫu thuộc nhóm C là 10.2% trong khi của nhóm P là 6.5%. Rõ ràng việc sử dụng chế phẩm PRO99 đã làm thay đổi sự phân bố số lượng LAB và *E. coli*, trong đó có sự giảm đáng kể *E. coli* mà sự có mặt của nó luôn kèm theo những tác động bất lợi cho dinh dưỡng, bệnh tật và năng suất chăn nuôi.

Bảng 4. Sự phân bố vi sinh vật tại ngày thí nghiệm cuối cùng

Loại vi sinh vật	Nhóm C		Nhóm P	
	CFU/g	%	CFU/g	%
<i>Lactobacilli</i>	6.7×10^8	77.1	5.8×10^8	85.5
<i>Enterococci</i>	1.1×10^8	12.7	5.4×10^7	8.0
<i>E. coli</i>	8.9×10^7	10.2	4.4×10^7	6.5
Total	8.7×10^8	100	6.7×10^8	100

Tuy nhiên tại bảng 4 ta thấy số lượng các vi sinh vật có trong nhóm C đều nhiều hơn trong nhóm P. Đối chiếu với kết quả xác định pH (không trình bày ở đây) của các mẫu lấy vào giai đoạn cuối của thí nghiệm với các giá trị pH trung bình của nhóm C=5.24 trong khi pH của P= 5.73. Phải chăng do sự tăng quá mức của vi sinh vật này mà kéo theo sự giảm pH, và tất cả các yếu tố đó đã ảnh hưởng đến quá trình hấp thu thức ăn, trao đổi năng lượng... mà cuối cùng dẫn đến sự tăng trưởng kém của lô đối chứng.

IV. KẾT LUẬN

Chế phẩm probiotic hình thành từ hai chủng vi khuẩn lactic đã tạo ra những thay đổi về khu hệ vi sinh vật đường ruột của gà theo hướng cân bằng có lợi, trong đó số lượng vi khuẩn lactic tăng lên đáng kể, trong khi số lượng *E. coli* lại giảm mạnh. Với việc sử dụng thức ăn có chứa chế phẩm PRO99 đã làm tăng năng suất thịt lên khoảng 11% so với đối chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Fernades C.F, Shahami, K.M and Ames, M.A., 1987.*
Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilli fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.* 46(1987): 343-356.
2. *Gilliand S.E., 1990.*
Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87(1-2)(1990): 175-188.
3. *Gibson G R., Roberfroid M.B., 1995.*
Dietary modulation of human colonic microbiota: Introducing the concept of probiotics. *J. Nutri.* 125(6)(1995): 1401-1412
4. *Perdogon G., Alvarez S., Rachid M., Aguro G., and N. Gobatto., 1995.*
Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* 78(7)(1995):1597-1606
5. *Isolauri E., Jutunen M., Rautanen T., Silanlaake P., Koivula.* A human lactobacillus strain (*Lactobacillus GG*) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88(1991): 90-97.
6. *Hammes W.P., Tichaczek P. S., 1994*
The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z. Lebensm. Unters. Forsch* 198(1994):193-201.
7. *Salminen S., Isolauri E., Salminen E., 1996.*
Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* , 5(1996):53-56
8. *Salminen S., Isolauri E., Salminen E., 1996.*
Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and challenges. *Ant. Leewenhoeck* 70(1996): 347-358
9. *Fuller R., 1989.*
Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66(1989): 365-378.
10. *Maeng W J., Kim C. W., and Shin H.T., 1989.*
Effects of feeding lactic acid bacteria concentrate on the growth rate and prevention of scouring in piglet. *Korea J. Anim. Sci.* 31(1989):318-323.
11. *Han I.K., Kim J. D., Lee J.H., 1984.*
Studies on the growth promoting effects of probiotics. III. The effects of *Clostridium butyricum* ID on the performance and the changes in the microbial flora of feces of growing pigs. *Korean J. Ani. Sci.* 26(1984): 166-171
12. *Matsuzaki T., T. Yokokura and M. Mutai., 1988.*
Antitumor effects of intrapleural administration of *L. casei* in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 28(1988):209-214.

13. Ziprin R.L., and J.R Deloach., 1993.

Comparison of probiotic, maintained by in vivo passage through laying hens and broilers. Poult. sci. 72(4)(1993): 628-635

14. Oh Tae - Kwang and Y. Benno., 1998.

A new probiotic from pig waste and its effects on pig. Proc. of Intern Conf. on Asian Netw. on Microbial Researches, 484-497 Yogyakarta, Indonesia 23-25th Febr. 1998.

15. Suyanandana, P., P.Budhaka.,S. Sassanarakkit, P. Saman., P. Disayaboot, Y.Cai and Y. Benno., 1998.

New Probiotic Lactobacilli and Enterococci from fish intestine and their effect on fish production. Proc. of Intern. Conf. on Asian Netw on Microbial Researches, 93-104. Yogyakarta, Indonesia 23-25th, Febr., 1998

16. Benno Y., 1996.

A semi-automatic system for bacterial identification. Riken Rev.,12(1996): 57-58.

17. Benno Y., 1994.

Rapid methods of isolation and identification of lactic acid bacteria, with a special reference of Lactobacilli and Bifidobacteria. UNESCO Regional workshop on rapid method in Microbiology and Biotechnology, Kasetsart University, Thailand, October 19-28, 1994

THE WEIGHT INCREMENT EFFECT OF MICROBIAL PREPARATION PRO99

Le Thanh Binh, Pham Thi Ngoc Lan, Yoshimi Benno

SUMMARY

The effect of the probiotics formed by two Lactobacilli strains on chicken production has been investigated. The obtained results indicate that the probiotics make clear effects on intestinal microflora of the chicken. The numbers of lactic acid bacteria found in the samples taken from the chicken group fed with the probiotics are much higher than that of the control group, especially at the beginning of the experiment. Meanwhile, E. coli counts found in the second group always are higher than that of the first one at both stages, at beginning and at the end. Particularly interesting is that, the chicken fed with probiotic supplemented feed got weight increments, it is around 11% in comparison with control at the end of the experiment.

1.0.11

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TRIỂN KHAI CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT PHÂN BÓN VI SINH VẬT DẠNG TIỀM SINH

Phạm Văn Toán

VIỆN KHOA HỌC KỸ THUẬT NÔNG NGHIỆP

I. GIỚI THIỆU CHUNG

Phân bón vi sinh vật là sản phẩm sinh học, có tác dụng nâng cao năng suất và chất lượng nông sản, giảm chi phí, tiếp kiệm phân bón vô cơ và góp phần tạo cân bằng sinh thái. Phân bón vi sinh vật có ý nghĩa quan trọng trong việc bảo vệ môi trường và xây dựng nền nông nghiệp sạch bền vững, do vậy nghiên cứu sử dụng rộng rãi phân bón vi sinh vật trong nông lâm nghiệp đã và đang được nhiều nước trên thế giới quan tâm và phát triển. Các kết quả nghiên cứu từ các nước Mỹ, Canada, Nga, Ấn Độ, Thái Lan, Trung Quốc, Nhật Bản... cho thấy sử dụng chế phẩm vi sinh vật có thể cung cấp cho đất và cây trồng từ 30 -60 kgN/ha/năm hoặc thay thế 1/2-1/3 lượng lân vô cơ bằng quặng photphat. Ngoài ra thông qua các hoạt động sống của vi sinh vật cây trồng được nâng cao khả năng trao đổi chất, khả năng chống chịu bệnh tật và qua đó góp phần nâng cao năng suất và chất lượng nông sản. Các loại phân bón vi sinh vật đang được thế giới nghiên cứu và sử dụng có thể kể đến là: Phân vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh, hội sinh và tự do, phân vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan, chế phẩm vi khuẩn lam, chế phẩm nấm rễ ... Tùy theo điều kiện tự nhiên, đặc điểm canh tác của từng vùng và phương thức sử dụng của từng địa phương mà phân bón vi sinh vật được sản xuất từ một chủng hay nhiều chủng vi sinh vật, sử dụng cho 1 đối tượng hay nhiều đối tượng cây trồng trên nền cơ chất tiết trùng hay không tiết trùng khác nhau. Do hệ vi sinh vật rất đa dạng và hiệu quả của phân bón vi sinh vật phụ thuộc vào nhiều yếu tố ngoại cảnh nên nghiên cứu để sử dụng có hiệu quả phân bón vi sinh vật là công việc thường xuyên liên tục của tất cả các quốc gia trên thế giới.

So với lịch sử phát triển của phân bón vi sinh vật trên thế giới việc nghiên cứu thử nghiệm phân vi sinh vật ở Việt Nam còn rất mới mẻ. trong khuôn khổ các đề tài nghiên cứu thuộc chương trình công nghệ sinh học phục vụ nông nghiệp giai đoạn 1986-1990 và chương trình công nghệ sinh học 1991-1995 các đơn vị khoa học trong cả nước đã tập trung nghiên cứu về vi sinh vật cố định nitơ. Kết quả cho thấy các chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ không chỉ tác dụng tăng năng suất cây trồng 6-20% mà còn có khả năng tiếp kiệm 1-2 kg ure/sào/vụ và có tác dụng tích cực trong việc phát triển nền nông nghiệp bền vững. Trên cơ sở các công trình nghiên cứu nói trên hiện nay phân bón vi sinh vật cố định nitơ đã được sản xuất và ứng dụng tại một số địa phương cho một số

đôi tượng cây trồng nông nghiệp chính như lúa, đậu lạc, song qui mô còn hết sức hạn chế và chưa đáp ứng được yêu cầu của người sử dụng. Trong khi đó thực tế sản xuất nông lâm nghiệp Việt Nam lại đòi hỏi một số lượng lớn không chỉ phân vi sinh vật cố định nitơ mà cả phân vi sinh vật phân giải lân, một loại phân vi sinh vật mới được đề cập đến trong khuôn khổ đề tài cấp ngành mà Viện KHKTN Việt Nam đã tiến hành trong giai đoạn 1992-1995. Kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng vi sinh vật phân giải lân có thể thay thế từ 30-50% lượng lân vô cơ cần bón bằng quặng photphat mà năng suất cây trồng không thay đổi. Việt Nam là đất nước nông nghiệp có nhu cầu rất lớn về phân bón. Hàng năm nước ta phải bỏ ra nhiều triệu USD để nhập khẩu phân bón hoặc nguyên liệu làm phân bón. Tiếp tục nghiên cứu để mở rộng việc sử dụng phân bón vi sinh vật nhằm tiết kiệm hoặc thay thế một phần phân bón vô cơ và xây dựng nền nông nghiệp sạch bền vững không chỉ là mối quan tâm của các nhà quản lý mà còn là nhiệm vụ quan trọng đối với các cơ quan khoa học và sản xuất trong cả nước.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Trong quá trình triển khai các phương pháp nghiên cứu sau đã được sử dụng:

- Phương pháp phân lập, tuyển chọn và đánh giá khả năng phân giải photphat khó tan của vi sinh vật theo Gaus(1990)
- Phương pháp nghiên cứu vi sinh vật tiềm sinh theo Gonzaler- Loper và cộng tác viên (1987) đối với *Azotobater*, Waites và Bayliss(1980) đối với *Eacillus*, Sandasivan và Neyra(1985) đối với *Azospirillum*.
- Đánh giá khả năng cố định nitơ của vi sinh vật bằng phương pháp đo hoạt tính khử Axetylen trên máy sắc ký khí Okon (1973), Schoomon (1967) và Balandreau (1982).
- Các phương pháp thông dụng trong nghiên cứu điều kiện sinh trưởng và khả năng tồn tại của vi sinh vật cũng như các phương pháp gieo trồng, chăm sóc và theo dõi sự sinh trưởng phát triển của cây trồng trong thí nghiệm chậu vại, vườn ươm và đồng ruộng.
- Các số liệu thí nghiệm chậu vại, đồng ruộng được xử lý thống kê theo chương trình IRRISTAT.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đánh giá khả năng sử dụng vi sinh vật tiềm sinh làm phân bón vi sinh vật

Tiềm sinh là dạng tồn tại của một số vi sinh vật trong điều kiện không thuận lợi. Khi đó tế bào vi sinh vật được bao bọc bởi một lớp vỏ dày vững chắc. Gặp điều kiện thuận lợi vi sinh vật sẽ tự phá vỏ bọc và lại sinh trưởng, phát triển bình thường. Các chủng vi sinh vật tiềm sinh được tuyển chọn và sử dụng trong nghiên cứu được tập hợp trong bảng 1.

Bảng 1. Các chủng vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân có khả năng tồn tại dưới dạng tiềm sinh

Chủng vi sinh vật	Ký hiệu	Dạng tiềm sinh
<i>Azotobater chroococum</i>	AT03	Cyst (nang bào)
<i>Azotobater Bejerinski</i>	AT18	Cyst (nang bào)
<i>Azotobater Agilis</i>	AT19	Cyst (nang bào)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Az12	Cyst (nang bào)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Az14	Cyst (nang bào)
<i>Bacillus polymyxa</i>	B03	Spore (bào tử)
<i>Bacillus subtilis</i>	B04	Spore (bào tử)
<i>Bacillus megatherium var phosphaticum</i>	B14	Spore (bào tử)

Bằng các phương pháp tạo tiềm sinh khác nhau (thay đổi áp suất thẩm thấu, thay đổi điện thế oxy hoá khử và bổ sung hoá chất kích thích tạo bào tử (nang bào) để tài đã chuyển đổi thành công vi sinh vật từ dạng sinh dưỡng sang dạng tiềm sinh với tỷ lệ 80-90%. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Khả năng chuyển đổi của vi sinh vật từ dạng sinh dưỡng sang dạng tiềm sinh

Vi sinh vật	Phương pháp tạo tiềm sinh			
	Kiểm hoá	Axit hoá	Thay đổi áp suất thẩm thấu	Bổ sung hoá chất kích thích
<i>Bacillus</i>	++	++	+	+++
<i>Azotobater</i>	+	+	++	+++
<i>Azospirillum</i>	+	+	++	+++

+

Mức độ tạo tiềm sinh yếu (<10%)

++

Mức độ tạo tiềm sinh trung bình (<50%)

+++

Mức độ tạo tiềm sinh mạnh >80%

Kiểm hoá: Nâng pH môi trường đạt $\geq 9,0$

Axit hoá: Giảm pH môi trường xuống <4,5

Thay đổi áp suất thẩm thấu: Bổ sung đường Glucoza hoặc Saccharoza nồng độ 15%

Hoá chất: Glutamat 0,1% đối với *Bacillus*

Butanol 0,3% đối với *Azotobater*

KNO_3 0,5mM và Fructoza 8mM đối với *Azospirillum*.

Vi sinh vật dạng tiềm sinh có thể tồn tại trong các điều kiện bất lợi. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Khả năng tồn tại của vi sinh vật tiềm sinh

Điều kiện môi trường	Vi sinh vật		
	<i>Bacillus</i>	<i>Azotobater</i>	<i>Azospirillum</i>
pH = 9,0	+++	+++	+++
pH = 4,0	+++	+++	+++
Độ ẩm 10%	+++	+++	+++
Urê 5%	+++	+++	+++
Urê 10%	+++	++	+
KCl 3%	+++	+++	+++

+++ Mật độ vi sinh vật không thay đổi sau 30 ngày bảo quản

++ Mật độ vi sinh vật bị giảm 2 số mũ sau 30 ngày bảo quản

+ Mật độ vi sinh vật bị giảm 3 số mũ sau 30 ngày bảo quản

Qua bảng 3 cho thấy vi sinh vật dạng tiềm sinh có thể tồn tại trong các điều kiện khắc nghiệt. Kết quả mật độ vi sinh vật không thay đổi ở nồng độ lớn các chất hoà tan (áp suất thẩm thấu cao: urê 5%, KCl 3%) mở ra triển vọng có thể phối hợp vi sinh vật tiềm sinh với các dạng phân NPK hoặc phân hữu cơ tạo ra sản phẩm phân vi sinh vật tổng hợp. Với nồng độ urê $\geq 10\%$ mật độ vi sinh vật dạng nang bào tử bị giảm mạnh, trong khi mật độ vi sinh vật dạng bào tử không thay đổi. Trong trường hợp này để tạo ra phân vi sinh vật tổng hợp cần tiếp tục nghiên cứu thêm.

Sau khi trở lại trạng thái bình thường từ dạng tiềm sinh hoạt tính sinh học của các chủng nghiên cứu hầu như không có sự thay đổi đặc biệt. Số liệu trong bảng 4 và bảng 5 chứng tỏ điều này.

Bảng 4. Khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của *Bacillus*

Chủng vi sinh vật	Vòng phân giải	
	Thời gian hình thành (ngày)	Đường kính (cm)
B03 sinh dưỡng	3	1,15
B03 tiềm sinh	3	1,10
B04 sinh dưỡng	3	1,07
B04 tiềm sinh	3	1,08
B14 sinh dưỡng	2	0,98
B14 tiềm sinh	2	0,97

Bảng 5. Hoạt tính cố định nitơ của *Azotobacter* và *Azospirillum*

Chủng vi sinh vật	Hoạt tính cố định nitơ (nmolC ₂ H ₄ /ml/giờ)
AT03	70,72
AT03 Cyst	63,23
AT18	65,60
AT18 Cyst	65,00
AT19	59,3
AT19 Cyst	59,7
Az12	58,3
Az12 Cyst	56,2
Az14	65,5
Az14 Cyst	66,1

Tác động của việc nhiễm các dạng vi sinh vật khác nhau đến sinh trưởng và phát triển của lúa được trình bày trong bảng 6. Kết quả cho thấy sự sai khác về ảnh hưởng của vi sinh vật dạng tiềm sinh đến sự sinh trưởng, phát triển của cây lúa so với dạng sinh dưỡng là không đáng kể.

Bảng 6. Ảnh hưởng của vi sinh vật đến sự sinh trưởng phát triển của lúa CR203 (thí nghiệm chậu vại trên đất vô trùng)

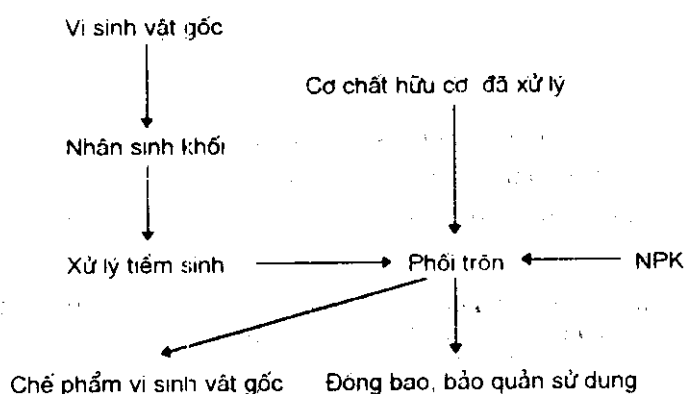
Chủng vi sinh vật	Chỉ tiêu theo dõi			
	Cao cây (cm)	Số nhánh/vai	Trọng lượng khô thân lá (g/vai)	Trọng lượng khô rễ (g/vai)
AT03	91,7	7,7	13,60	2,62
AT03 Cyst	95,7	7,7	14,85	2,59
AT18	96,7	9,0	18,72	3,49
AT18 Cyst	97,0	9,3	18,35	3,68
AT19	93,7	8,0	14,04	3,20
AT19 Cyst	91,3	8,0	13,60	2,98
B03	91,0	8,3	12,60	2,83
B03 Spore	93,3	8,0	13,67	2,90
B04	95,7	7,7	14,89	2,51
B04 Spore	96,7	7,3	13,13	2,65
B14	96,3	9,7	19,96	2,94
B14 Spore	95,7	9,3	16,76	2,71
LSD _{0,05}	4,47	3,53	4,77	1,14

Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu trên đây có thể rút ra kết luận sau:

Vi sinh vật dạng tiềm sinh có khả năng tồn tại trong các điều kiện bất lợi, ngay cả trong môi trường có áp suất thẩm thấu cao, có độ pH kiềm hoặc axit. Sau khi trở lại trạng thái bình thường hoạt tính của vi sinh vật hầu như không thay đổi và có ảnh hưởng tốt đến sinh trưởng phát triển của cây trồng tương tự như dạng sinh dưỡng. Kết quả nghiên cứu mở ra hướng sử dụng mới cho phân bón vi sinh vật.

2. Nghiên cứu triển khai công nghệ sản xuất phân bón vi sinh vật tiềm sinh trên nền cơ chất hữu cơ, đa, vi lượng

Tóm tắt qui trình công nghệ sản xuất phân bón vi sinh vật tiềm sinh trên nền hữu cơ không khử trùng được thể hiện trong sơ đồ 1.



Sơ đồ 1. Quy trình sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân trên nền hữu cơ đa vi lượng

Việc tạo ra sinh khối vi sinh vật tiềm sinh có mật độ cao là công đoạn quan trọng trong quá trình sản xuất. Bằng phương pháp bổ sung hóa chất tạo tiềm sinh, để tái đa xử lý sinh khối vi sinh vật sau thời gian lên men 48 giờ bảo đảm mật độ tương đương như sinh khối vi sinh vật sinh dưỡng. Kết quả được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7. Mật độ vi sinh vật trước và sau khi xử lý

Chủng vi sinh vật	Mật độ vi sinh vật (CFU/ml)	
	Dạng sinh dưỡng	Dạng tiềm sinh
AT03	$3,60 \times 10^9$	$1,15 \times 10^9$
AT18	$4,25 \times 10^9$	$1,19 \times 10^9$
AT19	$3,13 \times 10^9$	$1,31 \times 10^9$
Az12	$6,25 \times 10^9$	$2,12 \times 10^9$
Az14	$4,83 \times 10^9$	$1,32 \times 10^9$
BO3	$2,13 \times 10^{10}$	$6,75 \times 10^9$
BO4	$3,21 \times 10^{10}$	$8,32 \times 10^9$
B14	$3,33 \times 10^{10}$	$6,87 \times 10^9$

Sinh khối vi sinh vật dạng tiềm sinh được phối trộn với chất mang đã được xử lý (phối khô, nghiền mịn qua rây 0.5mm) tạo ra chế phẩm gốc và sau đó phối trộn tiếp với phân nền hoặc phối trộn trực tiếp với phân hữu cơ tổng hợp tạo thành sản phẩm phân hữu cơ vi sinh tổng hợp. Khả năng tồn tại của vi sinh vật tiềm sinh trong phân bón được kiểm tra định kỳ và kết quả thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8. Khả năng tồn tại của vi sinh vật trong phân bón vi sinh vật trên nền hữu cơ đa vi lượng

Loại chế phẩm	Mật độ vi sinh vật (CFU/g) sau thời gian bảo quản (tháng)					
	1	2	3	4	5	6
AT03	$2,9 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	$2,55 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
AT18	$2,9 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$2,32 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$9,7 \times 10^8$
AT19	$2,7 \times 10^9$	$2,65 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$
BO3	$2,5 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$1,85 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$
BO4	$3,3 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$2,45 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
B14	$2,8 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
Az12	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
Az14	$2,6 \times 10^9$	$2,52 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,45 \times 10^9$	$2,32 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$

Số liệu bảng 8 cho thấy sau 6 tháng bảo quản mật độ vi sinh vật hữu hiệu trong chế phẩm gốc đạt 10^9 CFU/g chế phẩm, bảo đảm tiêu chuẩn Việt Nam về phân bón vi sinh vật.

Tác động của phân vi sinh vật dạng tiềm sinh trên cây trồng thử nghiệm trên lúa tại viện KHKTTN Việt Nam. Kết quả được trình bày trong bảng 9.

Bảng 9. Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật tiềm sinh đến lúa CR203 (thí nghiệm chậu vại vụ , n=5)

Công thức thí nghiệm	Chỉ tiêu theo dõi				
	Cao cây (cm)	Nhánh/khóm	Trọng lượng hạt/khóm	Tỷ lệ lép (%)	Trọng lượng hạt thực thu (g/khóm)
Đối chứng	89,26	4,20	11,54	13,08	10,28
AT sinh dưỡng	91,24 ^{ns}	4,60	14,22 ^{**}	16,14	11,84 ^{**}
AT tiềm sinh	90,26 ^{ns}	4,32	12,42 ^{ns}	7,62	11,22 ^{**}
Az sinh dưỡng	90,96 ^{ns}	4,62	14,42 ^{**}	15,54	12,18 ^{**}
Az Tiềm sinh	90,24 ^{ns}	4,50	14,22 ^{**}	15,38	12,04 ^{**}
Ba sinh dưỡng	90,52 ^{ns}	4,60	14,20 ^{**}	14,56	12,20 ^{**}
Ba tiềm sinh	90,64 ^{ns}	4,54	14,00 ^{**}	14,02	12,04 ^{**}
LSD _{0,05}	2,27	-	0,99	-	0,63
LSD _{0,01}	3,07	-	1,34	-	0,86

** Sai số có ý nghĩa ở mức 99%

ns: Sai số không có ý nghĩa ở mức 95%

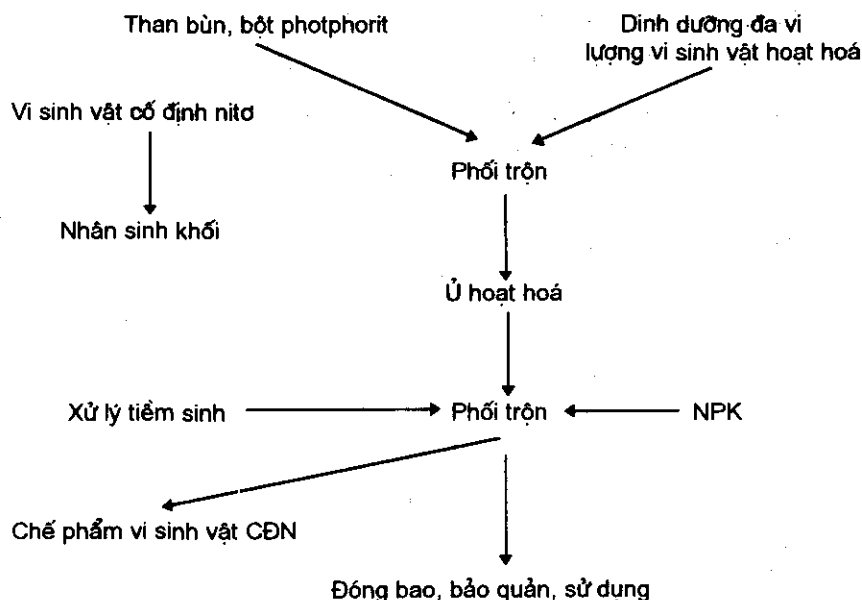
Qua bảng 9 cho thấy ảnh hưởng của vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân đến sự sinh trưởng của lúa ở giai đoạn đầu là không đáng kể (không thấy sự sai khác có ý nghĩa ở mức 95%, về chiều cao cây so với đối chứng). Đến cuối giai đoạn sinh trưởng vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân có ảnh hưởng rõ rệt đối với cây thể hiện qua trọng lượng hạt/khóm và năng suất thực thu cuối cùng. Sự sai khác giữa đối chứng không bón vi sinh vật và bón vi sinh vật có ý nghĩa ở mức 99%. Giữa công thức bón vi sinh vật dạng sinh dưỡng và tiềm sinh không có sự sai khác có ý nghĩa ở mức 95%.

Quy trình sản xuất phân bón tổng hợp (BIOMIX) chứa vi sinh vật cố định nitơ tiềm sinh đã được thử nghiệm tại xí nghiệp phân vi sinh Sơn Tây - Công ty vật tư phân bón Pháp Vân- Bộ Nông nghiệp & Phát triển nông thôn (sơ đồ 2) và phân hữu cơ lân vi sinh tại Công ty sinh hóa nông nghiệp và thương mại Thiên Sinh - Thành phố Hồ Chí Minh (sơ đồ 3).

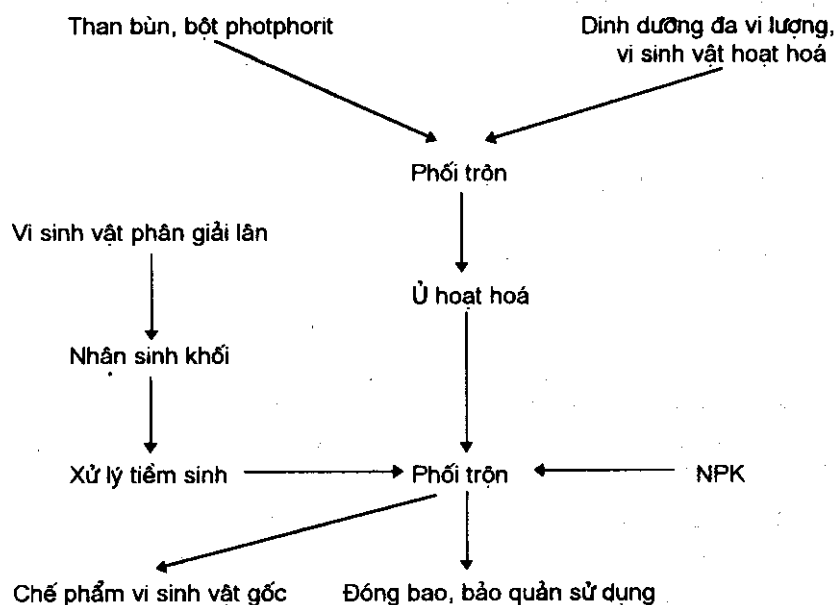
Chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ dạng tiềm sinh được sản xuất tại Viện KHKTNN Việt Nam.

Đây là 2 cơ sở sản xuất có công suất hàng ngàn tấn/năm. Chất lượng phân Biomix và phân hữu cơ lân vi sinh được trung tâm đo lường chất lượng 1 và 3 kiểm tra. Kết quả cho thấy 2 loại phân này luôn đảm bảo TCVN về phân bón vi sinh vật, mật độ vi sinh hữu hiệu đạt $> 10^6$ CFU/g (phiếu kiểm tra chất lượng kèm theo).

Sản phẩm phân bón vi sinh vật tiềm sinh trên nền hữu cơ, đa, vi lượng đã được viện Khoa học nông nghiệp miền Nam và viện Nông hoá thổ nhưỡng khảo nghiệm trên các đối tượng cây trồng nông nghiệp khác nhau.



Sơ đồ 2. Quy trình sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ cho lúa và cây trồng cạn trên nền hữu cơ đa vi lượng tại xí nghiệp phân vi sinh Sơn Tây - công ty vật tư phân bón Pháp Vân - Bộ NN & PTNT



Sơ đồ 3. Quy trình sản xuất phân vi sinh vật phân giải lân trên nền hữu cơ, đa vi lượng tại Công ty hoá sinh nông nghiệp và thương mại Thiên Sinh, TP Hồ Chí Minh

Kết quả khảo nghiệm cho thấy:

- Phân lân hữu cơ vi sinh KOMIX có tác dụng tăng năng suất lúa 8-11% trên 3 loại đất phèn trung bình, phèn nặng và đất xám điển hình ở Sóc Trăng, Đồng Tháp Mười, tăng năng suất cà chua 2,9-5,2 T/ha và cải bông lên 16,8%. Phân lân hữu cơ KOMIX có thể thay thế được 1/2 lượng lân cần bón mà không ảnh hưởng đến năng suất cây trồng.
- Phân sinh học tổng hợp BIOMIX có tác dụng tăng năng suất lúa 12,02% trên đất phù sa, 19,59% trên đất bạc màu, khi giảm 20% NPK phân BIOMIX vẫn tăng năng suất lúa 4,07-16,22%. Đối với ngô khi sử dụng BIOMIX năng suất tăng 10,2-10,97%, nếu giảm 20% NPK không nhận thấy sự sai khác đáng kể so với đối chứng. Phân BIOMIX làm tăng năng suất chè 18%, nếu giảm 30% NPK vẫn ghi nhận được mức tăng năng suất chè là 5,6%

Sản phẩm phân lân hữu cơ vi sinh KOMIX và phân sinh học BIOMIX đã được nghiệm thu trước hội đồng khoa học bộ Nông nghiệp & PTNT với kết quả khá, được công nhận là tiến bộ kỹ thuật và cho phép đăng ký vào danh mục các loại phân bón được phép sử dụng tại Việt Nam (văn bản kèm theo). Hiệu quả trên các đối tượng cây trồng của 2 loại phân bón nêu trên được trình bày trong các bảng...*(số liệu trích dẫn từ báo cáo kết quả khảo nghiệm của Viện Khoa học nông nghiệp Miền Nam và Viện Nông hoá thổ nhưỡng).*

Bảng 10. Tác dụng của phân lân hữu cơ vi sinh KOMIX trên cây lúa

Loại đất	Công thức	Năng suất (tấn/ha)	% tăng so với đối chứng
Đất phèn Sóc Trăng	ĐC NPK ¹	2.91	-
	500kg LHCVS + NK	4.05 a	39.17
	500kg LHCVS + 1/2P + NK	4.12 a	41.58
	500kg LHCVĐC: NPK S + NPK	4.13 a	41.92
Đất phèn nặng Đồng Tháp Mười	ĐC NPK S + NPK ²	4.56 ab	-
	500kg LHCVS + NK	4.07 c	- 11.00
	500kg LHCVS + 1/2P + NK	4.37 bc	- 4.00
	500kg LHCVS + NPK	5.03 a	10.00
Đất phèn trung bình Đồng Tháp Mười	ĐC: NPK S + NPK ³	5.80 b	-
	500kg LHCVS + NK	5.41 c	-6.77
	500kg LHCVS + 1/2P + NK	5.96 b	2.76
	500kg LHCVS + NPK	6.00 a	3.45
Đất xám Đồng Tháp Mười	ĐC: NPK S + NPK ⁴	6.75 ab	-
	500kg LHCVS + NK	6.08 b	-1.00
	500kg LHCVS + 1/2P + NK	7.76 a	6.00
	500kg LHCVS + NPK	7.32 a	8.00

Ghi chú: NPK¹: 200 kg Urê + 300kg SSP + 50kg KCl

NPK²: 95N + 54 P₂O₅ + 40 K₂O

NPK³: 92N + 69 P₂O₅ + 30 K₂O

NPK⁴: 92N + 60 P₂O₅ + 30 K₂O

Bảng 11. Tác dụng của phân lân hữu cơ vi sinh trên cây rau

Cây trồng	Công thức	Năng suất (tấn/ha)	% tăng so với đối chứng
Cà chua	Nền bón địa phương ¹	24.7	-
	500kg LHCVS + NK + PC	29.6	19.84
	500kg LHCVS + NK + 1/2PC	27.4	9.31
Cải bông	Nền bón địa phương ²	2.445*	-
	500kg LHCVS + PC	2.850	16.56
	500kg LHCVS + 2500kg SSP + PC + MS	3.840	57.00
	500kg LHCVS + 1/2 SSP + 1/2 MS	3.900	59.51

Nền bón địa phương¹: 50 tấn phân chuồng + 600kg NPK + 200 kg DAP + 60kg Urê + 1000 kg bánh dầu + 100kg phân lân

Nền bón địa phương²: 3000 kg phân chuồng (PC) + 2500kg SSP + 1500kg Mạt sừng (MS)

*: Năng suất cải bông/1000 m²

Bảng 12. Ảnh hưởng của phân sinh học tổng hợp Biomix đến năng suất lúa

Loại đất	Công thức thí nghiệm	Thí nghiệm diện hẹp		Thí nghiệm diện rộng	
		Năng suất (tạ/ha)	% tăng so với đối chứng	Năng suất (tạ/ha)	% Tăng so với đối chứng
Phù sa Sông Hồng	1/Nền địa Phương	51,6	-	Không theo dõi	
	2/ Giảm 20% NPK của 1 + Biomix	53,7	4,07	Không theo dõi	
	3/ Nền + Biomix	57,8	12,02		
Bạc màu Bắc Giang	1/Nền địa phương	29,6	-	35,5	
	2/ Giảm 20%NPK của 1 + Biomix	34,4	16,22	38,4	8,17
	3/ Nền + Biomix	35,4	19,59	không theo dõi	

LSD_{0.05} Đất phù sa 3,3

Đất bạc màu 1,8

* Nền địa phương : 8 tấn phân chuồng, 90N, 45P₂O₅, 30K₂O

* Biomix 555 kg/ha

Bảng 13. Ảnh hưởng của phân sinh học tổng hợp Biomix đến năng suất ngô

Loại đất	Công thức thí nghiệm	Thí nghiệm diện hẹp		Thí nghiệm diện rộng	
		Năng suất (tạ/ha)	% tăng so với đối chứng	Năng suất (tạ/ha)	% tăng so với đối chứng
Phù sa Sông Hồng	1/Nền địa Phương	41,4	-	41,4	-
	2/Giảm 20% NPK của 1 + Biomix	40,3	-2,66	40,1	-3,15
	3/Nền + Biomix	45,3	9,4	43,6	5,31
Bạc màu Bắc Giang	1/Nền địa phương	29,5	-	không	
	2/Giảm 20%NPK của 1 + Biomix	28,7	-2,72	theo dõi	
	3/Nền + Biomix	32,5	10,20		
LSD _{0.05}	đất phù sa	2,2			
	đất bạc màu	1,6			

* Nền địa phương : 10 tấn phân chuồng 180N, 120P₂O₅, 90K₂O

* Biomix 555 kg/ha

Bảng 14. Ảnh hưởng của phân sinh học tổng hợp đến năng suất chè tươi

Công thức thí nghiệm	Thí nghiệm diện hẹp		Thí nghiệm diện rộng	
	Năng suất (ta/ha)	% tăng so với đối chứng	Năng suất (ta/ha)	% Tăng so với đối chứng
1/Nền địa Phương	142,9	-	223,8	-
2/Giảm 30%NPK của 1 + Biomix	151,0	5,6	239,5	7,02
3/Nền + Biomix	168,6	17,98	Không theo dõi	

* Nền địa phương: 120N, 60P₂O₅, 60K₂O

* Biomix: 555kg/ha

VI. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật tạo tiềm sinh đối với một số nhóm vi sinh vật cố định nitơ, phân giải hợp chất photpho khó tan để tài đã nghiên cứu và xây dựng thành công qui trình sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân trên nền chất mang không khử trùng. Qui trình sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ trên nền hữu cơ đa vi lượng đã được thử nghiệm tại Xí nghiệp phân vi sinh Sơn Tây - Công ty phân bón Pháp Vân - Bộ NN&PTNT. Chất lượng phân vi sinh vật dạng mới đảm bảo tiêu chuẩn Việt Nam. Sản phẩm của đề tài có tác dụng tăng năng suất lúa 12,02-19,59%, ngô 10,2-10,97%, chè 26,7%, lạc 23,7%...trong đó có thể giảm bớt 30% NPK đối với chè, 20% NPK đối với lúa và 50% lân đối với lạc mà vẫn đảm bảo năng suất.

Qui trình sản xuất phân lân vi sinh trên nền hữu cơ đa vi lượng được áp dụng tại công ty Hoá sinh nông nghiệp & Thương mại "Thiên Sinh". Sản phẩm phân lân hữu cơ vi sinh KOMIX có tác dụng tăng năng suất lúa 8-11% trên 3 loại đất phèn trung bình, phèn nặng và đất xám điển hình ở Sóc Trăng, Đồng Tháp Mười, tăng năng suất cà chua 2,9-5,2 T/ha và cải bông lên 16,8%. Phân lân hữu cơ KOMIX có thể thay thế được 1/2 lượng lân cần bón mà không ảnh hưởng đến năng suất cây trồng. Hai sản phẩm (phân sinh học BIOMIX và phân lân hữu cơ vi sinh KOMIX) đã được công nhận là tiến bộ kỹ thuật và được đăng ký trong danh mục các loại phân bón được phép sử dụng tại Việt Nam.

RESULTS OF RESEARCH AND APPLICATION OF THE TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF BIOFERTILIZER FROM DORMANT MICROORGANISMS

Pham Van Toan

SUMMARY

Some microorganisms like Bacillus, Azotobacter and Azospirillum can be formed in dormancy. In this form microorganisms can better survive. In comperation with the vegetative cell the dormant microorganisms have no different in the effect of plant growth. The technology for the production of biofertilizer from dormant microorganism was developt and applicated in some companies, Biofertilizer produced from dormant Bacillus, Azotobacter or Azospirillum can make the yield of rice, maize, tea and groundnut increase.

1.0.12

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÁT TRIỂN CỦA TẢO *Spirulina platensis* TRONG NƯỚC THẢI NHÀ MÁY VISSAN

Nguyễn Đức Lương, Nguyễn Thanh Mai
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA TP. HỒ CHÍ MINH.

I. MỞ ĐẦU

Theo Hill. C (1980), hiện nay trên trái đất của chúng ta có khoảng 23.000 loài vi tảo. Trong đó có khoảng 70 loài đã được nghiên cứu kỹ về sinh lý, sinh hóa. Hai loài tảo *Spirulina platensis* và *Chlorella pyrenoidosa* đã được nghiên cứu rất chi tiết.

Tuy nhiên, những nghiên cứu về khả năng phát triển của chúng trong nước thải của nhà máy giết mổ gia súc chưa được đề cập đến. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm tìm hiểu khả năng phát triển của tảo *Spirulina platensis* trong nước thải nhiều chất hữu cơ rất đặc trưng.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

• Các loài tảo

Spirulina platensis có nguồn gốc từ Pháp và được chuyển giao, nuôi cấy, giữ giống tại Trung tâm nuôi dưỡng trẻ em thành phố Hồ Chí Minh.

Nước thải sử dụng trong nghiên cứu là nước thải nhà máy giết mổ gia súc Vissan được lấy tại cống xả nước chung của toàn bộ khu nhà mổ.

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu là những hóa chất có độ tinh khiết cao tại Phòng thí nghiệm vi sinh Trường Đại học Bách khoa TP. HCM.

Các thiết bị cho phân tích gồm pH kế hiệu ORION(USA), máy đo OD hiệu KOK - 2YX 14.2 (USSR), cân điện tử hiệu CE. 95 (Germany) máy chưng cất đạm Gerhardt, máy phân tích đạm tự động, kính hiển vi quang học.

2. Phương pháp

- Xác định đạm tổng số bằng phương pháp Kjeldahl, đạm hòa tan bằng phương pháp Lowry.
- Xác định sinh khối bằng phương pháp đo OD trên máy KOK - 2YX 14.2. Các phương pháp thông dụng khác dùng để xác định pH, COD, BOD và các chất hóa học có trong môi trường.

- Xử lý số liệu thí nghiệm bằng phương pháp thống kê theo chương trình SPSS 7.53 (Md Abdul Miah, 1994), qui hoạch thực nghiệm theo phương pháp TYT (Nguyễn Cảnh, 1993).

III. KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM VÀ THẢO LUẬN

1. Thành phần hóa học của nước thải nhà máy Vissan

Nước thải nhà máy Vissan có thành phần hóa học dao động trong một khoảng rất rộng. Chúng tôi đã tiến hành lấy mẫu ở các thời điểm: sáng, trưa, chiều, tối và tiến hành phân tích ngay. Số liệu sau đây là số liệu trung bình thu nhận được sau khi phân tích các mẫu ở các ngày 19/4, 24/4, 28/4, năm 1999.

Bảng 1

Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả
pH		6,7-7,3
SS	mg/l	320 - 530
Tổng N	mg/l	212 - 240
N - NH_4	mg/l	77 - 83
Tổng P	mg/l	21 - 30
BOD_5	mg/l	750 - 1800
COD	mg/l	1850 - 3400
Ca^{+2}	mg/l	25 - 35
Mg^{+2}	mg/l	5,6 - 13,3
HCO_3^-	mg/l	25 - 50
Pb^{+2}	mg/l	<0,01
Zn^{+2}	mg/l	<0,01
Hg^{+2}	$\mu\text{g/l}$	0,001
Cd^{+2}	mg/l	<0,01

2. Sự phát triển của *Spirulina platensis* trong nước thải Vissan

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành pha loãng nước thải Vissan gấp đôi lượng ban đầu. Bằng phương pháp thí nghiệm loại trừ từng yếu tố và tiến hành thí nghiệm so sánh với mẫu thí nghiệm nuôi tảo trong môi trường chuẩn Zarouk, chúng tôi thu được một số kết quả như sau:

Bảng 2

Thời gian (ngày) \ Môi trường	Môi trường là nước thải Vissan	Môi trường khuẩn Zarrouk
0	0,25	0,25
3	0,29	0,35
5	0,44	0,49
7	0,48	0,55
9	0,51	0,71
11	0,59	0,84
13	0,67	0,93
15	0,75	1,02
17	0,72	1,08
19	0,61	1,00
21	0,58	0,99

Từ kết quả trên cho thấy sinh khối tảo *Spirulina platensis* phát triển khá tốt trong môi trường nước thải Vissan khi được pha loãng 2 lần và đạt khoảng 74% sinh khối so với nuôi chúng trong môi trường chuẩn. Thời gian thu được sinh khối nhanh hơn khi nuôi chúng trong môi trường chuẩn khoảng 1 ngày. Sau đó chúng tôi thực hiện thí nghiệm bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm TYT và kiểm chứng bằng phương pháp thống kê SPSS 7.53. Ở đây, chúng tôi chọn:

3 yếu tố để nghiên cứu là:

X_1 : Thời gian

X_2 : pH

X_3 : Nồng độ Bicacbonat Natri (NaHCO_3).

Bảng 3

Các yếu tố	Ký hiệu	Mức trên (+)	Mức ở trên (0)	Mức dưới (-)	Bước nhảy
Thời gian	X_1	17	15	13	2
pH	X_2	9,2	9,0	8,8	0,2
NaHCO_3	X_3	15	13	11	2

Ma trận thực nghiệm :**Bảng 4**

Mẫu thí nghiệm	X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃	Y [^]
1	+	+	+	+	+	+	+	+	0,25
2	+	-	+	+	-	-	+	-	0,49
3	+	+	-	+	-	+	-	-	0,55
4	+	-	-	+	+	-	-	+	0,84
5	+	+	+	-	+	-	-	-	0,93
6	+	-	+	-	-	+	-	+	1,02
7	+	+	-	-	-	-	+	+	1,03
8	+	-	-	-	+	+	+	-	1,00

Phương trình hồi qui chọn có dạng: (1)

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_1x_2 + b_5x_1x_3 + b_6x_2x_3 + b_7x_1x_2x_3.$$

Bằng phương pháp SPSS 7.53 ta tính được:

$$\begin{aligned} b_0 &= 80,34 & b_1 &= 4,53 & b_2 &= 8,89 & b_3 &= 6,22 \\ b_4 &= 0,48 & b_5 &= 0,32 & b_6 &= 0,67 & b_7 &= 0,03 \end{aligned}$$

Thay vào phương trình trên ta có:

$$Y = -80,34 + 4,53x_1 + 8,89x_2 + 6,22x_3 - 0,48x_1x_2 - 0,32x_1x_3 - 0,67x_2x_3 + 0,03x_1x_2x_3.$$

Sau khi tra trên chuẩn Fisher thấy phương trình hồi qui tương thích.

Từ phương trình trên ta thấy yếu tố pH có tác động mạnh nhất đến sự phát triển của *Spirulina platensis*, sau đó là hàm lượng Bicacbonat Natri và sau cùng là yếu tố thời gian.

Ngoài ra sự tương tác giữa pH và nồng độ Bicacbonat Natri có ý nghĩa hơn giữa thời gian và pH hay giữa thời gian và Bicacbonat Natri.

Sinh khối tảo được thu nhận và đem phân tích Protein tổng số cho thấy chúng chiếm tới 58,65% trọng lượng khô.

Nước thải sau khi nuôi tảo có chỉ số COD là 109 mg/l và BOD là 45 mg/l, đủ tiêu chuẩn thải ra môi trường.

IV. KẾT LUẬN

Sau khi nghiên cứu sự phát triển của tảo *Spirulina platensis* trong nước thải Vissan, chúng tôi rút ra được một số kết luận sau:

1. Điều kiện tối ưu để tảo *Spirulina platensis* phát triển trong nước thải Vissan là:
 - Tỷ lệ pha loãng nước thải 2 lần.
 - Thời gian nuôi cấy là 17 ngày.
 - pH tối ưu là 8,8.
2. Sau khi tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, sinh khối thu nhận được khi nuôi trong nước thải tương đương khi nuôi chúng trong môi trường chuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Nguyễn Cảnh, 1993.*
Qui hoạch thực nghiệm. Trường ĐH BKTPHCM.
2. *Buhn H.O.Miller S.P., 1983.*
A dynamic model of the high - rate Algal - Bacterial wastewater treatment pond water research Vol. 17.N^o I, pp, 29, 27.
3. *Hill C. 1980.*
The secrets of Spirulina, Medical discoveries of Japanese doctors University of the Tress-pp 759-763.
4. *Misthell S.A Richment N., 1988.*
Optimization of a Growth medium for Spirulina based on cattle waste. Biological wastes 25.pp-41-50

GROWTH OF *Spirulina Platensis* IN VISSAN WASTEWATER

Nguyen Duc Luong, Nguyen Thanh Mai

SUMMARY

Spirulina Platensis grows very well in Vissan wastewater Experiment has got optimal growth condition as following:

- Dilution level: 2 times
- NaHCO_3 : 11g/l
- Optimal 8,8
- Harvest time: 17 days.

1.0.13

CHỌN CHŨNG VI KHUẨN PHÂN HUỖ HYDROCARBON MẠCH DÀI ỨNG DỤNG TRONG KHAI THÁC DẦU KHÍ

Lại Thuý Hiền, Phạm Thu Thuý, Đặng Phương Nga,
Đỗ Thu Phương, Hoàng Hải, Phạm Thị Hằng
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Trong tự nhiên, tồn tại rất nhiều chủng vi sinh vật có khả năng sử dụng hydrocarbon. Theo Birshchev (1954), có tới 200 loài vi sinh vật có khả năng phân huỷ hydrocarbon, bao gồm vi khuẩn, nấm mốc, nấm men và xạ khuẩn. Các ankan mạch trung bình dễ bị phân huỷ nhất, hydrocarbon mạch dài khó phân huỷ hơn, khó nhất vẫn là các hợp chất vòng thơm và nhựa. Vì vậy, trong quá trình khai thác dầu nhất là dầu nhiều parafin của Việt Nam, việc lựa chọn các chủng vi khuẩn sử dụng hydrocarbon mạch dài có ý nghĩa quan trọng. Chúng làm cho dầu từ trạng thái vốn cục bị loãng ra, linh động hơn, dễ chảy và dễ khai thác hơn.

Phương pháp dùng vi sinh vật nâng cao hiệu suất khai thác dầu được Zobell, người Mỹ, ứng dụng từ năm 1946. Bản chất của phương pháp này là bơm định kì các chủng vi sinh vật hoặc các sản phẩm do vi sinh vật tạo ra như biopolimer, chất hoạt hóa bề mặt, hoặc các chất dinh dưỡng và muối khoáng vào vỉa để nuôi cấy, kích thích sự hoạt động của vi sinh vật có sẵn trong các vỉa dầu.

Trong những năm gần đây, phương pháp này tỏ ra rất có hiệu quả ứng dụng trong khai thác dầu ở nhiều nước. Năm 1990, ở Mỹ, Bryant dùng hỗn hợp vi khuẩn làm tăng hiệu suất khai thác dầu từ 13-20%. Ở Nga, trong 10 năm liền đã sử dụng vi sinh vật nâng cao hiệu suất khai thác dầu 35% ở nhiều mỏ khác nhau. Ở Úc, Sheehy dùng hỗn hợp vi khuẩn sinh khí và vi khuẩn tạo chất hoạt hóa bề mặt làm giảm sức căng bề mặt giữa dầu và nước, tăng hiệu suất khai thác dầu tới 40%. Ở Việt Nam, các Công ty dầu khí đang tiến hành bơm ép nước hoặc nén khí vào vỉa để duy trì áp suất vỉa, góp phần nâng cao hiệu suất khai thác dầu. Tuy nhiên, các phương pháp này chưa đáp ứng được nhu cầu của thực tế sản xuất. Do đó, việc tìm kiếm những chủng vi khuẩn có khả năng nâng cao hiệu suất khai thác dầu là vấn đề khả thi và cấp bách hiện nay.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Tám chủng vi khuẩn lấy từ nước biển, cát biển và giếng khoan khai thác dầu, mỏ Bạch Hổ, Vũng Tàu.

2. Chúng vi khuẩn được bảo quản hoặc trên môi trường khoáng Gost-902374 với cơ chất là dầu mỏ hoặc giữ đông khô hoặc giữ trong glixerin 50%.
3. Sử dụng dầu thô Bạch Hổ làm nguồn cacbon cho vi khuẩn phát triển.
4. Quan sát hình thái tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi quang học Laboval 4 và kính hiển vi điện tử JEM 1010 (Nhật). Phủ bóng mẫu bằng kim loại (crom) trong thiết bị bay hơi chân không JEOL EM 6B (Nhật).
5. Đánh giá khả năng phát triển của vi khuẩn trên dầu mỏ bằng cách nuôi lác trong môi trường muối khoáng với dầu thô là nguồn carbon duy nhất, tốc độ lác 180 vòng/phút
6. Đánh giá, phân tích khả năng phân huỷ dầu mỏ bằng hai phương pháp: cân trọng lượng và sắc ký khí. Sử dụng cột mao quản CP-5 và xử lý theo Pros-Nelson 87.
7. Thử nghiệm khả năng phân huỷ dầu thô của chúng lựa chọn trong điều kiện mô hình vỉa với sự giúp đỡ của Viện NHIPI. Đánh giá sự thay đổi chất lượng và thành phần của dầu thô dựa vào các chỉ tiêu: thành phần hydrocarbon, độ nhớt, tỷ trọng, nhiệt độ đông đặc.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đánh giá khả năng sử dụng dầu thô của các chủng vi khuẩn phân lập được

1. Khả năng sử dụng dầu tổng số của các chủng vi khuẩn

Cả 8 chủng đã phân lập và chọn lựa đều có khả năng sử dụng dầu thô với mức độ khác nhau (bảng 1).

Bảng 1. Khả năng sử dụng hàm lượng dầu tổng số của các chủng vi khuẩn

Số TT	Kí hiệu chủng	Lượng dầu thu hồi (mg dầu/l hỗn hợp)	Lượng dầu sử dụng (%)
1	Đối chứng	59657	0.00
2	CBT 1	34723	41.80
3	CBT 2	30344	49.14
4	CBT 2N	32849	44.94
5	CBT 5	23576	60.48
6	CBS-T°	41572	30.32
7	Đ107-T°	47111	21.03
8	BE 3. T°	51618	13.48
9	NB BT1-T°	50321	15.65

Qua bảng nhận thấy, chủng CBT 5 phân huỷ mạnh nhất, đạt hơn 60% dầu tổng số, chủng BE 3-T° sử dụng thấp nhất, đạt 13% dầu tổng số. Sau 7 ngày nuôi cấy, dầu thô từ chỗ vón cục, đông bánh dần dần loãng ra lan trên bề mặt hoặc tạo thành những hạt nhỏ li ti.

Một số chủng còn có khả năng sử dụng dầu thô ở nhiệt độ cao như Đ107-T°, BE 3-T° và NB.BT1-T° nhưng tốc độ phân huỷ chậm hơn.

2. Khả năng sử dụng các thành phần trong dầu thô của các chủng vi khuẩn

Khả năng sử dụng các thành phần trong dầu thô của các chủng vi khuẩn được trình bày ở bảng 2. Các chủng CBT 2, CBT2N và CBT 5 sử dụng khá mạnh các thành phần hydrocarbon no, thơm và nhựa, các đặc điểm này rất phù hợp với mục đích chống ô nhiễm môi trường do dầu mỏ gây ra. Các chủng CBS-T°, Đ107-T°, BE 3-T° và NB.BT1-T° sử dụng các thành phần hydrocarbon no, hydrocarbon thơm, các hợp chất phân cực với tỷ lệ không cao và có ưu điểm chịu được nhiệt độ cao. Điều đặc biệt là các chủng nuôi cấy đều sử dụng được hydrocarbon mạch dài từ C23 đến C35 với các mức độ khác nhau

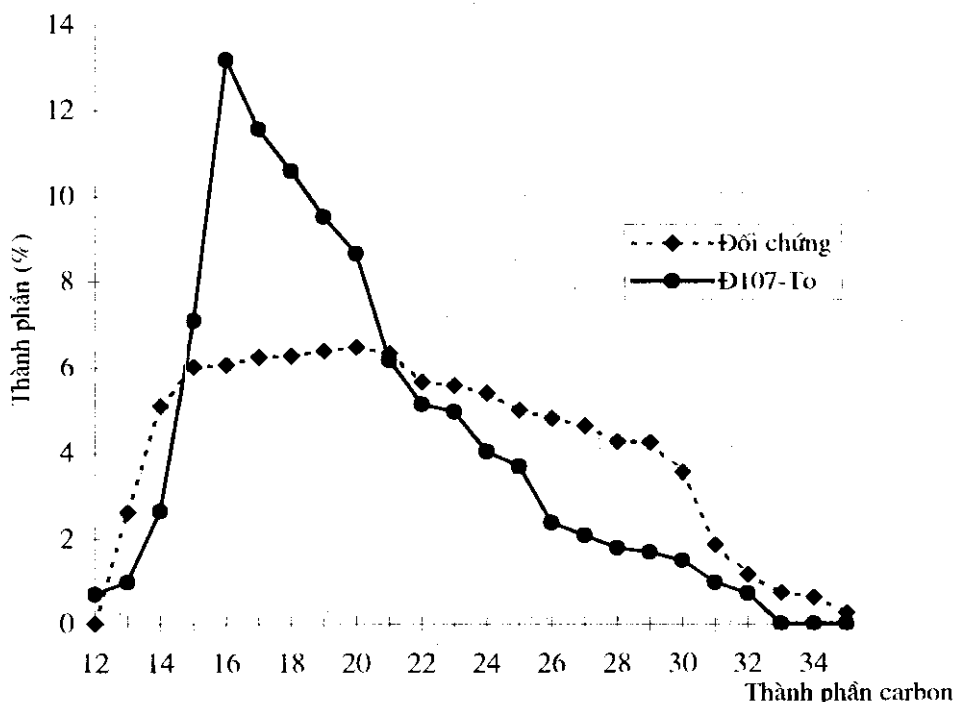
Bảng 2. Khả năng sử dụng các thành phần trong dầu thô của một số chủng vi khuẩn

Số TT	Ký hiệu chủng	Hydrocarbon (%)		Các hợp chất phân cực (%)	
		No	Thơm	Nhựa	Asphalten
1	CBT1	52.49	52.16	-	-
2	CBT2	55.58	60.05	13.74	-
3	CBT2N	55.62	66.23	-	-
4	CBT5	62.11	67.05	51.57	-
5	CBS-T°	44.32	42.21	-	7.1
6	Đ107-T°	22.21	40.54	11.42	1.36
7	BE 3-T°	11.73	8.13	32.07	-
8	NB.BT1-T°	18.32	26.79	-	8.95

2. Lựa chọn chủng có khả năng sử dụng hydrocarbon mạch dài ứng dụng trong khai thác dầu

Yêu cầu chọn chủng có thể ứng dụng trong khai thác dầu khá khắt khe: trước hết phải có khả năng sử dụng mạnh hydrocarbon mạch dài, cắt hydrocarbon mạch dài thành những phân đoạn nhỏ, nhẹ hơn; phải chịu được điều kiện vỉa với nhiệt độ, áp suất cao; không được sử dụng quá nhiều dầu; không được làm tăng thành phần các hợp

chất phân cực. Do đó, chủng Đ107-T^o và BE 3-T^o phân lập ngay tại mỏ dầu có đầy đủ các yêu cầu nêu trên (hình 1).



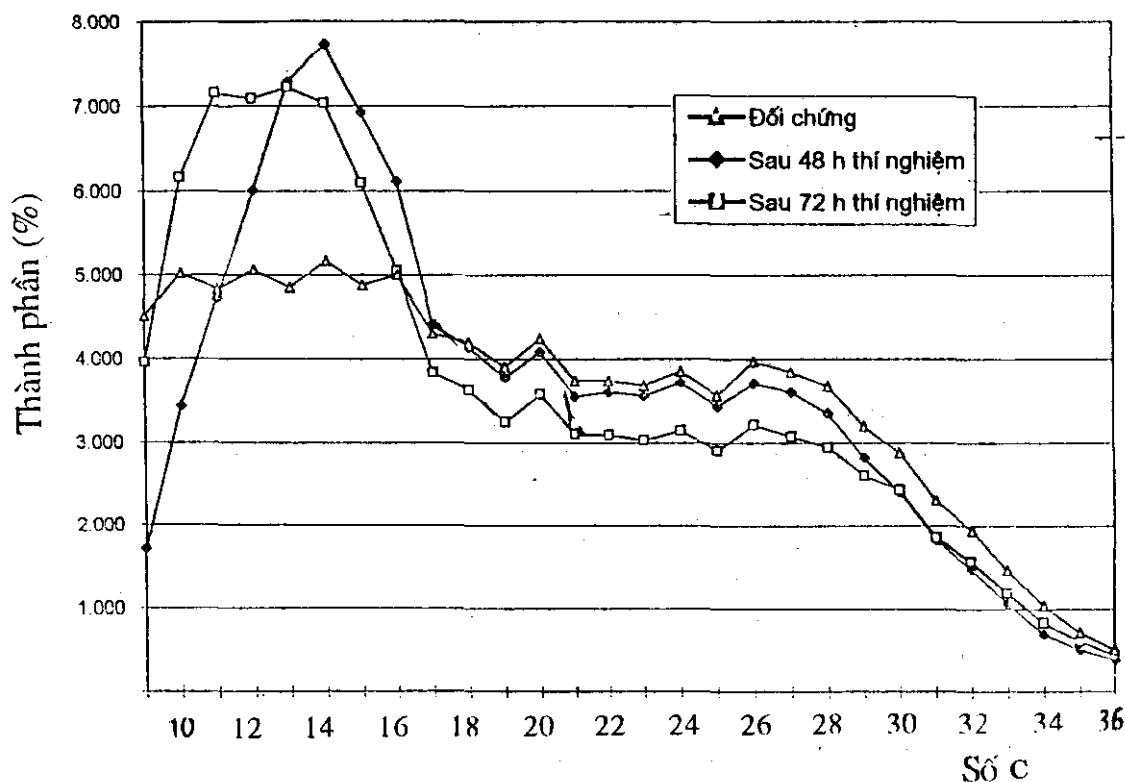
Hình 1. Khả năng phân hủy hydrocarbon của chủng Đ107-T^o

Qua đồ thị cho thấy, chủng Đ107-T^o sử dụng hydrocarbon mạch dài từ C21-C35, làm tăng thành phần hydrocarbon từ C15-C20. Kết quả là dầu thô giảm đáng kể các thành phần hydrocarbon nặng, trở nên nhẹ hơn và dễ chảy hơn.

3. Khả năng sử dụng hydrocarbon mạch dài của vi khuẩn lựa chọn trong điều kiện mô hình vỉa

Dưới sự tác động của chủng Đ107-T^o và BE 3-T^o, dầu thô sau khi thử nghiệm ở điều kiện mô hình vỉa (260 atm, 110°C) đã có sự thay đổi: các phân đoạn hydrocarbon mạch dài giảm đi rõ rệt, tỉ lệ hydrocarbon mạch ngắn tăng lên (hình 2).

Khả năng sử dụng hydrocarbon mạch dài còn được đánh giá qua kết quả phân tích một số tính chất lý, hoá của dầu trước và sau khi thử nghiệm trong mô hình vỉa sau 72 giờ (bảng 3). Độ nhớt của dầu thô giảm đi 7% so với đối chứng (không cấy vi khuẩn). Mật khác, nhiệt độ đông đặc và tỷ trọng của dầu cũng giảm. Các đặc tính thương mại của dầu thô chuyển biến theo chiều hướng tốt hơn: dầu loãng ra, linh động hơn, dễ chảy hơn. Như vậy, hoàn toàn có thể sử dụng các chủng này trong khai thác dầu thứ cấp.



Hình 2. Ảnh hưởng của vi khuẩn lên thành phần hydrocarbon trong điều kiện mô hình vỉa

Bảng 3. Một số tính chất của dầu thô trước và sau thử nghiệm mô hình vỉa

Dầu thô Bạch Hổ	Độ nhớt (Cp)		Nhiệt độ đông đặc (°C)	Tỷ trọng
	Nhiệt độ thường	Điều kiện vỉa (110°C, 260atm)		
Trước thử nghiệm	2.79	3.70	27	0.86
Sau thử nghiệm 72 giờ	2.64	3.45	25	0.85

IV. KẾT LUẬN

Tất cả các chủng phân lập được đều có khả năng sử dụng dầu thô Bạch Hổ, đạt từ 13-60% hàm lượng dầu tổng số.

Chủng D107-T^o và BE 3-T^o có khả năng sử dụng hydrocarbon mạch dài trong điều kiện mô hình vỉa (nhiệt độ cao, áp suất cao) làm cho dầu trở nên dễ chảy và linh động hơn.

Có thể lựa chọn chủng D107-T^o và BE 3-T^o ứng dụng trong nâng cao hiệu suất khai thác dầu thứ cấp ở điều kiện Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Belyaev S. S., Ivanov M. V. et al, 1993.*
J. petroleum economy (Russia). p. 15-17.
2. *Bryant R. S. et al., 1990.*
Microbial enhanced water flooding: a pilot study. Elsevier Science Publisher. B.V, Amsterdam.
3. *Dietrich F.L., Brown F. G, Zhou Z. H., 1996.*
Society of petroleum engineers. SPE 35746, p. 1-17.
4. *Hitzman D. O., 1983*
Petroleum microbiology and the history of its role in enhanced oil recovery. p. 162-218.
5. *Ivanov M. V., Belyaev S. S., 1990.*
Biotechnology of enhancement of oil recovery based on the geochemical activity of microorganisms. Microbial enhancement of oil recovery-Recent advance: 421-432.
6. *Jack T. R., 1990.*
Microbial selective plugging to control water channeling. Microbial enhancement of oil recovery-Recent advance: 433-440.
7. *Jack T. R., 1991.*
Current opinion in biotechnology. Vol. 2, N. 1, p. 444-449.
8. *Lappin Scott H. M., Cusack F., Costerton J. W., 1998.*
Appl. and Environ. Microbiology. 54: 1373-1382.
9. *Lazar et al., 1990.*
Preliminary results of some recent MEOR field trials in Romania. p. 365-385.
10. *McInerney M. J., Donal W. S.*
Westlake. Microbially enhanced oil recovery. Petroleum microbiology: 409-445.
11. *Moses V., 1990.*
Downhole microbially enhanced oil recovery system. Developments in industrial microbiology. 31: 143-148.
12. *Nazina T. N. et al., 1996.*
Microbiologia (Russia). Vol. 65, N. 3, p. 403-408.
13. *Rozanova E. P. et al., 1995.*
Microbial process in the oil field Savuiskoe in the Ob region. Microbiology (Russia). 64 (1): 104-111.
14. *Sheehy A. J., 1990.*
Microbial physiology and enhanced oil recovery. Microbial enhancement of oil recovery - recent advances. p. 37-44.

15. *Shennan J. L., 1984.*

Hydrocarbons as substrates in industrial fermentation. Petroleum microbiology. 643-683.

16. *Wagner M., 1990.*

Microbial enhancement of oil recovery from carbonate reservoirs with complex formation characteristics. Microbial enhancement of oil recovery-Recent advance. 387-398.

17. *Westlake D. W. S., 1984.*

Heavy crude oil and oil shales: tertiary recovery of petroleum from oil-bearing formations. Petroleum microbiology: 537-552.

18. *Zajic J. E., Mahomedy A. I., 1984.*

Biosurfactants: intermediates in the biosynthesis of amphipathic molecules in microbes. Petroleum microbiology: 221-297.

SELECTION OF LONG CHAIN HYDROCARBON-UTILIZING BACTERIA FOR ENHANCEMENT OF OIL RECOVERY

*Lai Thuy Hien, Pham Thu Thuy, Dang Phuong Nga,
Do Thu Phuong, Hoang Hai, Pham Thi Hang*

SUMMARY

Application of microorganisms in enhancement of oil recovery (MEOR) was first carried out by Zobell in 1946. The basic of this method is injection periodically of microorganisms, microbial products such as: biopolymer, biosurfactant..., nutrient and mineral salts in order to activate native microorganisms. Among them long chain hydrocarbon-utilizing bacteria play an important role, making crude oil lighter, fluidier, so easily flow out.

We selected eight hydrocarbon utilizing-bacterial strains from Vungtau oil fields. Two of them were capable of long chain-hydrocarbon utilizing making oil viscosity reduce 7% and hydrocarbon from C21-C35 significantly decrease in stratal modeling condition (260 atm, 110°C). Therefore, they can be used for MEOR in Vietnamese oil fields.

1.0.14

**MỘT VÀI ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ KHẢ NĂNG PHÂN HUỖ
HYDROCARBON CỦA HAI CHỦNG NẤM MEN
Candida tropicalis HS-10 VÀ HS-35**

Phạm Hương Sơn⁽¹⁾, Đặng Xuyên Như⁽¹⁾, Phạm Văn Ty⁽²⁾

(1): TRUNG TÂM SINH HỌC THỰC NGHIỆM,
VIỆN NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ

(2) : TRUNG TÂM VI SINH VẬT ỨNG DỤNG,
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN, HÀ NỘI

Dầu mỏ và các sản phẩm của nó được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp, giao thông vận tải, đời sống... Các hợp chất này được thải vào môi trường và có thể trực tiếp hoặc gián tiếp gây ô nhiễm môi trường sinh thái. Những vi sinh vật có khả năng phân huỷ hydrocarbon được phân bố khá rộng rãi trong tự nhiên. Người ta ước tính có khoảng 30 chi vi sinh vật sống trong tự nhiên có khả năng phân huỷ hydrocarbon trong dầu mỏ bao gồm: nấm men, nấm mốc, vi khuẩn, xạ khuẩn, trong đó nấm men có khả năng sử dụng nhiều loại hydrocarbon làm nguồn cơ chất cho quá trình sinh trưởng và phát triển. Nấm men phân huỷ hydrocarbon gồm các chi: *Candida*, *Lipomyces*(7), *Rhodotorula*(6)... trong đó chủ yếu thuộc chi *Candida*. Năm 1967, Klug và Markovetz đã kiểm tra được 55 chủng thuộc chi *Candida* có khả năng phân huỷ hydrocarbon (4). Khả năng phân huỷ các hợp chất phenol của chủng nấm men *Candida maltosa* 10-4(9) và trinitrotoluen (NTT) của chủng nấm men *Candida krusei*, *C. quercitrusa*, *C. famata* (5) đã được thông báo. Từ thực tế đó, chúng tôi tiến hành phân lập và nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và khả năng phân huỷ hydrocarbon của hai chủng nấm men *Candida tropicalis* HS-10 và HS-35.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

- Mẫu dầu thô lấy từ mỏ Bạch Hổ, Vũng Tàu
- Môi trường khoáng dùng để nuôi cấy HS-10 và HS-35 có thành phần (g/l):
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.7, KH_2PO_4 - 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3.5, NaCl - 1.5, pH 7 và dầu thô 5%.
- Nấm men được phân loại theo khoá phân loại của Barnett và cộng sự năm 1985 (2).
- Đánh giá khả năng sử dụng dầu thô bằng máy sắc ký khí Shimadzu (Nhật).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đặc điểm hình thái và nuôi cấy

Hai chủng nấm men được phân lập từ trạm xăng dầu và nước thải nhà máy sữa chữa ô tô ở Hà Nội, các đặc điểm hình thái và nuôi cấy của hai chủng HS-10 và HS-35 được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Các đặc điểm đặc trưng của hai chủng nấm men.

Đặc điểm	HS-10	HS-35
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng	Kem
Hình thái tế bào	Elip	Tròn và elip
	Khuẩn ty giả	Tế bào riêng rẽ
Nảy chồi	Đa cực	Đa cực
Sinh sản	Vô tính	Vô tính
Khả năng lên men:		
Glucose	+	+
D-Galactose	+	±
Maltose	+	+
Me α -D Glucoside	-	-
Sucrose	+	+
α, α -Trehalose	+(D)3'	+(D)5
Melibiose	-	-
Lactose	-	-
Cellulose	-	-
Melezitose	-	-
Raffinose	-	-
Inulin	-	-
Tinh bột	+	-
Khả năng đồng hoá đường:		
D- Glucose	+	+
D-Galactose	+	+
D- Glucozamin	+	+
Sorbose	-	-
D-Ribose	-	-
D-Xylose	±	±
L-Arabinose	-	-
D-Arabinose	-	-

L-Rhamnose	-	-
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
α, α -Trehalose	+	+
Cellobiose	$\pm$	$\pm$
Salicin	+	$\pm$
Arbutin	+	$\pm$
Lactose	-	-
Raffinose	-	-
Melezitose	+	+
Melibiose	-	-
Inulin	-	-
Tinh bột	$\pm$	$\pm$
Glycerol	+	-
D-Mannitol	+	$\pm$
m- Erythritol	-	-
Xybitol	-	-
L- Arabinitol	-	-
Galactitol	-	-
Myo-Inozitol	-	-
D-Gluco 1,5-Lacton	$\pm$	$\pm$
2 Keto-D-Gluconate	+	+
D-Gluconate	+	+
Succinate	+	+
Citrate	+	+
Methano	-	-
Ethanol	+	+
Khả năng sử dụng nguồn nitơ:		
Nitrate	-	-
Nitrite	-	-
Urea hydrolysis	-	-
Sinh trưởng ở 25°C	+	+
ở 42°C	+	+

*(D)3 – Mọc chậm sau 3 ngày

Dựa theo các đặc điểm hình thái và sinh lý, cả hai chủng được xác định là giống với *Candida tropicalis* Berkhout

2. Khả năng phân huỷ hydrocarbon của hai chủng HS-10 và HS-35

Sau 10 ngày nuôi cấy, số lượng các tế bào nấm men tăng từ 10^1 tới 10^{10} TB/ml. Trong khi đó số lượng tế bào nấm men ở lô đối chứng giảm từ 10^4 xuống 10^2 TB/ml. Điều này chứng tỏ nấm men đã sử dụng hydrocarbon trong dầu mỏ làm cơ chất cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng.

Dầu thô các chứa các dạng hợp chất khác nhau và được chia làm bốn nhóm: hydrocarbon no, hydrocarbon thơm, nhựa và asphaltenes trong đó hydrocarbon no là dễ được sử dụng nhất (8). Kết quả ở bảng 2 và 3 cho thấy hai chủng HS-10 và HS-35 có khả năng sử dụng các loại hydrocarbon trong dầu thô cho sự sinh trưởng và phát triển, nhưng tốc độ sử dụng hydrocarbon của chủng HS-10 cao hơn. Hàm lượng hydrocarbon tổng số do chủng HS-10 sử dụng là 60% trong khi đó chủng HS-35 chỉ sử dụng 30% và thành phần hydrocarbon no do chủng HS-10 và HS-35 sử dụng lần lượt là 65%, 36%. Điều này có nghĩa là hàm lượng dầu thô đã được giảm đáng kể. Trong thí nghiệm của chúng tôi hàm lượng hydrocarbon giảm chủ yếu trong 7 ngày đầu của thí nghiệm.

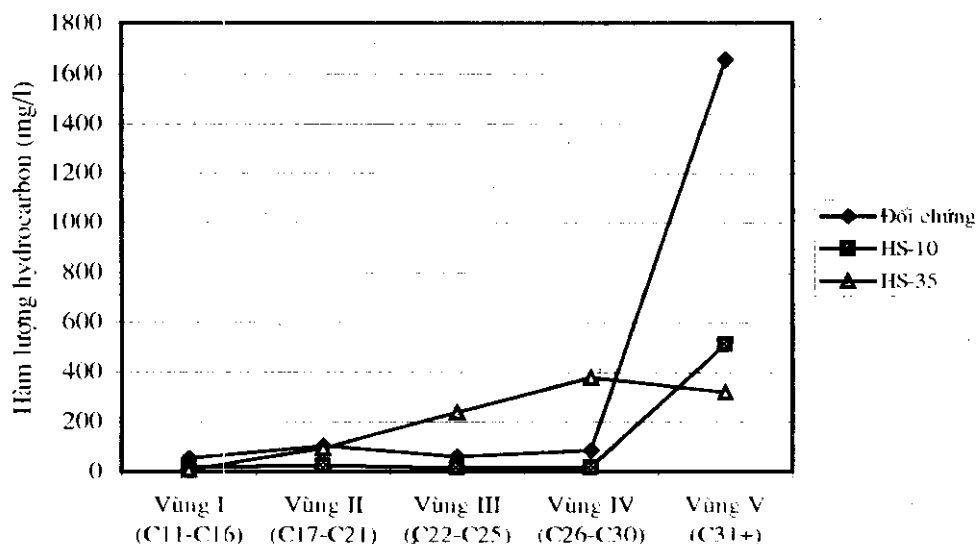
Bảng 2. Số lượng tế bào và hàm lượng dầu thô trong các mẫu sau 10 ngày thí nghiệm

Mẫu thí nghiệm	Số lượng tế bào (TB/ml)		Hàm lượng dầu thô ban đầu (mg/l)	Hàm lượng dầu thô còn lại (mg/l)	Hàm lượng dầu thô đã bị loại bỏ (mg/l)	Tỉ lệ loại bỏ (%)
	Ban đầu	Sau 10 ngày				
HS-10	10^4	2.10^{10}	21292	8519	12773	60
HS-35	10^4	11.10^9	21292	15016	6276	30
Đối chứng	10^4	10^2	21292	-	0	0

Bảng 3. Những thay đổi về hàm lượng của các nhóm dầu thu hồi sau 10 ngày thí nghiệm

Mẫu thí nghiệm	Hydrocarbon (mg/l)					Các hợp chất phân cực (mg/l)		
	H-C no		H-C thơm		Tổng H-C	Nhựa	Asphaltene	Tổng
	mg/l	% giảm	mg/l	% giảm				
HS-10	6055	65	587	70	6642	1741	135	1876
HS-35	10944	36	1039	47	11983	2773	259	3032
Đối chứng	17053	-	1959	-	19012	2016	264	2280

Như chúng ta biết, hydrocarbon thơm là thành phần rất độc, có thể gây đột biến, ung thư, lại khó bị phân huỷ trong tự nhiên. Trong những thí nghiệm của chúng tôi hàm lượng hydrocarbon thơm đã giảm 70% (từ 1959mg/l xuống 587mg/l) sau 10 ngày nuôi cấy với chủng HS-10. Vùng hydrocarbon thơm có mạch cacbon lớn hơn C₂₆ được nấm men sử dụng nhiều nhất: 78% từ C₂₆-C₃₀ và 69% từ C₃₀ trở đi đối với chủng HS-10.



Hình 1. Phân bố hydrocarbon thơm của dầu thô trong mẫu thí nghiệm (mg/l)

Chủng HS-10 có khả năng phân huỷ các alkan có trọng lượng phân tử trung bình cho đến cao (n - C11 đến n - C31) trong dầu thô. Đây là một đặc điểm rất quan trọng để sử dụng HS-10 cho việc xử lý ô nhiễm dầu bởi vì hầu hết các vị trí có nhiễm dầu chỉ chứa các hydrocarbon có trọng lượng phân tử cao còn các hydrocarbon nhẹ dễ bị bay hơi.

Trong thực tế, các vi sinh vật có khả năng phân huỷ hydrocarbon thường phân huỷ pristane và phytane ở mức thấp hơn n-alkanes, nên người ta đã cho phép sử dụng pristane hoặc phytane như là tiêu chuẩn làm sạch môi trường ô nhiễm dầu và thu hồi dầu. Qua các phương pháp xác định người ta thấy rằng pristane và phytane thường còn lại không bị phân huỷ và vì vậy bằng cách xác định tỉ số các alkan mạch thẳng với các alkan mạch nhánh, nó có thể cho phép xác định vùng vi sinh vật phân huỷ hydrocarbon trong dầu thô (1) (3).

Bảng 5. Những thay đổi trong hệ số đặc trưng của dầu thô

Mẫu thí nghiệm	Pri/Phy	nC ₁₇ /Pri	nC ₁₈ /Phy	H-C no/ H-C thơm	H-C thơm/ Hợp chất thơm
HS-10	1,97	1,46	2,92	4,84	0,24
HS-35	1,92	1,86	3,48	10,53	0,26
Đối chứng	2,16	2,26	4,52	8,71	0,46

Kết quả ở bảng 5 cho thấy các chỉ số pristane và phytane ở mẫu có cấy HS-10 và HS-35 đã giảm đáng kể so với lô đối chứng. Như vậy dưới tác động của các chủng HS-10 và HS-35 tính chất vật lý và hoá học của dầu thô đã bị thay đổi và nó rất có ý nghĩa trong việc làm giảm mức độ gây ô nhiễm.

Khả năng sử dụng một dải rộng hydrocarbon bởi chủng HS-10, cho phép chúng ta có thể sử dụng HS-10 để áp dụng xử lý cho những vị trí ô nhiễm dầu.

III. KẾT LUẬN

- Đã phân lập được hai chủng nấm men có khả năng phân huỷ hydrocarbon với tên loài là *Candida tropicalis* HS-10 và *Candida tropicalis* HS-35 thuộc chi *Candida*.

Sau 10 ngày thí nghiệm:

- + Chủng HS-10 có khả năng phân huỷ được 60% hydrocarbon tổng số: 65% hydrocarbon no, 70% hydrocarbon thơm và 49% asphalten.
- + Chủng HS-35 có khả năng phân huỷ được 30% hydrocarbon tổng số: 36% hydrocarbon no, 47% hydrocarbon thơm.
- Có thể sử dụng HS-10 để xử lý những vị trí ô nhiễm dầu nhờ khả năng sử dụng một dải rộng hydrocarbon của chủng này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Atlas, R.M., 1995.

Bioremediation of petroleum pollutants. International Biodeterioration and Biodegradation. 317-327.

2. Barnett, J.A., R.W.Payne & D. Yarrow, 1985.

Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge university press.

3. Jobson, A., F.D. Cook, and D.W.S.Westlake, 1972.

Microbial utilization of crude oil. Appl. Microbiol. 23:1082 - 1089.

4. Klug, M.J., A.J. Markovetz, 1967.

Degradation of Hydrocarbons by members of the genus *Candida*. Vol 15. No 4. 690 - 693.

5. Peijin Zhou, Ping Yin, Feng-Yan Bai, 1998.

Biodegradation of Trinitrotoluene (TNT) by the Yeast and Yeast-like Fungi. Proceedings of international conference on Asian network on microbial Research: Held at Auditorium Graha Sabha Pramana Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. 23-25th February, 1998.

6. Shailubhai. K., N.N.Rao & V.V. Modi, 1984.

Treatment of petroleum industry oil sludge by *Rhodotorula* sp. Appl Microbiol Biotechnol. 19: 437-438.

7. Tống Kim Thuần, Nguyễn Thu Hà, Lê Thị Thu Hiền, 1995.

Phân loại chủng nấm men *Lipomyces* sp. NB1 có khả năng đồng hoá cacbuahydro dầu mỏ. Kỷ yếu Viện công nghệ Sinh học. 338-343.

8. Venkateswaran, K. and S. Harayama, 1995.

Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. Canadian Journal of Microbiology. 41:767-775.

9. Yang Huifang, Yang Yanxi, Yinping, Zhou Peijin, 1998.

Degradation of phenolic compounds by a high effective phenol degrading yeast *Candida maltosa* 10-4. Proceedings of international conference on Asian network on microbial Research: Held at Auditorium Graha Sabha Pramana Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. 23-25th February, 1998.

BIOLOGICAL PROPERTIES AND HYDROCARBONS DEGRADING ACTIVITY OF TWO STRAINS OF *Candida tropicalis* HS-10 AND HS-35

Pham Huong Son, Dang Xuyen Nhu, Pham Van Ty

SUMMARY

Two strains HS-10 and HS-35 were isolated from oil contaminated soil and water samples at Hanoi and were identified as *Candida tropicalis*. Both of them can degrade hydrocarbon in crude oil but the strain HS-10 degraded strongerly. After 10 day incubation with 5% crude oil, the removal of total hydrocarbon by strain HS-10 reached 60% and strain HS-35 is 30%, aromatic compounds is 70% for strain HS-10 and 47% for strain HS-35, the polar components become lower. They may be used for insitu bioremediation of aromatic hydrocarbon in oil- contaminated sites.

1.0.15

TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE TỪ MÙN RÁC

Phạm Thị Ngọc Lan⁽¹⁾, Phạm Thị Hòa⁽¹⁾, Lý Kim Bảng⁽²⁾

(1): TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC - ĐẠI HỌC HUẾ

(2): VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Cellulose một sản phẩm vô tận của cây xanh được tạo thành với một lượng khổng lồ nhưng chưa được sử dụng một cách có hiệu quả mà còn tồn tại nhiều trong các phế phẩm công nông nghiệp và đặc biệt là trong rác thải sinh hoạt. Tại Việt Nam, các phế liệu chứa cellulose như rơm rạ, vỏ lạc, lõi ngô, bã mía, mùn cưa... rất phong phú nhưng chỉ được sử dụng với mục đích đun nấu, một phần nhỏ được dùng làm thức ăn gia súc nhưng với hiệu quả rất thấp. Để đáp ứng nhu cầu về chất lượng thức ăn gia súc, phân bón vi sinh vật, đồng thời làm giảm đáng kể sự ô nhiễm môi trường do nguồn rác thải này gây ra, nguồn phế liệu này cần được xử lý bằng nhiều phương pháp nhưng đáng chú ý vẫn là phương pháp sinh học [2,3]. Trong số các nhóm vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose thì xạ khuẩn là một trong những nhóm được tập trung nghiên cứu, với hoạt tính enzyme cellulase khá cao và sinh trưởng phát triển dễ dàng trong điều kiện tự nhiên. Với vùng khí hậu nhiệt đới nóng ẩm của miền Trung, chúng tôi hi vọng phân lập và tuyển chọn được một số chủng xạ khuẩn ưa ấm có khả năng phân giải cellulose mạnh từ các mẫu mùn rác để có bộ sưu tập gen về nhóm xạ khuẩn phân giải cellulose sử dụng cho mục đích nghiên cứu và ứng dụng trong thực tiễn sản xuất.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là các chủng xạ khuẩn ưa ấm có khả năng phân giải cellulose được phân lập từ nhiều nguồn cơ chất như đất chân đồng rơm, gỗ mục, rác thải, bùn, phân ủ ... ở một số địa điểm thuộc tỉnh Thừa Thiên - Huế.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Phân lập xạ khuẩn ưa ấm theo phương pháp Koch.
- Sơ tuyển các chủng xạ khuẩn ưa ấm có khả năng phân giải cellulose, sử dụng môi trường Gauze I nhưng thay nguồn tinh bột bằng bột cellulose và CMC với nồng độ 5g/l.

- Xác định hoạt độ cellulase bằng cách đo đường kính vòng phân giải cơ chất theo phương pháp khuếch tán trên thạch [1].
- Đánh giá khả năng phân giải và chuyển hóa cellulose thành sinh khối của xạ khuẩn bằng cách xác định độ giảm trọng lượng và thể tích.
- Phân tích hàm lượng cellulose theo phương pháp của Keinenbeg Stouma [6].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn ưa ấm phân giải cellulose

Từ các mẫu mùn rác qua phân lập đã tách được 195 chủng xạ khuẩn ưa ấm, trên cơ sở đó tiến hành tuyển chọn các chủng có hoạt tính cellulase mạnh. Để sơ tuyển các chủng xạ khuẩn ưa ấm có khả năng phân giải cellulose, sử dụng môi trường Gauze I nhưng thay nguồn tinh bột bằng một trong hai nguồn cơ chất là bột cellulose và CMC (carboxyl methyl cellulose) với nồng độ 5g/l theo phương pháp cấy vạch trên thạch đĩa. Kết quả sơ tuyển được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Khả năng phân giải bột cellulose và CMC của các chủng xạ khuẩn ưa ấm

Cơ chất	Mức độ phân giải	Kích thước vòng phân giải (mm)	Số chủng xạ khuẩn	Tỷ lệ (%)
Bột cellulose	Không phân giải	0	3	1,5
	Yếu	1-8	8	4,1
	Trung bình	9-14	34	15,4
	Mạnh	15-20	68	34,9
	Rất mạnh	>20	82	42,1
CMC	Không phân giải	0	3	1,5
	Yếu	1-8	13	6,7
	Trung bình	9-14	49	25,1
	Mạnh	15-20	61	31,3
	Rất mạnh	>20	69	35,4

Căn cứ kết quả nghiên cứu ở bảng 1 cho thấy, đa số các chủng xạ khuẩn ưa ấm phân lập đều có khả năng phân giải bột cellulose và CMC, nhưng ở các mức độ khác nhau. Trong đó các mẫu rơm mục và đất chân đồng rơm thường có tỷ lệ xạ khuẩn ưa ấm phân giải bột cellulose và CMC mạnh hơn so với các mẫu khác.

Qua kết quả sơ tuyển từ 192 chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose cũng nhận thấy, hầu hết các chủng xạ khuẩn ưa ấm có khả năng phân giải cellulose cao thì

cũng phân giải CMC mạnh, trong đó chủng S_{59} có hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất với kích thước vòng phân giải 31mm và kích thước vòng phân giải CMC là 30mm. So sánh với kết quả nghiên cứu ở chủng xạ khuẩn ưa nhiệt A_7 có hoạt tính phân giải bột cellulose cao nhất là 32mm và CMC là 26mm thì khả năng phân giải bột cellulose và CMC của xạ khuẩn ưa ấm không kém gì xạ khuẩn ưa nhiệt. Thậm chí chủng xạ khuẩn ưa ấm S_{59} có hoạt tính CMC-ase còn cao hơn so với chủng xạ khuẩn ưa nhiệt A_7 [4].

2. Thăm dò thời gian thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp cellulase và CMC-ase của xạ khuẩn ưa ấm

Để thăm dò ảnh hưởng của thời gian đến khả năng sinh tổng hợp cellulase và CMC-ase, các chủng S_{59} và S_{116} được nuôi cấy trên môi trường cám gạo: vỏ lạc (1:1) có bổ sung thêm dung dịch khoáng (môi trường Gauze I). Sau thời gian từ 1 đến 7 ngày, thu dịch và xác định hoạt tính enzyme bằng cách đo đường kính vòng phân giải. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Qua kết quả ở bảng 2 cho thấy: ở ngày thứ nhất hoạt tính enzyme còn thấp. Nhưng sang ngày thứ hai hoạt tính enzyme tăng mạnh và đạt cực đại ở ngày nuôi cấy thứ tư ở cả 2 chủng xạ khuẩn (kích thước vòng phân giải bột cellulose là 31mm và 30,5mm; bột CMC: 30mm và 29mm). Như vậy, thời gian thích hợp cho sinh tổng hợp cellulase để có hoạt tính cao nhất là phụ thuộc vào từng chủng vi sinh vật và từng điều kiện nuôi cấy [3,4].

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính phân giải bột và CMC-ase của chủng S_{59} và S_{116} .

Chủng xạ khuẩn ưa ấm	Thời gian (ngày)	Kích thước vòng phân giải	
		Bột cellulose	CMC
S_{59}	1	20,0	18,0
	2	26,0	24,5
	3	29,0	28,5
	4	31,0	30,0
	5	28,5	28,0
	6	25,5	24,5
	7	20,5	19,0
S_{116}	1	19,0	16,0
	2	27,5	25,5
	3	29,0	27,5
	4	30,5	29,0
	5	27,0	26,0
	6	22,0	22,5
	7	14,5	20,5

3. Đánh giá khả năng phân giải cellulose của xạ khuẩn ưa ấm

1. Xác định độ giảm trọng lượng và thể tích cơ chất

Để đánh giá khả năng phân giải cellulose của chủng S_{59} và S_{116} , tiến hành nuôi cấy trên môi trường dịch thể bổ sung 5g rơm hoặc vỏ lạc đã xử lý kiềm làm nguồn carbon. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng phân giải cellulose của chủng S_{59} và S_{116}

Chủng xạ khuẩn	Nguyên liệu	Mẫu	Trọng lượng (g)	Thể tích cm^3	Độ giảm trọng lượng (%)	Độ giảm thể tích (%)
S_{59}	Rơm	ĐC	3,68	17	0,00	0,00
		TN	2,29	9	37,78	47,05
	Vỏ lạc	ĐC	4,07	20	0,00	0,00
		TN	3,05	14	25,15	32,60
S_{116}	Rơm	ĐC	3,68	17	0,00	0,00
		TN	2,43	10	33,97	38,23
	Vỏ lạc	ĐC	4,07	20	0,00	0,00
		TN	3,08	15	24,41	25,48

Qua kết quả ở bảng 3 nhận thấy rằng: trên nguồn rơm nuôi cấy chủng S_{59} sau 21 ngày làm giảm 37,78% trọng lượng và 47,05% thể tích cơ chất, chủng S_{116} làm giảm 33,97% trọng lượng và 38,23% thể tích cơ chất. Như vậy, trên môi trường rơm cả 2 chủng xạ khuẩn ưa ấm đều có khả năng làm giảm trọng lượng cơ chất mạnh hơn so với vỏ lạc. Theo nghiên cứu của Lê Thị Thục cho thấy, độ giảm trọng lượng cơ chất (rơm và vỏ lạc xử lý) là 35,5% và 22% ở chủng xạ khuẩn ưa nhiệt A_7 [4] thì khả năng làm giảm trọng lượng cơ chất của các chủng xạ khuẩn ưa ấm S_{59} và S_{116} là mạnh hơn.

2. Xác định mức độ tiêu thụ cellulose của xạ khuẩn ưa ấm

Để xác định mức độ tiêu thụ cellulose, nuôi cấy chủng S_{59} và S_{116} trên môi trường rơm và vỏ lạc ở pH=7, tỉ lệ nước:cơ chất là 8/10, nhiệt độ nuôi cấy 30°C. Sau 7 ngày phân tích hàm lượng cellulose theo phương pháp của Keinenberg Stouma [5], kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Khả năng tiêu thụ cellulose của chủng S_{59} và S_{116}

Chủng xạ khuẩn	Nguyên liệu	Mẫu	Cellulose (%)	Độ giảm cellulose (%)
S_{59}	Rơm	ĐC	19,75	0,00
		TN	11,25	43,03
	Vỏ lạc	ĐC	36,50	0,00
		TN	22,00	39,73
S_{116}	Rơm	ĐC	19,75	0,00
		TN	11,85	40,70
	Vỏ lạc	ĐC	36,50	0,00
		TN	22,65	37,34

Qua kết quả nghiên cứu thấy rằng: Trên hai nguồn cơ chất là rơm và vỏ lạc, khả năng phân giải cellulose của chủng S_{59} cao hơn so với chủng S_{116} . Theo kết quả nghiên cứu của Lê Thị Thục, chủng xạ khuẩn ưa nhiệt A_7 làm giảm 29,01% cellulose thì độ tiêu thụ cellulose của các chủng xạ khuẩn ưa ấm S_{59} và S_{116} mạnh hơn nhiều so với chủng xạ khuẩn ưa nhiệt A_7 . Đây là đặc điểm tốt để có thể ứng dụng vào quá trình phân hủy rác thải chứa cellulose rút ngắn bớt thời gian xử lý và giảm nhanh thể tích của khối rác.

4. Thử nghiệm sử dụng chế phẩm cellulase để xử lý nguyên liệu trước khi chưng cất tinh dầu

Các mẫu thí nghiệm (mỗi mẫu 75g lá chối) được xử lý bằng chế phẩm cellulase tách từ chủng xạ khuẩn A_{59} với thời gian, nhiệt độ và pH thích hợp, sau đó bổ sung thêm nước vào và tiến hành chưng cất lôi cuốn theo hơi nước để thu tinh dầu. Kết quả chưng cất tinh dầu được biểu thị ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả chưng cất tinh dầu lá chối

STT	Thể tích enzyme (ml)	Thể tích tinh dầu thu ở các thời điểm					Tổng thời gian	Tổng thể tích tinh dầu (ml)
		15 phút	30 phút	45 phút	60 phút	90 phút		
1	0	0,60	1,00	1,40	1,60	1,90	150	2,05
2	150	0,65	1,10	1,50	1,70	2,00	120	2,20
3	300	0,75	1,30	1,60	1,90	2,10	110	2,25

Qua kết quả cho thấy việc sử dụng chế phẩm cellulase để xử lý lá chối trước khi chưng cất sẽ làm tăng hiệu suất tách tinh dầu từ 7 -10% và rút ngắn thời gian chưng cất từ 20 -27%. Đây mới chỉ là những thử nghiệm ban đầu cần được nghiên cứu thêm để áp dụng một cách có hiệu quả vào thực tế sản xuất.

III. KẾT LUẬN

Từ những kết quả thực nghiệm, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Từ các mẫu đất, rác, rơm mục, gỗ mục phân lập và thuần khiết được 195 chủng xạ khuẩn ưa ấm trong đó có 192 chủng có khả năng phân giải bột cellulose và CMC. Số chủng phân giải bột cellulose và CMC rất mạnh chiếm 42,1% và 35,4%.
2. Trong điều kiện nuôi cấy tinh môi trường cám gạo:vỏ lạc (1:1) chủng S_{59} và S_{116} có hoạt tính cellulase và CMC-ase cao nhất và đạt cực đại ở ngày nuôi cấy thứ 4.
3. Chủng S_{59} khi nuôi cấy trên môi trường dịch thể bổ sung 5g rơm hoặc vỏ lạc đã xử lý kiềm có khả năng tiêu thụ cellulose mạnh nhất, làm giảm trọng lượng cơ chất rơm 37,78% và thể tích giảm 47,05%. Trọng lượng vỏ lạc giảm 25,15% và thể tích giảm 32,60% so với đối chứng.

4. Khi nuôi cấy chủng S_{59} và S_{116} trên môi trường rơm, vỏ lạc không xử lý, hàm lượng cellulose giảm 43,03% (rơm) và 39,73% (vỏ lạc) đối với chủng S_{59} còn chủng S_{116} tỷ lệ này là 40,7% và 37,34% so với đối chứng.
5. Sử dụng cellulase để xử lý lá chổi trước khi chưng cất sẽ làm tăng hiệu suất tách tinh dầu từ 7 -10% và rút ngắn thời gian chưng cất từ 20 -30%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng và các tác giả, 1978.
Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật, tập III, NXB KH&KH, Hà Nội.
2. Nguyễn Lâm Dũng, 1984.
Vi sinh vật đất và sự chuyển hóa các hợp chất cacbon, nitơ. NXB KH&KT, Hà Nội.
3. Nguyễn Đức Lượng, Nguyễn Phương Hải, 1994.
Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật sinh tổng hợp cellulase cao để xử lý chất thải hữu cơ chứa cellulose. Công trình nghiên cứu khoa học Trường Đại học Bách khoa thành phố Hồ Chí Minh.
4. Lê Thị Thục, 1996.
Nghiên cứu tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn ưa nhiệt phân giải cellulose và một số đặc điểm sinh học của chúng. Luận văn tốt nghiệp Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế.
5. Association official analytical chemists, 1985.
The methods of analysis, 12 edition, Washington.
6. A.A. El. Gindy, 1989.
Production of cellulase by *Micrococcum albomyces*. Folia Microbiol, 34, 7-10.

SELECTION SOME STRAINS OF CELLULOSE - DISSINGTEGRATING ACTYNO MYCESE CELLULOLYTIC DISSINTEGRATING FROM HUMUS - WASTE

Pham Thi Ngoc Lan, Pham Thi Hoa, Ly Kim Bang

SUMMARY

From 192 strains Actynomycese, selected two strains S_{59} and S_{116} have high cellulose decomposing activity. Their cellulase is maximum when they were cultured in rice bran - peanut shell medium after four days. Using cellulase of strain A_{59} in order to treat the leaves of *Baechea frutescens* L. before distillation had increased the content of essential oil 7-10% and decreased time of the distillation 20-30%.

1.0.16

THỬ NGHIỆM CÔNG NGHỆ PHÂN HUỖ SINH HỌC LÀM SẠCH NƯỚC THẢI NHIỄM DẦU TẠI KHO HÀ KHẨU

*Đặng Cẩm Hà, Nguyễn Bá Hữu,
Cù Việt Nga, Trần Như Hoa, Nguyễn Thị Đề*
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Tình hình ô nhiễm dầu trên thế giới nói chung và tại Việt Nam ngày càng gia tăng cùng với sự phát triển kinh tế xã hội. Trong quá trình tồn chứa và sử dụng các sản phẩm xăng, dầu Công ty xăng dầu B12 đã có hệ thống thu gom tại khu xử lý song hiệu quả của quá trình xử lý hoàn toàn phụ thuộc vào tự nhiên. Có nghĩa là nước thải chưa được tiến hành xử lý đã bị thải ra môi trường.

Trong vài năm gần đây chúng tôi đã nghiên cứu công nghệ phân huỷ sinh học để làm sạch dầu bị ô nhiễm. Các kết quả nghiên cứu trong phòng thí nghiệm đã được công bố ở các công trình trong nước và các hội nghị quốc tế [3, 4]. Để công nghệ được áp dụng làm sạch dầu ô nhiễm trong nước thải, trong cặn đáy của các bồn bể chứa xăng dầu, trong đất, ven biển .v.v. chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm công nghệ phân huỷ sinh học tại kho K 130 (Hà Khẩu), Quảng Ninh. Trong báo cáo này chúng tôi sẽ trình bày các kết quả thử nghiệm công nghệ tại hiện trường trong hệ thống xử lý nước thải nhiễm dầu của kho xăng dầu thuộc Công ty B12, xí nghiệp xăng dầu Quảng Ninh.

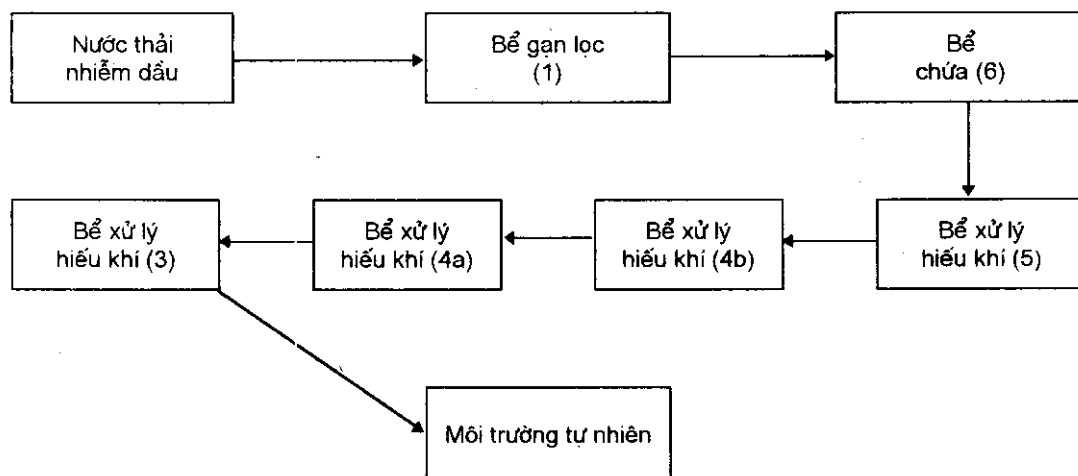
Giai đoạn đầu của quá trình thử nghiệm trong điều kiện hệ thống thu gom nước thải giữ nguyên hiện trạng (không có sự thay đổi về kiến trúc và xây dựng cải tạo lại) chúng tôi đặt ra các mục tiêu cụ thể trong nghiên cứu công nghệ để tìm hiểu: Vai trò của oxy trong quá trình xử lý; vai trò của chế phẩm trong sự có mặt của oxy thông qua sự thay đổi của tập đoàn vi sinh vật trong quá trình xử lý, một số chỉ tiêu môi trường, thành phần hoá học của dầu cũng như sự thay đổi của hàm lượng dầu tổng số. Các kết quả sẽ là nền tảng để chúng tôi giải quyết các bước tiếp theo để có công nghệ hoàn chỉnh nhằm tạo ra môi trường thuận lợi để vi sinh vật phân huỷ dầu trong thời gian ngắn nhất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Mô hình xử lý tại kho Hà Khẩu (hình 1)

- Địa điểm: Xử lý được tiến hành ở các bể số 3, 4a, 4b và số 5, 6. Bể 6 chứa nước thải sau khi đã lọc cơ học. Bể 5 sục khí toàn bộ, bể 4a và 4b một phần được sục khí. Bể 3 có sự trao đổi oxy từ 6 đến 8 giờ thông qua hệ thống bơm và sục khí.

- Các thông số kỹ thuật :
 - + Chế độ sục khí: 8 giờ/ngày, tốc độ sục khí $>30\text{m}^3/\text{giờ}$.
 - + Vẫn có một phần nước lẫn dầu từ bể 6 chảy sang bể 5 trong quá trình xử lý.
 - + Khi nước được bơm từ bể 3 trong khoảng 6-8 giờ sang bể 5 thì toàn bộ hệ thống các bể 3, 4a, 4b 5 mới được sục oxy với mức độ khác nhau. Những thời gian còn lại nước chỉ được sục một phần tại các bể 4a, 4b; bể 3 không hề được sục khí và bể 5 được sục khí nhưng luôn luôn thông với bể 6. Khối lượng nước thải nhiễm dầu sử dụng trong thử nghiệm là 65 m^3 .
 - + Thời gian bổ sung chế phẩm và sục khí là 5 ngày.
 - + Chế phẩm được bổ sung vào các bể 3 lần trong 5 ngày, chế phẩm được gọi tắt là Oilcleanser và được sản xuất tại TTKHTN&CNQG nhằm cung cấp dinh dưỡng như nitơ, photpho và các chất vi lượng khác cho vi sinh vật hiếu khí phân huỷ dầu.



Hình 1. Sơ đồ khu xử lý nước thải nhiễm dầu kho Hà Khẩu, Quảng Ninh

- Theo dõi, lấy mẫu phân tích hóa học nước thải nhiễm dầu trước, trong và sau khi xử lý.
- Hàng ngày phân tích vi sinh vật trong nước thải tại các bể nghiên cứu trước, trong và sau khi xử lý theo các phương pháp đã công bố trước đây [3, 4].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu ở phòng thí nghiệm

Các thử nghiệm xử lý ô nhiễm dầu trong nước thải của các kho thuộc Công ty B12 trong điều kiện phòng thí nghiệm đã được tiến hành nhiều đợt để khi áp dụng tại hiện trường công nghệ bảo đảm thành công ở đa số các loại hình nước thải nhiễm dầu.

Các kết quả được trình bày vắn tắt như sau: tổng số dầu đã giảm từ 80- 93% trong các đợt thí nghiệm nhằm chọn tỷ lệ chất dinh dưỡng, vật liệu cố định, chế độ sục khí.v.v. Do nguyên tắc của công nghệ là: thúc đẩy quá trình phân huỷ có sẵn trong hệ thống xử lý của các kho bằng cách thay đổi các điều kiện môi trường ảnh hưởng lên sự phát triển của tập đoàn vi sinh vật có khả năng phân huỷ các thành phần khác nhau của dầu nên chỉ số vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong việc đánh giá mức độ thành công. Số lượng vi sinh vật có khả năng phân huỷ dầu đã đạt 10^9 - 10^{10} tế bào/ml. Chỉ tiêu khác như COD đã giảm đến mức đáng kể.

Trong quá trình thử nghiệm công nghệ tại kho Hà Khẩu trên cơ sở hệ thống xử lý chưa được cải tạo chúng tôi đã thu được các kết quả dưới đây:

1. Sự thay đổi một số chỉ tiêu môi trường

Kết quả phân tích một số các chỉ số môi trường được trình bày ở bảng 1. Lượng nitơ và phot pho trong các mẫu phân tích rất thấp. Lượng SO_4 phân tích <0.01 mg/L; hàm lượng BOD rất thấp và dao động trong khoảng từ 6,3-38,7mg/L trước và sau khi xử lý. Hàm lượng COD cao, dao động trong khoảng 600- 800 mg/L. Kết quả sau khi xử lý cho thấy hàm lượng COD giảm xuống đáng kể, dao động trong các bể từ 72,6 đến 84,0 mg/L.

Bảng 1. Thành phần hóa học nước thải nhiễm dầu kho Hà Khẩu

Mẫu	N (mg/L)		P (mg/L)		SO_4 (mg/L)		COD (mg/L)		BOD (mg/L)	
	TXL	SXL	TXL	SXL	TXL	SXL	TXL	SXL	TXL	SXL
Bể 3	24.85	-	0.27	-	<0.01	-	600	84	6.3	18.4
Bể 4a	31.58	-	0.31	-	-	-	610	72.6	38.37	10.0
Bể 6	25.45	-	0.27	-	-	-	800	76.4	38.3	22.2

Ghi chú: TXL - trước xử lý; SXL - sau xử lý; - không phân tích

2. Sự thay đổi số lượng vi sinh vật

Số lượng vi sinh vật được lấy mẫu hàng ngày để đánh giá các nhóm vi sinh vật trực tiếp hay gián tiếp tham gia vào quá trình khoáng hoá dầu. Kết quả được trình bày ở các bảng 2a, 2b và 2c.

Bảng 2a. Số lượng vi sinh vật sử dụng dầu diesel (tb/ ml) trong các bể thử nghiệm xử lý nước thải nhiễm dầu tại kho Hà Khẩu

Mẫu	Thời gian xử lý (ngày)					
	0	1	2	3	4	5
Bể 3	10^2	10^4	10^5	10^5	10^6	10^8
Bể 4a	10^2	10^4	10^5	10^5	10^7	10^9
Bể 6	10^3	10^4	10^4	10^8	10^7	10^8

Số lượng vi sinh vật tăng dần theo thời gian xử lý. Thời điểm trước khi xử lý chỉ có 10^7 tế bào vi sinh vật (tb- tế bào) có khả năng sử dụng dầu trong 1 ml nước thải và tăng lên cho đến 10^6 - 10^7 tb/ml sau ngày thứ 4 và 10^6 - 10^9 tb/ ml ở ngày thứ 5 (bảng 2a). Thành phần loài vi sinh vật không đa dạng (hình 2), không phân lập được nấm men, xạ khuẩn trong các bể xử lý. Trước khi xử lý chỉ có một vài tế bào nấm mốc trong 1ml nước thải, sau 5 ngày số lượng tăng lên 10^4 tế bào/ml, có khoảng 3 loài nấm mốc. Vi khuẩn có khoảng 4-5 loài. Trong đó có chủng tạo chất hoạt động bề mặt sinh học. Các chủng vi khuẩn phân lập được tại Hà Khẩu có khả năng sử dụng dầu tương đối tốt. Số lượng vi sinh vật dị dưỡng có tăng lên theo thời gian xử lý (bảng 2b), trong các bể xử lý phân lập được các vi sinh vật tạo polysacarid. Vi khuẩn khử sulphat trong hệ thống sục khí thay đổi không nhiều và số lượng nằm trong khoảng 10^6 - 10^7 tế bào/ ml chứng tỏ vai trò của oxy chưa đủ để làm thay đổi số lượng tập đoàn vi sinh vật này (bảng 2c).



Hình 2. Khuẩn lạc vi khuẩn sử dụng cacbuahydro phân lập từ mẫu nước thải nhiễm dầu Hà Khẩu, Quảng Ninh

Bảng 2b. Số lượng vi sinh vật dị dưỡng (cfu/ ml) trong các bể thử nghiệm xử lý nước thải nhiễm dầu tại kho Hà Khẩu

Mẫu	Thời gian xử lý (ngày)					
	0	1	2	3	4	5
Bể 3	10^6	10^7	10^7	10^8	10^8	10^9
Bể 4a	10^6	10^7	10^7	10^7	10^8	10^9
Bể 6	10^5	10^6	10^6	10^7	10^7	10^8

Bảng 2c. Số lượng vi khuẩn khử sulphat (tế bào / ml) trong các bể thử nghiệm xử lý nước thải nhiễm dầu tại kho Hà Khẩu

Mẫu	Thời gian xử lý (ngày)					
	0	1	2	3	4	5
Bể 3	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6
Bể 4a	10^7	10^7	10^6	10^6	10^6	10^7
Bể 6	10^7	10^6	10^7	10^7	10^7	10^6

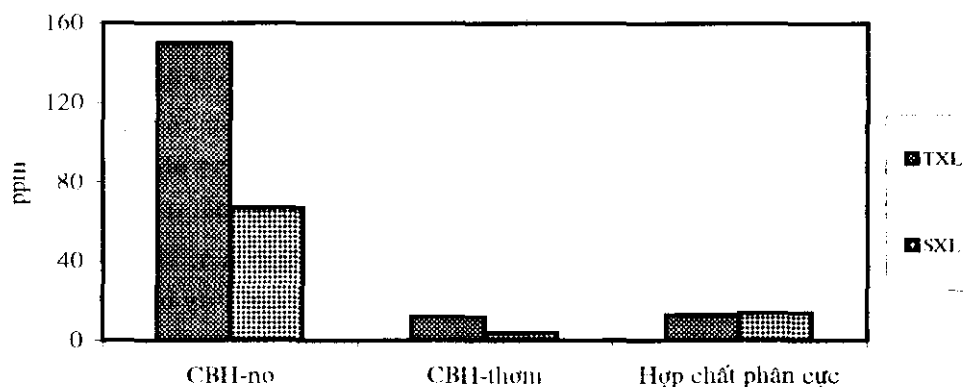
3. Sự thay đổi hàm lượng và thành phần dầu trong nước thải

Bảng 3a. Hàm lượng dầu tổng số trong nước thải nhiễm dầu kho Hà Khẩu

Mẫu	Hàm lượng dầu (mg/L)		% dầu bị phân hủy
	TXL	SXL	
Bể 3	176	88	50
Bể 4a	194	85	56,19
Bể 6	154	62	59,74

Bảng 3b. Thành phần nhóm của dầu trong nước thải kho Hà Khẩu

Mẫu	CBH no (mg/l)	CBH no (%)	CBH thơm (mg/l)	CBH thơm (%)	THCPC (mg/l)	THCPC (%)
TXL	150	85,71	12	6,77	13	7,52
SXL	67	78,45	4	4,78	14	16,77

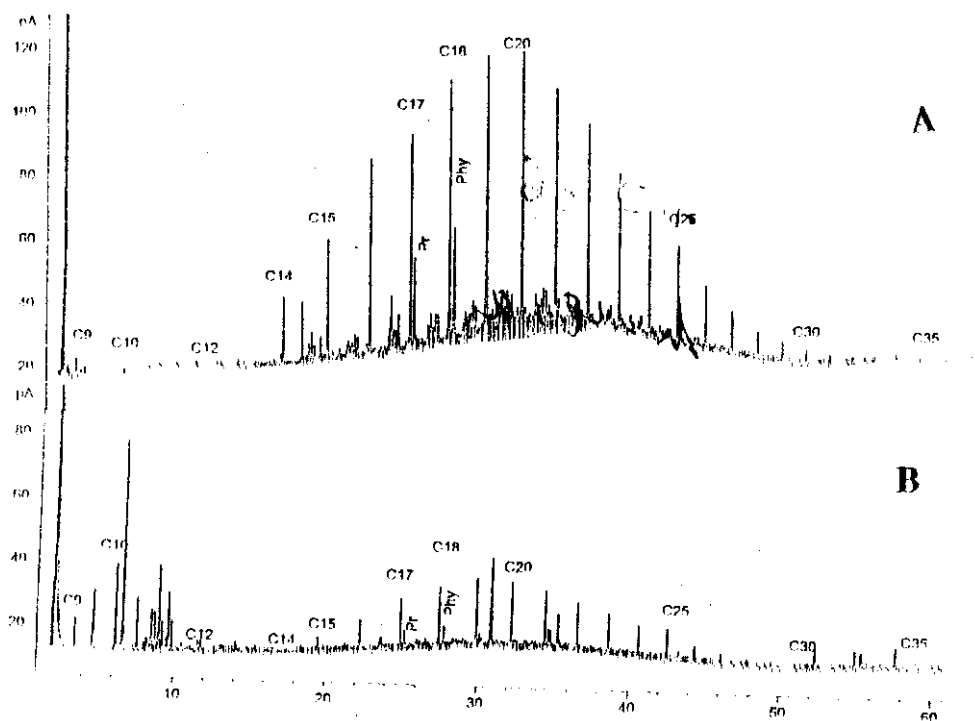


Hình 3. Thành phần nhóm của dầu

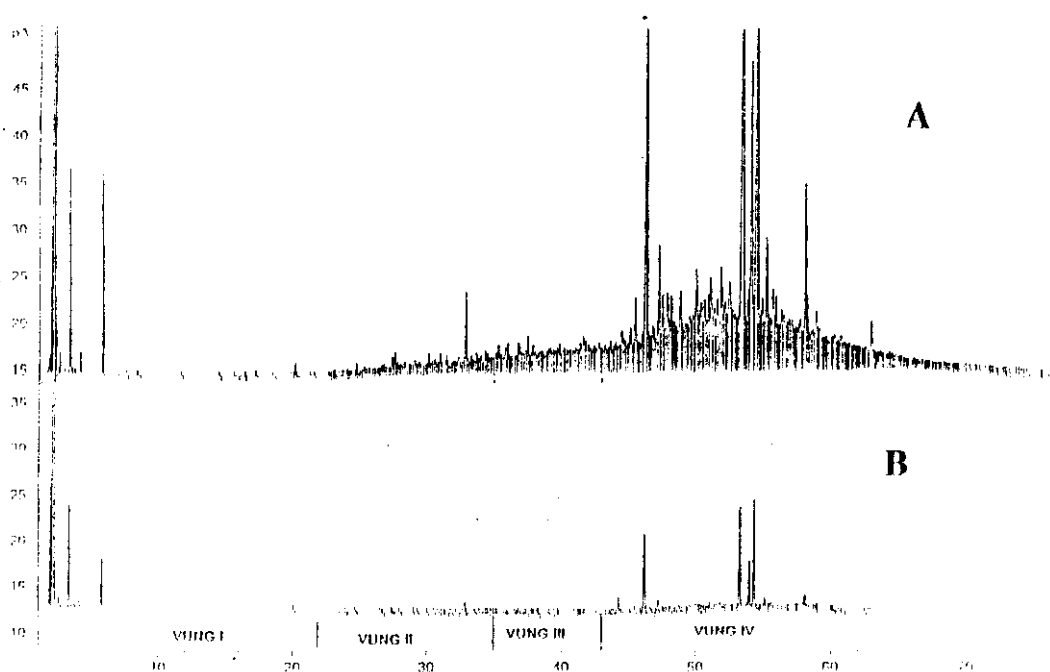
Các kết quả phân tích dầu được trình bày ở bảng 3a (chúng tôi cũng đánh giá dầu tại các bể không tham gia thử nghiệm này, kết quả cho thấy lượng dầu tổng số lên tới 120,534 g/L, COD lên tới gần 1000 mg/L). Từ các kết quả ở bảng 3a cho thấy hàm lượng dầu tổng số trong các bể trước khi xử lý là trong khoảng 154-194 mg/L và sau khi xử lý giảm xuống và dao động trong khoảng 62-88 mg/L. Hàm lượng dầu mất đi theo thời gian từ 50% đến 59,94 %. Thành phần nhóm của các hợp chất chủ yếu của dầu cũng thay đổi một cách rõ rệt trước và sau khi xử lý (bảng 3b và hình 3). Hàm lượng nhựa không thay đổi đáng kể. Hàm lượng cacbua hydro thơm giảm từ 12 mg/L ở mẫu trước khi xử lý còn 4 mg/L sau 5 ngày xử lý. Cacbua hydro no là thành phần chủ yếu của dầu ô nhiễm giảm từ 150 mg/L còn 67 mg/L sau 5 ngày xử lý. Đối với cacbua hydro no, vi sinh vật phân huỷ hầu hết mạch cacbon có độ lớn khác nhau nhưng mạch có nguyên tử cacbon từ C12 cho đến C31 được vi sinh vật sử dụng nhiều nhất (kết quả không trình bày). Kết quả này cũng phù hợp với các công trình đã công bố về khả năng sử dụng n-alkan của vi sinh vật [1, 2, 5]. Thành phần này chiếm tỷ lệ cao nhất, tới 85,71% trong toàn bộ lượng dầu có trong nước thải (bảng 3b và hình 2).

Tập đoàn vi sinh vật có khả năng sử dụng các nguyên tử cacbua hydro no khác nhau mang một ý nghĩa rất lớn. Nếu thời gian sục khí tăng và quá trình phân huỷ kỵ khí được tăng cường bằng cách đưa các bể kỵ khí vào hoạt động thì thời gian loại bỏ dầu đến mức cho phép trong nước thải sẽ giảm rất nhiều. Cacbua hydro thơm có nguyên tử cacbon từ C 16 đến C 26 và lớn hơn C26 được sử dụng mạnh hơn. Vấn đề loại bỏ hoàn toàn cacbua hydro thơm đa nhân là nhiệm vụ rất quan trọng của công nghệ xử lý. Chỉ có bằng con đường sinh học thì loại chất độc gây ung thư và đột biến gen ở người, động vật này mới có khả năng loại bỏ hoàn toàn. Theo một số công trình gần đây cho thấy cacbua hydro no và thơm còn do vi sinh vật kỵ khí sử dụng [1, 6] cho nên các thành phần của dầu sẽ được phân huỷ hết khi chúng ta đưa qui trình phân huỷ sinh học kỵ khí vào hệ thống xử lý tại Hà Khẩu. Chỉ số phytan và pristan cũng thay đổi một cách cơ bản (kết quả không trình bày). Từ phổ sắc ký đồ thể hiện ở hình 4a và 4b cho thấy sự thay đổi rõ rệt cả về số lượng và thành phần của dầu dưới tác động của vi sinh vật (hình 3). So với kết quả đã đạt được trong điều kiện phòng thí nghiệm (như trình bày ở phần trên) các kết quả đạt được ở điều kiện hiện trường chưa có sự hỗ trợ đầy đủ của các yếu tố kỹ thuật cần thiết đã chỉ ra rằng công nghệ phân huỷ sinh học có tính khả thi cao. Điều đó được thể hiện ở sự tăng về số lượng vi sinh vật có khả năng phân huỷ dầu, hàm lượng, thành phần dầu bị phân huỷ theo thời gian, và các chỉ số môi trường.

Sự tăng lên số lượng của vi sinh vật dị dưỡng và đặc biệt là vi sinh vật phân huỷ cacbua hydro trong quá trình xử lý chứng tỏ vai trò của sục khí (tuy oxy chưa cung cấp đầy đủ) và hiệu quả của việc bổ sung chế phẩm dinh dưỡng, kết quả là hàm lượng dầu tổng số giảm, COD giảm sau 5 ngày xử lý.



Hình 4a. Phổ sắc ký cacbuahydro no
A. Mẫu trước xử lý (TXL); B. Mẫu sau xử lý (SXL).



Hình 4b. Phổ sắc ký cacbuahydro thơm
A. Mẫu trước xử lý (TXL); B. Mẫu sau xử lý (SXL).

IV. KẾT LUẬN

- Vai trò của oxy đã thể hiện một cách rõ ràng, tăng tốc độ phát triển của vi sinh vật, nếu oxy được cung cấp liên tục thì chắc chắn thời gian phân huỷ dầu sẽ giảm ở bể hiếu khí. Nếu hệ thống xử lý được cải tạo lại để trong chu trình xử lý có giai đoạn xử lý kỵ khí thì hiệu quả làm sạch sẽ tăng.
- Chế phẩm cung cấp cho vi sinh vật tham gia vào quá trình phân huỷ dầu hiệu quả đã có hiệu quả rõ ràng, so với các kết quả trong phòng thí nghiệm kết quả đạt được rất khả quan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Caldwell M.F. Carrett R.M. Prince R.C Suflita J. M., 1998.
Anaerobic biodegradation of long chain n-alkanes in a weathered crude oil. Abstract of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology. Atlanta May 17-21, 1998. p. 455
2. Chi Ming So and L. Y. Young, 1999.
Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. Appl. Envir. Microbiol. 65: 2969-2979.
3. Đặng Thị Cẩm Hà, Nguyễn Bá Hữu, Đinh Thúy Hằng, Lê Phi Nga, Lại Thúy Hiền, Lưu Bích Thảo, 1995.
Khảo sát quần hợp vi sinh vật trong vùng ô nhiễm dầu tràn tại thành phố Hồ Chí Minh. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Trang 344-358.
4. Đặng T. Cam Ha, Nguyen Ba Huu, Dinh Thuy Hang, Nguyen Thu Hang, Tran Nhu Hoa, Luu Bich Thao, Nguyen Bich Thuan, Cu Viet Nga, Vu Thi Dung, Nguyen Thi De, 1998.
Use of Bioremediation to clean-up oil contamination in wastewater. Presentation in the " Science and Technology Dynamic Force Towards Sustainable Development in Asian " workshop. Hanoi, October 12-14, 1998.
5. Hirschler A., J.-F. Rontani, D. Raphael, R. Matheron, and J.-C. Bertrand, 1998.
Anaerobic Degradation of Hexadecan-2-one by a Microbial Enrichment Culture under Sulfate-Reducing Conditions. Appl. and Envir. Microbiol. 64: 1576-1579
6. Hollioger Christof, and Alexander JB Zehnder, 1996.
Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. Current Opinion in Biotechnology 7: 326-330.

BIOREMEDIATION TREATMENTS IN FIELD TRIAL FOR CLEANING UP OIL CONTAMINATED WASTEWATER IN HA KHAI PETROLEUM PRODUCT STORAGE

*Dang Thi Cam Ha, Nguyen Ba Huu, Cu Viet Nga,
Tran Nhu Hoa, Nguyen Thi De*

SAMMARY

Bioremediation treatments have been carried out in the wastewater treatment plant without its reconstruction of Ha Khai petroleum product storage in order to understand the role of oxygen and nutrient supply in aerobic tanks. The results of microbial, total oil, oil composition analysis, and some environmental indexes indicate that added nutrients and oxygen supply (even aeration was still not sufficient) take important place in removing of the contaminated petroleum products in wastewater after 5 day treatment. It is finding not only in an increase of number of diesel oil- degrading microorganisms from 10^2 cell/ml to 10^9 cell/ml and other group of microbes, but also in decrease of concentration of total oil from 176 to 67 mg/L (almost 60% total oil was removed). Chemical analytical results indicate that COD and other environmental indexes were significant changed. Oil composition was also changed after treatment, particularly concentration of aromatic hydrocarbons was reduced from 14 mg/L to 4 mg/L. Bioremediation treatments in the field trials show promising technology, and it may get better results when wastewater treatment plant in Ha Khai will be undergoing in sufficient and full reconstruction for this technology.

1.0.17**ỨNG DỤNG TẢO VÀ CỘT LỌC SINH HỌC TRONG XỬ LÝ NƯỚC THẢI SINH HOẠT QUI MÔ NHỎ**

Đặng Xuyên Như, Nguyễn Phú Cường, Dương Hồng Dinh

TRUNG TÂM SINH HỌC THỰC NGHIỆM -
VIỆN NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ

I. MỞ ĐẦU

Nhiều kết quả nghiên cứu về công nghệ sinh học tảo đã được ứng dụng vào thực tế như sản xuất sinh khối tảo phục vụ cho nhu cầu dinh dưỡng, nuôi trồng thủy sản, tách chiết các chất có hoạt tính sinh học như β -caroten, phycoxanthin, ... Việc sử dụng tảo để xử lý nước thải tương tự như là một nghịch lý khi trong một số ao hồ, bể chứa nước tảo có thể là yếu tố gây ô nhiễm do sự phát triển quá độ của nó. Nhưng cũng chính tảo có thể được sử dụng làm tác nhân xử lý nước thải nhờ khả năng hấp thụ các chất gây ô nhiễm với điều kiện thu hồi được sinh khối tảo từ nước thải đã xử lý.

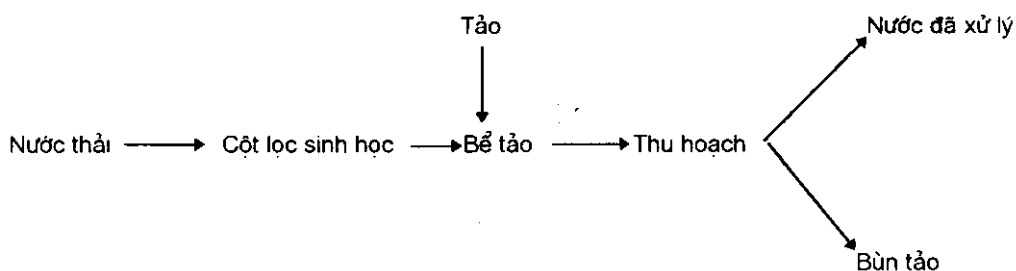
Nghiên cứu ứng dụng tảo để xử lý nước thải đã được thực hiện đầu tiên ở California, Hoa Kỳ vào đầu những năm 1950. Từ 1976 đã có những dự án thực hiện kỹ thuật này trong điều kiện thực tế ở Singapo, Thái Lan, Ấn Độ, Israel, Philippin, ... Tuy nhiên các nghiên cứu này còn đang được hoàn thiện thêm để tìm biện pháp thích hợp thu hồi tảo.

Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu bước đầu để thăm dò khả năng sử dụng vi tảo trong xử lý nước thải. Dương Đức Tiến, Đặng Xuyên Như, Nguyễn Văn Tuyên, Lâm Minh Triết, ... đã tiến hành những nghiên cứu sử dụng tảo để xử lý nước thải trong điều kiện Việt Nam. Tuy nhiên việc sử dụng riêng rẽ các bể tảo để xử lý nước thải cũng gặp phải những khó khăn nhất định khi tải lượng ô nhiễm của nước cần xử lý cao. Khi đó thời gian nuôi tảo kéo dài dẫn đến chi phí đầu tư ban đầu cho việc xây dựng bể tảo tăng lên. Theo Limping K. thì cột lọc sinh học kiểu nhỏ giọt với cấu trúc ống lồng ống có khả năng làm giảm COD cũng như chuyển hoá N-NH_4^+ có trong nước thải thông qua quá trình nitrát hoá rất cao(5).

Dựa trên các dẫn liệu khoa học trong và ngoài nước chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sử dụng kết hợp tảo và vi sinh vật trong cột lọc sinh học trong xử lý nước thải sinh hoạt để có thể đưa ra một mô hình xử lý đơn giản, gọn nhẹ nhưng hiệu quả, có khả năng ứng dụng vào thực tế.

II. NGUYÊN LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

- Chúng tôi sử dụng nước thải sinh hoạt thu tại một số cống thải trong thành phố Hà Nội làm đối tượng xử lý.
- Tác nhân xử lý gồm có:
 - + Tảo *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* trong tập đoàn giống tảo của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm
 - + Tập đoàn các vi sinh vật có sẵn trong nước thải sinh hoạt
- Sơ đồ thí nghiệm



Nước thải lấy về đem xác định các thông số ô nhiễm.

- + Khi nước thải có hàm lượng các chất dinh dưỡng cao COD > 700mg/l, nước thải được chảy qua cột lọc để làm giảm COD nhằm hạn chế được việc pha loãng nước thải khi nuôi tảo và hạn chế được thời gian xử lý.
- + Khi nước thải có COD < 700mg/l, nước thải có thể đem trực tiếp nuôi tảo trong bể tảo với chiều cao cột nước từ 12-15cm.
- Các chỉ số gây ô nhiễm COD, N-NH₄⁺, N-NO_x⁻, P tổng số, Coliforms, pH, được xác định trên các máy:
 - + PH meter EC - 10 HACH (Mỹ)
 - + Spectrophotometre DREL/2010 HACH (Mỹ)
 - + Dụng cụ, môi trường kiểm tra vi sinh HACH (Mỹ)
- Mật độ tảo được xác định hàng ngày trên máy Spectrophotometer Prim C - OSI (Pháp)

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

- Cột lọc sinh học có hình trụ với thể tích 9lít, được nhồi các viên than củi có kích cỡ 1-1,5cm. Nước thải chảy liên tục qua cột với lưu lượng khoảng 10,4-16m³/m³ thiết bị /ngày, tải lượng chất hữu cơ đạt 10,8-16,7kg COD/m³/ngày. Trước khi đem vào sử dụng, cột lọc đã được cấy đủ vi sinh vật bằng cách cho nước thải sinh hoạt chảy qua cột liên tục đến khi xuất hiện hiện tượng kéo màng trên các

viên than củi (giai đoạn này tiến hành trong khoảng 10-12 ngày). Nước thải sau xử lý bằng cột lọc chảy sang bể nuôi tảo để xử lý tiếp bước hai.

- Bể nuôi tảo chúng tôi sử dụng là bể nhựa PVC, tỉ lệ tải lượng chất hữu cơ trong bể đạt 40,2g COD/m² (hoặc 402kg COD/ha), tảo được nuôi trong điều kiện nhiệt độ, ánh sáng ngoài trời. Mật độ tảo được nhiễm vào khoảng 150mg/l. Sinh trưởng của tảo được đo hàng ngày. Bể tảo được khuấy trộn bằng guồng (tốc độ nước chảy 18-20cm/s) 3 giờ một lần, mỗi lần 30 phút. Buổi tối không khuấy trộn. Khi tảo đã phát triển cực đại thì được tháo sang bể lắng thứ cấp để tách sinh khối tảo. Tại bể này chúng tôi bổ sung chất trợ lắng là phèn nhôm và Polyelectrolyte với nồng độ tương ứng là 500mg/l và 60mg/l. Nước sau xử lý có thể đổ vào hệ thống thoát nước tự nhiên. Bùn tảo thu được có thể làm thức ăn cho cá hoặc làm phân bón.
- Để đánh giá hiệu quả xử lý, mỗi một giai đoạn chúng tôi tiến hành phân tích các chỉ số ô nhiễm của nước trước và sau xử lý. Kết quả phân tích được trình bày trong các bảng 1, 2, 3, 4.

Bảng 1. Khả năng loại bỏ các chất gây ô nhiễm của vi sinh vật trong cột lọc sinh học (giá trị trung bình)

Thông số	Nước vào (mg/l)	Nước ra (mg/l)	Hiệu quả loại bỏ (%)
COD	1046	335	68
N-NH ₄ ⁺	13	2,6	80
P tổng số	3,75	1,7	55
Coliforms	10 ⁸	10 ⁴	99
pH	6,3	6,9	-

Kết quả bảng 1 cho thấy: Cột lọc sinh học có khả năng loại bỏ các chất ô nhiễm khá cao COD giảm 68%, N-NH₄⁺ giảm 80%, phospho tổng số giảm 55%, Coliforms giảm 99%.

Hiệu quả loại bỏ này là do các vi sinh vật kéo màng bám dính trên giá thể. Với cấu trúc cột lọc có dạng ống lồng ống, quá trình trao đổi khí tự nhiên được xảy ra dễ dàng hơn. Nhờ có cấu trúc này việc cung cấp ô xy cho màng vi sinh vật trên bề mặt giá thể được cải thiện, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình ô xy hoá chất hữu cơ, quá trình nitrat vì vậy COD và N-NH₄⁺ giảm rất rõ rệt. Lượng phospho tổng số giảm có thể giải thích là do sự hấp thụ của than củi, than củi là một trong những loại giá thể có khả năng hấp thụ các chất rất cao. Đặc biệt quan sát được chỉ số Coliforms giảm rõ rệt. Như vậy cột lọc sinh học đã có tác dụng làm giảm bớt các chất ô nhiễm, nước sau cột lọc được đưa sang xử lý tiếp bằng tảo.

Bảng 2. Sinh trưởng của tảo trong nước thải sinh hoạt ở điều kiện ngoài trời

Ngày	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sinh khối (mg/l)	150	-	448	575	800	892	955	1020	1000
pH	7,0	-	7,2	7,6	8,2	8,47	9,2	10	9,7

Kết quả trên bảng 2 chứng tỏ sinh khối tảo đạt cực đại 1g/l sau khoảng thời gian 7-8 ngày. Trong quá trình thực nghiệm chúng tôi nhận thấy tảo sinh trưởng tốt trong nước thải sinh hoạt chưa xử lý sơ bộ cũng như trong nước thải sau khi xử lý sơ bộ bằng cột lọc sinh học hiếu khí.

Bảng 3. Khả năng loại bỏ các chất ô nhiễm của tảo trong bể tảo (giá trị trung bình)

Thông số	Nước vào (mg/l)	Nước ra (mg/l)	Hiệu quả loại bỏ (%)
COD	335	85	75
N-NH ₄ ⁺	2,6	0,4	85
P tổng số	1,7	0,5	70
Coliforms	10 ⁴	0,0	100
pH	6,9	7,8	-

Kết quả bảng 3 cho thấy chất lượng nước sau khi xử lý bằng tảo cho phép xả vào các hệ thống thoát nước tự nhiên. Sử dụng tảo làm tác nhân xử lý rất hiệu quả: COD giảm 75%, N-NH₄⁺ giảm 85%, phospho tổng số giảm 70%, Coliforms giảm 100%. Các kết quả này đạt được là dựa trên sự tương tác giữa tảo và các vi sinh vật trong bể tảo. tảo sử dụng CO₂, diệp lục và ánh sáng mặt trời để tổng hợp vật chất đồng thời giải phóng ô xy, ô xy này cung cấp cho các vi sinh vật trong bể tảo phân huỷ chất hữu cơ. Các vi sinh vật phân huỷ chất hữu cơ thành các sản phẩm cần thiết cho nhu cầu dinh dưỡng của tảo. Trong quá trình phát triển tảo tạo ra môi trường pH cao tạo điều kiện cho một số muối của PO₄³⁻ kết tủa, sức chống chịu của coliforms trong điều kiện pH, nhiệt độ cao của bể tảo rất kém.

Bảng 4. Khả năng loại bỏ các chất ô nhiễm của tảo và các vi sinh vật (giá trị trung bình)

Tham số	Nước vào (mg/l)	Nước ra (mg/l)	Hiệu quả (%)
COD	1046	85	92
N-NH ₄ ⁺	13	0,4	97
P tổng số	3,75	0,5	87
Coliforms	10 ⁵	0,0	100
pH	6,3	7,8	-

Kết quả bảng 4 cho thấy khả năng loại bỏ các chất gây ô nhiễm bằng các tác nhân sinh học là tảo và vi sinh vật đạt rất cao, COD giảm 92%, N-NH_4^+ giảm 97%, phospho tổng số giảm 87%, Coliforms giảm 100%.

IV. KẾT LUẬN

- Tảo phát triển tốt trong nước thải đã xử lý sơ bộ bằng cột lọc sinh học kiểu nhỏ giọt ở điều kiện ngoài trời, sinh khối đạt 1g/l sau 7-8 ngày.
- Sự kết hợp giữa cột lọc hiếu khí và bể nuôi tảo trong xử lý nước thải sinh hoạt đã đem lại hiệu quả xử lý cao, COD giảm 92%, N-NH_4^+ giảm 97%, phospho tổng số giảm 87%, Coliform giảm 100%, nước sau xử lý đạt tiêu chuẩn cho phép thải.
- Việc kết hợp cột lọc sinh học và bể tảo khắc phục được tình trạng pha loãng nước thải khi độ ô nhiễm quá cao, rút ngắn thời gian nuôi tảo giảm diện tích bể nuôi tảo và có thể dùng để xử lý dòng thải liên tục. Ngoài ra sự kết hợp này còn có ý nghĩa thu hồi được nguồn tài nguyên phục vụ cho nông nghiệp và thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Avigad Vonshak, 1992.

Microalgal biotechnology: is it an economic success. In: Biotechnology Economic & Social Aspects issues for developing countries. Cambridge Univ. press.

2. De la Noue J., Ni Eúdhin, D., 1998.

Improve performance of intensive semicontinuous culture of *Scenedesmus* by biomass recirculation. In book "Biotechnology & Bioengineering ", Vol. 31, No.5, p.397 - 406.

3. Dương Đức Tiến, 1992.

Công nghệ nuôi trồng tảo *Spirulina* và sử dụng chúng trong xử lý nước thải. Báo cáo tại hội thảo quốc gia " Nuôi trồng và sử dụng các tế bào tự dưỡng". Hà Nội.

4. Đặng Xuyên Như và cộng sự, 1995.

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh lý, sinh hoá của hai loài tảo *Spirulina platensis* và *Spirulina maxima* nuôi trong môi trường có hàm lượng N-NH_4^+ và NaCl khác nhau. Báo cáo đề tài cấp Nhà nước Nghiên cứu công nghệ sản xuất các chế phẩm giàu dinh dưỡng và giàu hoạt tính sinh học từ nguồn vi tảo để phục vụ cho dinh dưỡng người và động vật. Hà Nội.

5. K. Limping, K. Wim, Nguyen Phu Cuong and W. Verstraete, 1999.

Treatment of domestic wastewater by enhanced primary decantation and subsequent naturally ventilated trickling filtration. Water, Air and Soil pollution, Kluwer Academic Publishers, 113: 43-62.

6. Lâm Minh Triết, 1992.

Nghiên cứu ứng dụng tảo *Chlorella* để xử lý nước thải trong điều kiện Việt Nam. Báo cáo tại hội thảo quốc gia “ Nuôi trồng và sử dụng các tế bào tự dưỡng”. Hà Nội.

7. M. A. Azir., W. J. Ng., 1996.

Application of algal Biotechnology for removing toxic substances from industrial waste water. National University of Singapore.

8. M. A. Azir., W. J. Ng., 1996.

Algal Biotechnology in wastewater treatment. National University of Singapore.

9. M. A. Borowitzka.

The algae: their biology and limits to growth. Murdoch University.

10. M. Kajan., V. Ty Chy., 1993.

Concentrated algal culture for biological waste water tertiary treatment. In: Algal Biotechnology., Czech.

11. Nguyễn Văn Tuyên, 1992.

Bản về khả năng nuôi tảo để xử lý nước thải trong điều kiện Việt Nam. Báo cáo tại hội thảo quốc gia “ Nuôi trồng và sử dụng các tế bào tự dưỡng”. Hà Nội.

12. Oswald W. J., 1988.

Microalgae and waste water treatment. In: Microalgal Biotechnology, Cambridge Univ. Press. p.305 - 328.

13. Petzold H., Pulz. O et al., 1993.

The sanitation potential of Microalgae for the elimination of Inorganic water contaminants. In: “ Algal Biotechnology”, Czech.

14. S. M. Phang, 1993.

Chlorella production in high - rate algal ponds treating rubber effluent - influence of heterotrophic nutrition of the alga. Progress in Biotechnology of Photoautotrophic Microorganisms, Czech.

15. Waste water treatment and Resource Recovery, 1980.

Report of a workshop on high-rate algae ponds Singapore.

16. Waste water treatment by Algal Cultivation, 1991.

Proceedings of a Seminar held at Murdoch University Western Australia.

USING ALGAE AND BIOFILTER FOR TREAT MUNICIPAL SEWAGE IN SMALL SCALE

Dang Xuyen Nhu, Nguyen Phu Cuong, Duong Hong Dinh

SUMMARY

*To treat household wastewater, a sequence of "trickling filter - algae pond" was applied in a lab-scale designed treatment system. Charcoal was used as carrier material in trickling filter. Air was supplied to the trickling filter by means of natural ventilation. The *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* were used in algae pond. The removal efficiencies of COD, $N-NH_4^+$, total phosphat of the system were about 92%, 97% and 87% respectively. The integrate treatment system also achieved a fair degree of hygienisation. The coliforms was not detected in the final effluent. The sludge produced in the trickling filter was negligible. The resource was reused via algae biomass. In the integrate treatment system the HRT in algae pond was decreased*

1.0.18

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM VI SINH VẬT HỮU HIỆU LÊN QUÁ TRÌNH XỬ LÝ Kừ KHÍ CẶN BÙN NƯỚC THẢI LÀNG NGHỀ CHẾ BIẾN NÔNG SẢN KẾT HỢP CHĂN NUÔI.

Nguyễn Văn Năm, Lại Thị Chí,

Hoàng Phương Hà, Trần Văn Nhi, Phạm Văn Ty

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật xử lý kỵ khí được áp dụng đối với các nguồn phế thải lỏng hay bán lỏng với hàm lượng cao các chất hữu cơ cao phân tử khó tan, khó tiêu như xellulose, tinh bột ... Diễn hình của kỹ thuật này là hầm ủ khí sinh học. Hoạt động của hầm ủ khí sinh học nhờ vào sự tham gia của nhiều chủng loại vi sinh vật kỵ khí bắt buộc và kỵ khí không bắt buộc. Chúng thuộc về 3 nhóm chức năng là các vi sinh vật phân giải các hợp chất hữu cơ cao phân tử thành các đơn phân tử, các vi sinh vật chuyển hoá các đơn phân tử thành axit hữu cơ, CO_2 và H_2 , các vi sinh vật sinh metan. Ưu điểm của kỹ thuật ủ biogas là đảm bảo vệ sinh môi trường, tái sử dụng năng lượng sạch (CH_4) và tạo ra nguồn nguyên liệu làm phân bón rất tốt. Theo tính toán lý thuyết [1] hiệu suất tối đa là 0,42 - 0,47 m^3/kg cacbonhydrat, 0,45 - 0,55 m^3/kg protein và 1 m^3/kg chất béo. Tuy nhiên cho tới nay kỹ thuật xử lý này vẫn đòi hỏi thời gian khá dài và hiệu suất tạo khí CH_4 còn giao động trong một phạm vi tương đối rộng. Nhiều tài liệu tổng kết [2,3,5,7] các nhân tố cơ, lý và hoá ảnh hưởng đến hiệu suất sinh metan là : bản chất nguyên liệu hữu cơ, kiểu thiết kế bể lên men và phương thức vận hành, nhiệt độ, độ ẩm và pH của hỗn dịch lên men cũng như sự có mặt hay không của oxy không khí và các nhân tố oxy hoá khác. Nhân tố kỹ thuật sinh học có tính chất quyết định thì rất ít được nói tới. Một số tài liệu đã đề cập việc bổ xung nước thải hay bùn ao có chứa một số vi sinh vật vào hỗn dịch lên men khi bắt đầu ủ [4], lọc hay ly tâm lấy vi sinh vật ở đầu ra để trả lại vào bể lên men [5], ủ vi sinh vật sơ bộ nguyên liệu trước khi cho lên men metan [6,7] Tuy nhiên các kết quả thực tế so với các con số lý thuyết vẫn còn thấp hơn nhiều bởi vì tập đoàn vi sinh vật trong quá trình ủ là những chủng có sẵn trong khối ủ, có thể chưa có đủ các nhóm chức năng hoặc có đủ nhưng chưa qua tuyển chọn, đặc biệt là nhóm các vi sinh vật tham gia thủy phân các hợp chất hữu cơ cao phân tử. Do đó để nâng cao hiệu suất lên men metan trong quá trình xử lý kỵ khí, ngoài việc áp dụng tốt các kỹ thuật cơ, lý, hoá, nhất thiết phải bổ xung 1 tập hợp vi sinh vật hữu hiệu vào bể lên men nhằm đóng vai trò khởi động làm tăng nhanh các quá trình vi sinh vật trong hầm ủ, rút ngắn thời gian lên men xử lý.

Xuất phát từ nhận thức đó, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của một số chế phẩm vi sinh vật hữu hiệu sẵn có trong nước lên quá trình xử lý kỵ khí cặn bùn nước thải làng nghề chế biến nông sản kết hợp chăn nuôi.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

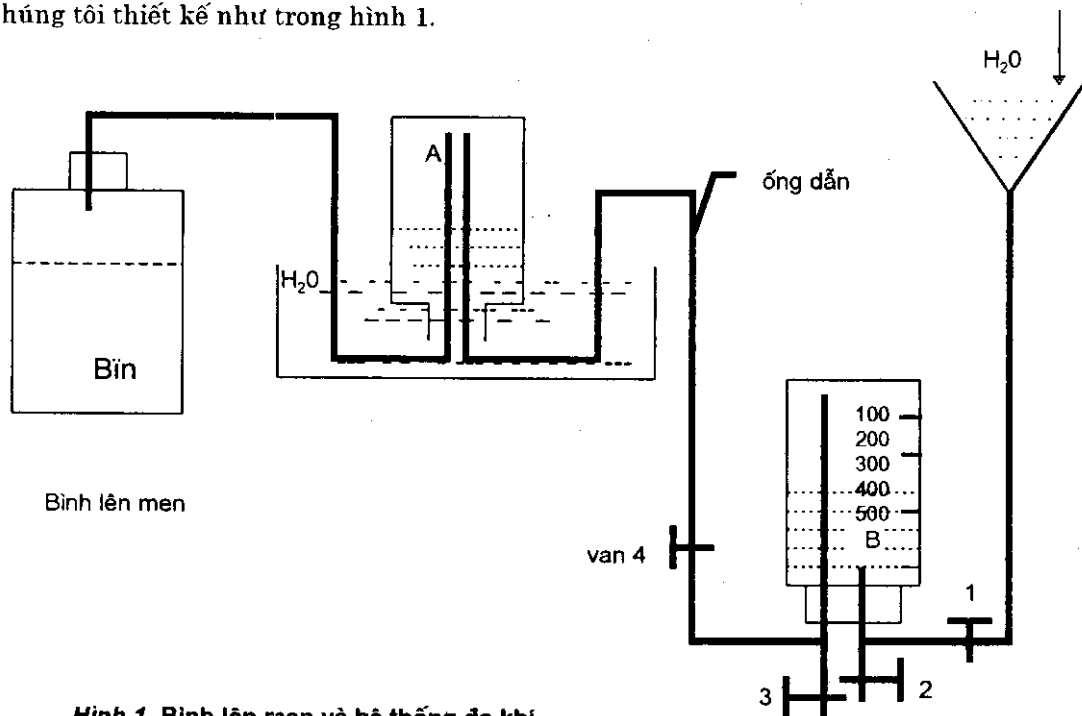
1. Nguyên liệu

- Chế phẩm DW97 của Viện Công nghệ sinh học và Liên hiệp khoa học sản xuất Công nghệ hoá học.
- Chế phẩm EMUNI3 của Trung tâm vi sinh vật ứng dụng - ĐHQGHN.
- Chế phẩm Microphot của Công ty sinh hoá Nam Định.
- Cặn bùn nước thải gồm 2 loại : Loại a là bùn ở đầu kênh lắng sơ bộ của hệ thống xử lý nước thải Phú Đô, loại b là bùn ở cuối kênh lắng sơ bộ. Theo thời gian bùn ở a sẽ chuyển dần sang b.

2. Phương pháp

- *Phương pháp lên men trong nghiên cứu này là lên men từng mẻ gián đoạn (batch).*
 - Tại phòng thí nghiệm các bình lên men có dung tích 1 lít bùn, các chế phẩm được bổ xung 0,1% lactic đều và để lên men ở nhiệt độ phòng hàng ngày đo lượng khí tạo thành.
 - Tại bể lên men biogas cặn bùn trong hệ thống xử lý nước thải Phú đô chúng tôi lên men trong bể có buồng thu khí trôi nổi, dung tích lên men là 3m³. Chế phẩm vi sinh vật cũng được bổ xung tỷ lệ 0,1%, nhiệt độ ngoài trời.
 - Xác định thành phần khí thu được ở ngày lên men thứ 5 bằng phương pháp sắc ký khí.
- *Phương pháp đo khí :*

Để đảm bảo điều kiện lên men kỵ khí tuyệt đối, hệ thống lên men và đo khí được chúng tôi thiết kế như trong hình 1.



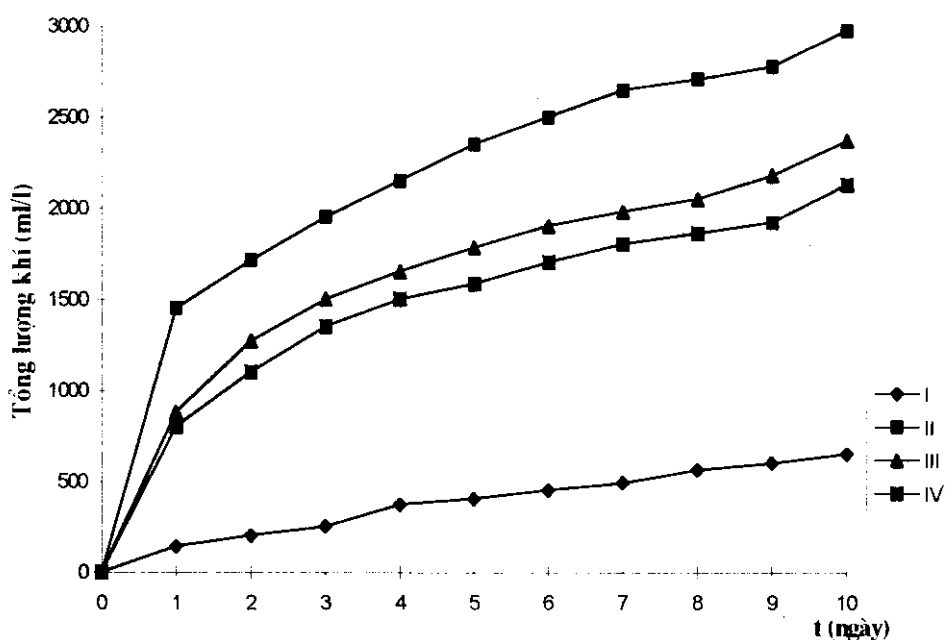
Hình 1. Bình lên men và hệ thống đo khí

Trình tự hoạt động: Đóng các van 2 và 4 mở van 1 và 3 nước sẽ từ phễu vào bình đo B qua van 1 và dồn hết khí ra ngoài qua van 3; đóng các van 1 và 3, mở van 2 và 4 nước sẽ chảy từ bình B ra ngoài qua van 2, nước sẽ tự dâng lên bình A và khi toàn bộ không khí từ bình A được hút sang bình B thì đóng toàn bộ các van lại và đọc số đo ở bình B ta sẽ biết được lượng khí được tạo thành từ bình lên men.

• *Xác định hàm lượng chất hữu cơ tổng số của cặn bùn trước và sau xử lý theo phương pháp Walkey black [9].*

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của các chế phẩm vi sinh vật lên sản lượng khí và tốc độ sinh khí ở bình lên men cặn bùn



Hình 2. Sản lượng khí thu được ở các bình thí nghiệm

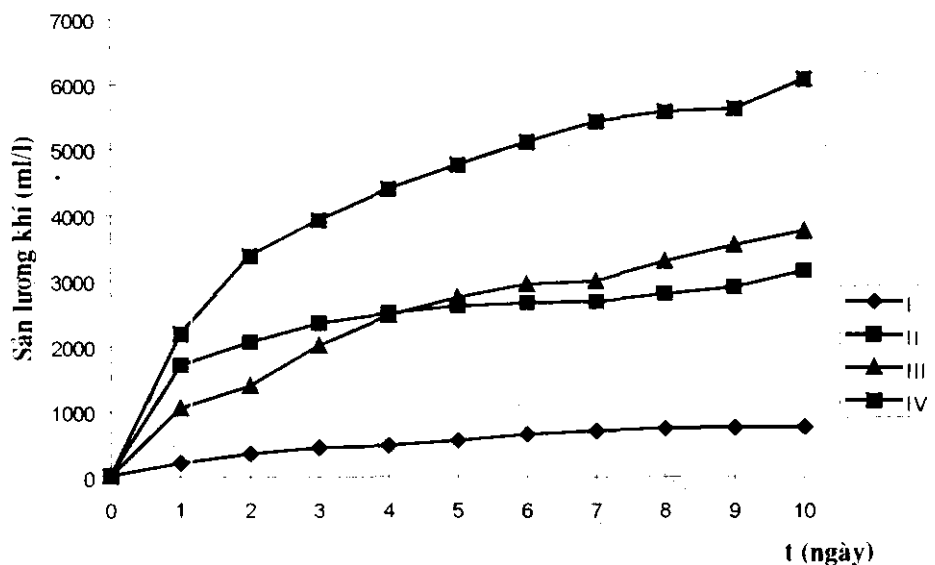
I- Bùn lên men tự nhiên; II- Bùn + 0,1% DW97; III- Bùn + 0,1% Microphot;
IV - Bùn + 0,1% EMUNI3

Trên hình 2 biểu diễn tốc độ và sản lượng khí tạo thành trong 10 ngày lên men. Kết quả cho thấy ảnh hưởng rất rõ rệt của cả 3 loại chế phẩm vi sinh vật đã sử dụng song chế phẩm DW97 có tác dụng tăng mạnh hơn hẳn, nó làm tăng 358% so với lên men tự nhiên, tăng 25% so với lên men có Microphot và tăng 40% so với lên men có EMUNI3. Do đó chúng tôi quyết định sử dụng DW97 trong các nghiên cứu tiếp.

2. Ảnh hưởng của DW97 lên sản lượng và tốc độ lên men metan từ 2 loại cặn bùn

Kết quả trình bày ở hình 3 một lần nữa cho ta thấy rất rõ khả năng làm tăng sản lượng và tốc độ lên men metan từ bùn thải của DW97. Sau 10 ngày sản

lượng khí ở bùn loại a tăng 53% còn loại b tăng 313%. Mặt khác sản lượng khí ở 2 loại bùn lên men tự nhiên cũng rất khác nhau, loại a tăng 392% so với loại b. Điều này có thể giải thích do quá trình chuyển từ loại a sang loại b thì phần lớn các thành phần hữu cơ dễ tan dễ tiêu đã bị phân huỷ tại kênh lắng sơ bộ. Điều này được khẳng định bởi kết quả xác định hàm lượng chất khô và hàm lượng chất hữu cơ tổng số được trình bày trong bảng 1.



Hình 3. Sản lượng khí thu được ở các bình thí nghiệm

I - Bùn b, II - Bùn b + 0,1% DW97; III - Bùn a;

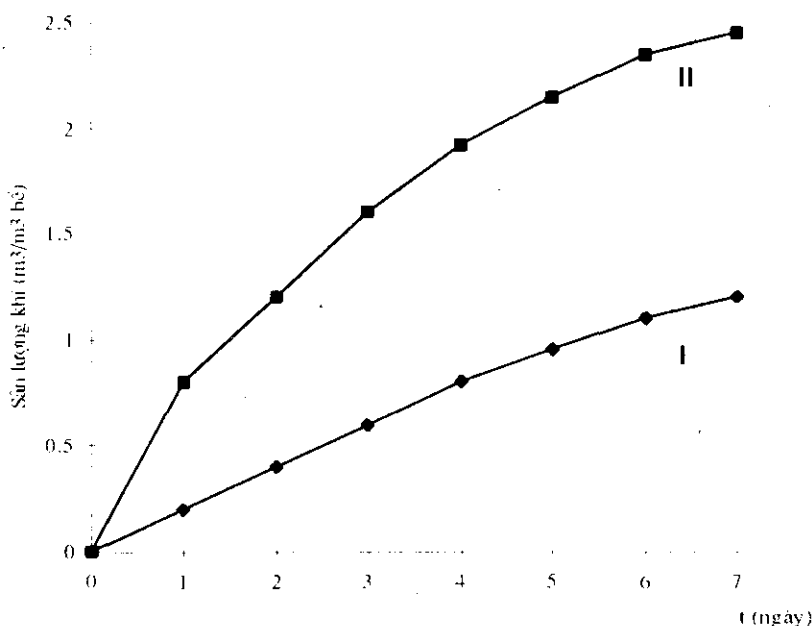
IV - Bùn a + 0,1% DW97

Bảng 1. Hàm lượng chất khô và chất hữu cơ tổng số của cặn bùn trước và sau lên men

Loại bùn	Hàm lượng chất hữu cơ tổng số(%)	Hàm lượng chất khô(%)
Bùn a trước lên men	4,27	9,5
Bùn a sau lên men tự nhiên	3,00	8,3
Bùn a sau lên men có DW97	2,64	7,0
Bùn b trước lên men	3,90	8,5
Bùn b sau lên men tự nhiên	3,22	7,5
Bùn b sau lên men có DW97	2,78	7,2

Với các kết quả này chứng tỏ DW97 làm tăng cường quá trình phân huỷ các hữu cơ cao phân tử khó tiêu khó tan trong cặn bùn từ đó đẩy nhanh quá trình tạo thành CH_4 .

Năng suất sinh khí metan trong hầm ủ theo nhiều tài liệu đã tổng kết [5,6,7,8] là khoảng 0,4 - 0,5 m³/m³ bể/ngày nhưng với kết quả ở trên, năng suất có thể đạt 1,7 - 2,1lit/bình/ngày tương đương 1,7 - 2,1m³/m³ bể/ngày ở những ngày đầu là con số rất cao. Có thể ban đầu hàm lượng các chất hữu cơ dễ tiêu còn nhiều cộng thêm nữa là sự thủy phân nhanh chóng các cao phân tử khó tiêu thành các đơn phân tử dễ tiêu do tác dụng của chế phẩm đưa vào. Những ngày tiếp theo do không có sự bổ xung cơ chất nên năng suất đã bị giảm đi nhanh chóng. Để khẳng định rõ hơn nữa chúng tôi tiến hành thử nghiệm ở tại hệ thống xử lý nước thải làng nghề Phú Đô. Kết quả được trình bày trên hình 4.



Hình 4. Sản lượng khí và tốc độ sinh khí của bùn kỵ khí ở Phú Đô

I - Bùn b; II - Bùn b + 0,1% DW97

Mặc dù là bùn loại b nhưng do ảnh hưởng của DW97 mà sau 7 ngày lên men sản lượng khí tăng 109% so với lên men tự nhiên và năng suất sinh khí đạt 0,8 - 0,6m³/m³ bể/ngày trong 2 ngày đầu và gần như kết thúc lên men sau ngày thứ 7.

3. Ảnh hưởng của chế phẩm DW97 lên chất lượng khí tạo thành trong quá trình xử lý cặn bùn

Bảng 2. Hàm lượng CH₄ và CO₂ trong khí thu được từ các bình thí nghiệm

Mẫu lên men	Hàm lượng CH ₄ (%)	Hàm lượng CO ₂ (%)
Bùn a + DW 97	64	33
Bùn a	52	45
Bùn b + ĐW97	68	30
Bùn b	60	38

Kết quả sắc ký khí trình bày trong bảng 2 cho ta thấy hàm lượng CH_4 ở các mẫu có chế phẩm DW97 cao hơn các mẫu không có chế phẩm từ 13 đến 23%.

IV. KẾT LUẬN

1. Các chế phẩm vi sinh vật hữu hiệu DW97, Microphôt và EMUNI3 đều có tác dụng tăng cường quá trình xử lý kỵ khí cặn bùn nước thải làng nghề chế biến nông sản kết hợp chăn nuôi. Trong đó chế phẩm DW97 có tác dụng mạnh hơn hai chế phẩm còn lại.
2. Chế phẩm DW97 làm tăng sản lượng và tốc độ tạo khí metan trong các hầm ủ cặn bùn từ 1,5 đến 4,1 lần so với đối chứng do đó có thể rút ngắn thời gian xử lý, giảm thể tích bể hay tiết kiệm được chi phí xây dựng bể xử lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Berg L., 1072.
Conservation and Recycling 5,1,5-14.
2. Nagar, B.R, Tietjen C. J., 1978.
Scien. Ind. Res 37, 9, p445 - 448.
3. Tam, D.M, Thanh N.C., 1983.
Renewable Energy Rev. 5,1 Apr. 1983
4. Improving Soil Fertility through Organic Recycling, 1979.
5. Ngô Kế Sương, Nguyễn Lâm Dũng, 1997.
Sản xuất khí đốt bằng kỹ thuật lên men kỵ khí. NXB Nông nghiệp - TP. Hồ Chí Minh.
6. Nguyễn Gia Lương, 1989.
Hội thảo Quốc gia lần thứ nhất - Sơ kết ứng dụng khí sinh vật ở Việt Nam.
7. Nguyễn Việt Năng, 1983.
Khai thác và sử dụng khí sinh vật bằng phế thải nông nghiệp. NXB Nông nghiệp - Hà Nội.
8. International Biogas Workshop on community plants May 1984 - Bremen, Fed Rep. Germany.
9. Lê Văn Khoa và các tác giả, 1996.
Phân tích đất nước và cây trồng. NXB Giáo dục.

**INFLUENCE OF SOME EFFECTIVE MICROBIAL PRODUCTS ON
ANAEROBIC TREATMENT SLUDGE IN AGRICULTURE PRODUCT
PROCESSING WASTEWATER**

*Nguyen Van Nam, Lai Thi Chi,
Hoang Phuong Ha, Tran Van Nhi, Pham Van Ty*

SUMMARY

DW97, Microphot and EMUNI3 were produced in Vietnam. They are combinations of several effective microorganisms able to digest organics. Addition of these products especialy DW97 to anaerobic digestation increased in fermentation rate and biogas yield up to about 4 times in comparation with control.

1.0.19

PHÂN LẬP, ĐỊNH LOẠI VÀ MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA CÁC CHŨNG VI NẤM, XẠ KHUẨN CÓ TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG TRONG QUI TRÌNH XỬ LÝ VỎ CÀ PHÊ

Nguyễn Thị Kim Cúc⁽¹⁾, Phạm Việt Cường⁽¹⁾,
Nguyễn Thị Tuyết Mai⁽¹⁾, Lê Văn Nhung⁽²⁾

(1): VIÊN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

(2): TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

Việc sử dụng vi sinh vật để làm sạch môi trường gần đây được thế giới quan tâm nhiều sau khi tàu Exxon Walder mắc cạn và thải ra 10 triệu gallon dầu vào eo biển Hoàng tử William, Alaska vào tháng ba năm 1989. Các nhà vi sinh vật học và kỹ sư môi trường đã từ lâu biết rằng phân huỷ sinh học bằng vi sinh vật và sửa chữa sinh học (bioremediation) không phải là những khái niệm mới và việc xử lý phế thải, làm giảm ô nhiễm tự nhiên đều dựa vào vi sinh vật để loại bỏ những hợp chất hữu cơ không mong muốn (1,6, 11, 12).

Phế thải của nông nghiệp và công nghiệp chế biến nông lâm sản là một trong những vật liệu thô rẻ tiền, có thể tái sử dụng để sản xuất thực phẩm, nguyên liệu, thức ăn gia súc và phân bón. Thành phần hoá học chủ yếu của cơ chất này là lignoxenluloza - vật chất cơ bản cấu tạo nên thành màng tế bào của thực vật. Một trong những khó khăn chính trong việc khai thác qui trình sinh học có hiệu quả kinh tế để sử dụng nguồn dự trữ tự nhiên vô tận này là do tính bền vững, khó bị vi sinh vật tấn công của chúng. Với sự phát triển của công nghệ sinh học hiện đại, bằng các kỹ thuật sinh học phân tử đã làm thay đổi một số cấu trúc di truyền của vi sinh vật trong tự nhiên để nghiên cứu ứng dụng cho quá trình xử lý các hoá chất độc hại cũng như các chất hữu cơ khó phân huỷ trong điều kiện bình thường (4, 15). Việc phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật hữu hiệu từ tự nhiên, làm giàu và trả chúng lại môi trường đất luôn an toàn và đạt hiệu quả cao. Mặc dù vậy, những nghiên cứu ứng dụng các chủng, tổ hợp các chủng vào thực tế để xử lý ô nhiễm môi trường còn nhiều hạn chế.

Mục đích của chúng tôi là xây dựng được các tập đoàn vi sinh vật có khả năng phân huỷ tốt nhất cho từng loại phế thải hữu cơ nhất định, đặc biệt là phế thải từ ngành công nghiệp chế biến cà phê. Các chế phẩm ít nhất phải khử được mùi, rút ngắn thời gian xử lý đến mức tối đa, phế thải sau khi xử lý đạt độ phân huỷ cao, đảm bảo nhiều mùn nhất. Như vậy phế thải hữu cơ sau khi xử lý sẽ là nguồn cơ chất lý tưởng để sản xuất phân hữu cơ sinh học hoặc hữu cơ vi sinh, góp phần tạo nên một nền nông nghiệp sạch, bền vững.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các chủng vi sinh vật được phân lập từ các vùng đất đô bazan, bùn mía và vỏ cà phê ở Tây Nguyên và Hà Nội.

- Môi trường phân lập và định loại :
 - + Cho xạ khuẩn : ISP1, ISP2, ISP4, ISP5, ISP6, ISP9, Gauze, UKC (thành phần: urea-1.0g, K-1.0g, P-0.5g, NaCl-0.2g, MgSO₄.7H₂O-0.2g, CaCl₂-0.1g, CMC-5.0g, Rỉ đường-10.0g, MnSO₄-vết, FeSO₄-vết, pH-7)
 - + Cho nấm : Czapek-Dox, UKC.
- Phương pháp phân lập
 - + Mẫu đất hoặc bùn mía được lấy về phòng thí nghiệm, loại rác, nghiền nhỏ và pha loãng từ 10¹-10⁹. Lấy dịch pha loãng cấy lên môi trường thạch, nuôi ở các điều kiện nhiệt độ cần thiết và tiếp tục làm sạch cũng trên môi trường đó.
 - + Mẫu vỏ cà phê cho vào bình nón, thêm một lượng khoáng nhất định và ủ ở nhiệt độ yêu cầu để làm giàu các chủng vi sinh vật phân huỷ xenluloza. Sau một tháng lấy mẫu ra, nghiền nhỏ, pha loãng và cấy dịch pha loãng trên môi trường Czapek.
- Phương pháp xác định hoạt tính CMC-aza : Các chủng vi sinh vật được nuôi trên các cơ chất khác nhau ở nhiệt độ nhất định. Sau 5 ngày dịch chiết thô được lọc ra, nhỏ đầy lỗ đã đục sẵn trong đĩa thạch có CMC. Để tủ ấm 30^o C với chủng ưa ấm và 55^o C với chủng ưa nhiệt. Sau 18-20 giờ lấy ra, tráng bằng dung dịch Lugol và đo kích thước vòng phân giải.
- Các đặc điểm sinh lý, sinh hoá và định loại xạ khuẩn theo ISP (Shirling & Gottlieb, 1968, 1969, 1972), (13).
- Định loại nấm sợi theo Raper K.B., với sự giúp đỡ của Viện 69, Bộ tư lệnh lãng Chủ tịch Hồ Chí Minh.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phân giải xenluloza

Từ các mẫu đất, bùn mía và vỏ cà phê, chúng tôi đã phân lập và làm sạch trên các môi trường Czapek-Dox, Gauze, ISP4 ở 30^o C và 55^o C được 13 chủng xạ khuẩn và 13 chủng nấm có hoạt tính CMC-aza. Để chọn chủng có hoạt tính cao, các chủng xạ khuẩn được cấy chấm lên môi trường Czapek, thay đường bằng CMC. Sau 2-3 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp, đĩa nuôi cấy được tráng dung dịch Lugol và đo vòng phân giải. Các chủng nấm sợi được nuôi trong môi trường cám gạo, sau 5 ngày dịch enzym thô được chiết ra để xác định hoạt tính CMC-aza bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả nhận được trên bảng 1.

Đa số các chủng phân lập được có nhiệt độ phát triển thích hợp là 30^oC. Chủng CM6 có nhiệt độ phát triển tối ưu là 60^o C. ở 30^oC và 45^oC, CM6 phát triển kém hơn và

vòng phân giải CMC cũng nhỏ hơn so với ở 60⁰ C. Các chủng xạ khuẩn BK1, BK2, BK3a, BK10a có khả năng phát triển ở 50⁰C nhưng chậm. Riêng các chủng nấm ĐM, ĐM3, BM1, BM2 mặc dù được phân lập ở 30⁰C nhưng chúng có khả năng chịu nhiệt cao, phát triển tốt trên Czapek ở 50⁰C.

2. Kết quả định loại một số chủng vi nấm

Dựa vào kết quả xác định hoạt tính CMC-aza của các chủng nấm ở bảng 1, một số chủng vi nấm đã được lựa chọn để nghiên cứu các đặc điểm hình thái, bào tử... để định loại chúng đến chi hoặc loài. Bảng 2 là đặc điểm định loại của 4 chủng vi nấm được lựa chọn.

Kết quả phân loại cho thấy một chủng thuộc chi *Penicillium* (N1), hai chủng thuộc chi *Aspergillus* (ĐM1, BM2) và chủng N3 thuộc chi *Trichoderma*. Đây cũng là những loài vi nấm thường gặp trong đất, có khả năng phân huỷ các hợp chất phức tạp như chitin, xenluloza, parafin... và không có khả năng gây bệnh cho cây (5, 6, 12). Như vậy việc sử dụng các chủng này trong qui trình xử lý các chất hữu cơ rắn nói chung và vỏ cà phê nói riêng để sản xuất phân hữu cơ sinh học là an toàn.

Bảng 1. Hoạt tính CMC-aza của các chủng nấm và xạ khuẩn

Số thứ tự	Chủng	(D-d) mm	Chủng	(D-d) mm
1	N1	25	Ac	15
2	N2	17	BK1	16
3	N3	19	BK2	13
4	ĐM	27	BK3a	21
5	ĐM1	13	BK3b	12
6	ĐM11	17	BK5	12
7	ĐM2	18	BK6	17
8	ĐM3	29	BK7a	16
9	BM1	26	BK7b	2
10	BM2	25	BK8	15
11	BM21	18	BK9	23
12	CM6	27	BK10a	17
13	BK13	20	BK10b	17

3. Đặc điểm sinh học và định loại xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy theo phương pháp của “Chương trình xạ khuẩn Quốc tế” (ISP) trên các môi trường ISP1, ISP2, ISP4, ISP5. Sau 7, 14 và 21 ngày quan

sắt chúng dưới kính hiển vi thường : màu sắc khuẩn ti khí sinh, khuẩn ti cơ chất, sắc tố hoà tan tiết vào môi trường, hình dạng cuống sinh bào tử và số lượng bào tử trên một chuỗi ở độ phóng đại x 800. Ngoài ra, xác định khả năng sử dụng một số loại đường trên môi trường ISP9, khả năng hình thành melanin trên môi trường ISP6. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 2. Đặc điểm của 4 chủng nấm

Đặc điểm Chủng	Khuẩn lạc	Giá bào tử trần	Bào tử trần	Tên loài
N1	Kích thước 3-4 cm, mặt dạng nhung mầu trắng, vùng mép có mầu hồng nhạt. Khi già có mầu vàng, mầu hoa cà. Mặt trái mầu vàng, vàng chanh, da bò sẫm.	Ngắn, chuỗi nhỏ đơn giản. Thể bình, sắp xếp dị thường, có hình ống, đầu hẹp.	Hình cầu, gần cầu, nhẵn, $d=30-80\mu m$	<i>Penicillium levitum</i> , Raper and Fennell
DM	$d=4-6$ cm, mầu xanh lục lơ. Không có giọt tiết, mặt trái không mầu hoặc mầu hồng nhạt	Đầu sinh bào tử trần hình cột, bong hình cổ chai, thể bình một tầng.	Hình gần cầu, cầu, ráp nhẹ. $d=2.0-3.0\mu m$	<i>Aspergillus fisheri</i> , Wehmer
BM2	Bề mặt khuẩn lạc từ dạng nhung đến xốp bông, mầu xanh lục hoặc xám. Mặt trái đổi. Thể bình một không mầu hoặc mầu vàng, vàng lục thậm chí mầu đỏ.	Ngắn. Đầu sinh bào tử trần hình cột, nhiều, kích thước thay đổi. Thể bình một tầng.	Màu vàng lục, cầu, gần cầu, có gai, $d=2.0-3.5\mu m$	<i>Aspergillus fumigatus</i> , Fresenius
N3	Màu trắng, sau vàng lục, lục sẫm.	Ngắn vách, không màu, có các nhánh mọc từng đôi hoặc mọc vòng. Thể bình hơi phồng phần gốc, thon ở ngọn.	Hình trứng, hình trụ, ngắn tròn đầu, không ngắn vách, nhẵn màu lục nhạt thành khối cầu nhỏ $2-2.5\mu m \times 3-4.5\mu m$	<i>Trichoderma koningii</i> , Oudemans

Bảng 3. Các đặc điểm sinh học và định loại của xạ khuẩn

Đặc điểm	BK3a	BK9	BK10b
<i>Đặc điểm hình thái</i>			
• Kích thước khuẩn lạc(cm)	0.3-0.4	0.3-0.5	0.3-0.6
• Hình thái cuống sinh bào tử	xoắn lò xo	thẳng	xoắn lò xo
• Số bào tử trên chuỗi	5-7	5-8	7-10, ít

Đặc điểm	BK3a	BK9	BK10b
Đặc điểm nuôi cấy			
• Trên môi trường ISP2			
+ Màu sắc khuẩn ti khí sinh	xám	trắng	nâu xám
+Màu sắc khuẩn ti cơ chất	-	-	nâu
+ Sắc tố tan trong môi trường	không	vàng chanh	không
+ Khả năng sinh trưởng	++	++	+++
• Trên môi trường ISP4			
+ Màu sắc khuẩn ti khí sinh	xám	trắng	xám nhạt
+Màu sắc khuẩn ti cơ chất	-	-	-
+ Sắc tố tan trong môi trường	không	không	không
+ Khả năng sinh trưởng	++	+	+++
• Trên môi trường ISP5			
+ Màu sắc khuẩn ti khí sinh	trắng	trắng	hồng nhạt
+Màu sắc khuẩn ti cơ chất	nâu thẫm	-	đỏ, vàng
+ Sắc tố tan trong môi trường	nâu	không	không
+ Khả năng sinh trưởng	++	++	++
• Nhiệt độ thích hợp	30° C	30° C	30° C
• pH thích hợp	7	7	7
Đặc điểm sinh lý, sinh hoá			
• Khả năng đồng hoá đường			
D-Glucosa	+	+	+
L-arabinoza	+	±	±
Saccaroza	±	+	±
D-Fructoza	-	±	+
Rafinoza	-	±	-
Rhamnoza	+	+	+
Xyloza	+	+	+
D-Manitol	+	±	+
I-Inozotol	+	+	+
ĐC	-	-	-
• Khả năng tạo melanin	-	+	-

Từ kết quả của bảng trên, dựa vào khoá phân loại của ISP, kết hợp với khoá phân loại của Krashinikov, chúng tôi đã xác định được các chủng xạ khuẩn nghiên cứu thuộc chi *Streptomyces*. Chủng BK 3a có những đặc tính tương tự *S.flaveolus* và chủng BK10b có những tính chất giống như *S.nodosus*.

4. Hoạt tính CMC-aza của các chủng vi sinh vật trên một số loại cơ chất tự nhiên

Thí nghiệm được đặt theo sơ đồ sau (mỗi lô nhắc lại ba lần) :

1. Cám
2. Bã mía nghiền nhỏ + NPK + vi lượng
3. Vỏ cà phê + NPK + vi lượng
4. Vỏ cà phê + Than bùn (tỉ lệ 3:7) + NPK + vi lượng
5. Vỏ cà phê + Than bùn (tỉ lệ 1:1) + NPK + vi lượng
6. Rơm cắt nhỏ + Than bùn (tỉ lệ 3:7) + NPK + vi lượng
7. Rơm cắt nhỏ + Than bùn (tỉ lệ 1:10) + NPK + vi lượng

Cơ chất mỗi loại 10 g cho vào bình nón, thêm dung dịch NPK và vi lượng, nồng độ NPK là 0.1%. Khử trùng. Cấy 5% giống xạ khuẩn hoặc nấm. Nuôi ở 60°C cho chủng ưa nhiệt và 30°C cho chủng ưa ấm. Sau 5 ngày lấy ra, thêm 40 ml nước cất, ngâm 2 giờ và lọc lấy dịch enzym thô. Hoạt tính CMC-aza của các chủng nấm và xạ khuẩn được xác định theo phương pháp khuếch tán trên thạch. Bảng 4 trình bày kết quả nhận được.

Bảng 4. Hoạt tính CMC-aza của một số chủng nấm và xạ khuẩn trên cơ chất tự nhiên

Lô TN	BK3a	BK5	BK8	BK9	BK10b	N1	ĐM3	CM6	BK13
	(D-d)mm	(D-d)mm	(D-d)mm	(D-d)mm	(D-d)mm	(D-d)mm	(D-d)mm	(D-d)mm	(D-d)mm
1	-	20	7	-	16	25	29	27	20
2	6	-	2	-	-	17	13	-	13
3	14	12	8	15	12	15	16	24	11
4	15	11	7	15	14	14	18	21.5	4
5	15	14	5	17	16	14	17	23	10
6	12	11	2	13	15	11	14	20	8
7	10	10	4	14	14	12	15	14	7

Kết quả ở bảng 4 cho thấy đa số các chủng có hoạt tính CMC-aza cao trong môi trường cám. Chủng BK8 có hoạt tính thấp nhất trong tất cả các lô thí nghiệm, ngược lại chủng CM6 cho hoạt tính cao nhất trên tất cả các loại cơ chất được nghiên cứu. Kết quả nhận được cũng chỉ ra rằng vỏ cà phê là cơ chất thích hợp hơn cả đối với các chủng vi sinh vật nghiên cứu (lô TN 3). Nếu than bùn được thêm vào vỏ cà phê với tỉ lệ 1:1 (lô số 5), hoạt tính CMC-aza của các chủng nấm và xạ khuẩn hầu như không thay đổi, nhưng nếu tăng tỉ lệ than bùn (lô TN4), hoạt tính phân huỷ xenluloza của hầu hết các chủng nghiên cứu giảm rõ rệt.

Rho J.R. et al cũng thấy rằng cơ chất khác nhau có ảnh hưởng sâu sắc đến hoạt tính CMC-aza, beta-glucosidaza, endo-xylanaza và beta-xylozidaza cũng như thành

phần isoenzyme của chúng. Tác giả cho rằng sinh tổng hợp xenulaza và xylanaza trong *Aspergillus niger* được điều chỉnh phối hợp ở mức độ cảm ứng(10). Một số tác giả khác cũng nhận thấy rằng với từng loại cơ chất khác nhau, các loại enzym phân huỷ xenuloza khác nhau được sinh tổng hợp với mức độ khác nhau. Ví dụ đối với chủng *Chaetomium globosum* khi được nuôi trên xenuloza sạch, chúng tổng hợp exo- và endo-glucanaza nhiều hơn. Nhưng khi cơ chất là rơm thì beta-glucosidaza được tạo ra nhiều nhất.

Quá trình sinh tổng hợp xenulaza và thành phần của enzym này bị ảnh hưởng không những bởi tính chất của cơ chất mà còn bị tác động bởi nhiều tác nhân phi sinh học khác (2, 3, 8, 14). Với các cơ chất tự nhiên như rơm, bã mía... nếu được xử lý trước bằng cơ học hoặc hoá học sẽ làm giảm thời gian lên men và quá trình phân huỷ xảy ra hoàn toàn hơn. Ngoài ra các nguyên tố vi lượng cũng như P, S, N vô cơ có tác dụng tốt lên quá trình phân huỷ xenuloza của vi sinh vật (3, 14).

IV. KẾT LUẬN

- Đã tuyển chọn được 7 chủng vi nấm và 2 chủng xạ khuẩn có hoạt tính CMC-aza ≥ 20 mm.
- Trong 4 chủng nấm được phân loại, một chủng thuộc chi *Penicillium*, hai chủng thuộc chi *Aspergillus* và một chủng thuộc chi *Trichoderma*
- Chủng CM6 có khả năng phân huỷ vỏ cà phê tốt nhất ở nhiệt độ 60° C trong số các chủng vi sinh vật được nghiên cứu.
- Các chủng xạ khuẩn đã được định loại đến chi *Streptomyces*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anikiev B.B., Lukomskaia K.A., 1977.
Manual of Microbiological Practice. Moskow, "Prosveshenie", 1977
2. Choi Y.H., Lee S.B., Park K.H., Hong J.S., 1990.
Research reports of the rural development Administration, Soil and Fertilizer. 32(2), 42-50.
3. El-Naghy M.A., El-Katatny M.S., Attia A.A., 1991
International Biodeterioration, 27 (1), 75-86
4. Fierobe H.P., Bagnara-Tardif C., Gaudin C., Guerlesquin F., Sauve P., Belaich A., Belaich J.P., 1993
Euro. J. Biochem., Berlin : Springer-Verlag Berlin. V.217 (2), 557-565
5. Gusakov A.V., Protas O.V., Chernoglazov V.M., Sinitsin A.P., Kovalyeva G.V., Shpanchenko O.V., Ermolova O.V., 1991
Biochimica et Biophysica Acta, N 1073, 481-485
6. Hendricks C.W., Doyle J.D., Hugley B., 1995
Appl. Environ. Microbiol., 61 (5), 2016-2019

7. Lakshmikant, Kamal, Mathus S.N., 1990
World J. of Microbiol. and Biotechnol., 6(1), 23-26
8. Ofuya C.O., Nwajiuba C.J., 1990
J. of Applied Bacteriology, 68(2), 171-177
9. Prestti D.G., Hughes T.A., Stutzenberger F.J., 1991
J. of Biotechnology, 17(2), 177-188
10. Rho J.R., Rhee Y.H., Chung J.H., 1990
Korean J. of Micology, 18(4), 209-217
11. Sarivastava K.C., 1993
Biotech. Adv., v.11, 411-465
12. Semenov A.M., Nizovseva D.V., Panikov N.C., 1995
Microbiologia, 64(1), 97-103
13. Shirling E.B., Gottlieb D., 1966
International J. of Systematic Bacteriology, v16(3), 313-340
14. Tripathi J.P., Yadov J.S., 1991
International Biodeterioration, 27 (1), 49-59
15. Wolff B.R., Lewis D., Pasternak J.J., Glick B.R., 1990
J. of Industrial Microbiology, 5(2-3), 59-64.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND SOME PROPERTIES OF ACTINOMYCETES AND FUNGI FOR APPLYING IN COFFEE PROCESSING WASTE TREATMENT

*Nguyen Thi Kim Cuc, Pham Viet Cuong,
Nguyen Thi Tuyet Mai, Le Van Nhung*

SUMMARY

*From different samples (soil, coffee husk and sugarcane processing waste) have been isolated 26 fungi and actinomycete strains which possess CMC-aza activity. Among them 7 fungal isolates and 2 actinomycete strains have CMC-aza ≥ 20 mm. After screening, 4 fungal isolates have been identified as *Penicillium levitum*, *Aspergillus fisheri*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichoderma koningii*, 3 strains of actinomycetes were identified to genus *Streptomyces*.*

Moreover, there was an investigation on natural substrate's degradation activity of some isolates. The received results show that CM6 isolate is the best one on almost studied substrates and it can be efficiently used in coffee processing waste treatment.

1.0.20

ĐỘNG THÁI CỦA QUÁ TRÌNH ĐƯỜNG HOÁ BẰNG CHẾ PHẨM *Aspergillus awamori* VÀ BẰNG CHẾ PHẨM SANSUPER VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA NÓ ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN RƯỢU.

Nguyễn Thanh Hằng

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ THỰC PHẨM
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

I. MỞ ĐẦU

Từ trước đến nay để đường hoá tinh bột các nhà máy rượu của ta thường dùng chế phẩm amilaza thô nhận được từ nuôi cấy nấm mốc *A.usamii* hoặc *A.awamori*. Mấy năm gần đây một số nhà máy đã mua và sử dụng hai chế phẩm enzym của hãng Novo Đan Mạch: Termamyl 120 L dùng để dịch hoá và San super dùng để đường hoá. Việc sử dụng chế phẩm enzym của hãng Novo thay thế chế phẩm thô từ nuôi cấy nấm mốc đã làm giảm giá thành, nâng cao được hiệu suất đường hoá, giảm nhẹ sức lao động của công nhân, đồng thời tránh được ách tắc ở đường ống khi chưng cất. Tuy nhiên cũng cần xét ảnh hưởng của nó đến hiệu quả lên men rượu. Vì vậy chúng tôi đề cập đến việc nghiên cứu động thái của quá trình đường hoá bằng chế phẩm *A.awomori* và bằng chế phẩm San Super và ảnh hưởng của nó đến quá trình lên men rượu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chế phẩm nấm mốc *A.awamori*
2. Chế phẩm San Super 240L của hãng Novo Đan Mạch
3. Bột sắn
4. Phương pháp xác định các sản phẩm tạo thành trong quá trình đường hoà và lên men bằng sắc kí lỏng cao áp (HPLC). Tiến hành trên máy sắc kí lỏng cao áp Nhật Bản Shimadzu.

Dectector : RID -6A

Column : Aminex 300 x 7,8 mm

Pha động : Bazed on acetonitril

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của hai nguồn amilaza đến đường hoá và rượu hoá

Khi cho lên men hai dịch đường do hai hệ amilaza khác nhau thuỷ phân: một từ chế phẩm *A.awamori* và một từ chế phẩm Sansuper. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của hai nguồn amilaza đến đường hoá và rượu hoá

Các chỉ tiêu	Đường hoá bằng <i>A. awamori</i>			Đường hoá bằng San Super		
	TN1	TN2	Trung bình	TN1	TN2	Trung bình
• Cửa dịch đường						
Nồng độ chất khô (% khối lượng)	15	15	15	15	15	15
Nồng độ chất khử (theo glucoza, g/100ml)	3,00	3,09	3,04	3,12	3,28	3,20
Độ chua của dịch đường (gH ₂ SO ₄ /l)	0,98	0,98	0,98	0,78	0,72	0,75
pH dịch đường	5,09	5,11	5,10	5,18	5,22	5,20
• Cửa dấm chín						
Độ chua của dấm chín (gH ₂ SO ₄ /l)	1,72	1,78	1,75	1,82	1,80	1,81
pH dấm chín	4,65	4,67	4,66	4,59	4,61	4,60
Hàm lượng chất khử sót (g/100ml)	0,18	0,16	0,17	0,17	0,15	0,16
Lượng CO ₂ thoát ra (g/200ml)	12,19	12,15	12,17	12,18	12,22	12,20
Nồng độ rượu trong nấm chín (%V)	8,25	8,23	8,24	8,21	8,19	8,20
Hiệu suất rượu (% so với lý thuyết)	93,65	93,43	93,54	93,20	92,97	93,09

Từ bảng 1 cho thấy:

- Nồng độ chất khử của dịch đường hoá bằng chế phẩm *A. awamori* (3,04 g/ 100ml) thấp hơn dịch đường hoá bằng chế phẩm San Super (3,20 g/100ml). Nhưng khi lên men lại cho hiệu suất rượu chẳng những không kém mà có phần trội hơn (93,54% so với 93,09%)
- Độ chua của dịch đường hoá bằng chế phẩm San Super (0,75g/l) thấp hơn của dịch đường hoá bằng chế phẩm *A. awamori* (0,98g/l) nhưng sau khi lên men, dấm chín lại có độ chua (1,81g/l) tăng lên có 2,41 lần (1,81/0,75), trong khi đó độ chua của dấm chín từ dịch đường hoá bằng chế phẩm *A. awamori* lại chỉ tăng lên có 1,78 lần (1,75/0,98)

Để làm sáng tỏ những điều này, chúng tôi nghiên cứu động thái biến đổi của các đường trong quá trình đường hoá cũng như sự biến đổi của các axit hữu cơ và rượu trong quá trình lên men của hai dịch đường do hai chế trên thuỷ phân tạo ra.

2. Động thái của quá trình đường hoá bằng amilaza của *A. awamori* và bằng amilaza của San Super

Sự biến động hàm lượng của các đường glucoza, maltoza... (được xác định bằng sắc kí lỏng cao áp) ở các thời điểm 30', 24^h, 48^h và 72^h do chế phẩm *A. awamori* và chế phẩm San Super đường hoá chất được trình bày ở bảng 2 và 3.

Bảng 2. Sự biến động của các đường trong quá trình đường hoá bằng *A.awamori*

Thời gian	Thí nghiệm 1					Thí nghiệm 2					Trung bình				
	maltoza		glucoza		Tỉ lệ	maltoza		glucoza		Tỉ lệ	maltoza		glucoza		Tỉ lệ
	g/l	%	g/l	%	<u>maltoza</u> glucoza	g/l	%	g/l	%	<u>maltoza</u> glucoza	g/l	%	g/l	%	<u>maltoza</u> glucoza
30 ^o	5,8851	4,38	18,3361	13,63	0,32	5,5505	4,13	11,832	8,32	0,490	5,7178	4,25	14,7597	10,97	0,39
24 ^h	21,2443	15,80	37,5818	27,94	0,56	25,7547	19,15	49,7608	36,99	0,51	23,4995	17,47	43,6713	32,47	0,54
48 ^h	31,2466	23,23	63,7801	47,42	0,49	27,047	20,11	68,5704	50,99	0,39	29,1468	21,67	66,1752	49,20	0,44
72 ^h	13,91	10,34	101,5	75,47	0,137	23,9	17,77	93,62	69,61	0,25	18,91	14,06	97,56	72,54	0,19

Bảng 3. Sự biến động của các đường trong quá trình đường hoá bằng chế phẩm San Super

Thời gian	Thí nghiệm 1					Thí nghiệm 2					Trung bình				
	maltoza		glucoza		Tỉ lệ	maltoza		glucoza		Tỉ lệ	maltoza		glucoza		Tỉ lệ
	g/l	%	g/l	%	<u>maltoza</u> glucoza	g/l	%	g/l	%	<u>maltoza</u> glucoza	g/l	%	g/l	%	<u>maltoza</u> glucoza
30 ^o	7,3821	5,49	16,922	12,58	0,44	7,6957	5,72	10,3105	12,13	0,47	7,5389	5,61	16,6163	10,36	0,45
24 ^h	30,5718	22,73	56,5817	42,07	0,54	38,8072	25,14	54,4454	40,52	0,62	32,1895	23,93	55,5386	41,29	0,58
48 ^h	26,940	20,03	74,5582	55,43	0,36	26,7103	19,86	72,6792	54,04	0,37	26,8256	19,95	73,6187	54,74	0,36
72 ^h	14,46	12,24	97,55	69,56	0,18	13,867	10,31	96,6	71,83	0,14	15,1635	11,27	95,08	70,69	0,16

Qua bảng 2 và 3 nhận thấy:

- Ở các thời điểm (30^h, 24^h, 48^h và 72^h) dịch đường hoá bằng San super có nồng độ glucoza lớn hơn.
- Sau 72^h tổng lượng đường glucoza + maltoza ở dịch đường hoá bằng chế phẩm *A. awamori* đạt 116,47g/l trong khi đó ở dịch đường hoá bằng chế phẩm San super đạt 110,24g/l

3. Động thái biến đổi của các chất trong quá trình lên men các dịch đường hoá bằng *A. awamori* và San Super

Cho lên men dịch đường đã được đường hoá bằng *A. awamori* và bằng San Super, sau từng thời gian xác định lấy mẫu ra để phân tích bằng sắc kí lỏng cao áp : lượng đường sót còn lại, hàm lượng rượu và axit hữu cơ tạo thành

Sự biến động của đường, rượu êtylic và axit lactic ở các thời điểm 24, 48 và 72 giờ được ghi ở bảng 4,5

Bảng 4. Biến động của các chất khi lên men dịch đường hoá bằng chế phẩm *A. awamori*

Thời gian (h)	Thí nghiệm 1			Thí nghiệm 2			Trung bình		
	glucoza (g/l)	axlactic (g/l)	Rượu (%V)	glucoza (g/l)	axlactic (g/l)	Rượu (%V)	glucoza (g/l)	axlactic (g/l)	Rượu (%V)
24	9,316	4,9194	4,8356	8,8494	4,5057	5,4014	9,08826	4,7125	5,1185
48	5,756	5,656	5,7575	3,1714	56357	74283	4,4637	5,6458	6,5929
72	-	4,9858	8,0847		4,7731	8,29		4,8795	8,1874

Bảng 5. Biến động của các chất khi lên men dịch đường hoá bằng chế phẩm San Super

Thời gian (h)	Thí nghiệm 1			Thí nghiệm 2			Trung bình		
	glucoza (g/l)	axlactic (g/l)	Rượu (%V)	glucoza (g/l)	axlactic (g/l)	Rượu (%V)	glucoza (g/l)	axlactic (g/l)	Rượu (%V)
24	5,6039	8,414	6,6907	8,1695	6,1157	6,6231	6,8867	7,2649	6,4769
48	1,1118	8,9712	8,0229	-	7,4771	8,1904	-	8,2241	8,1067
72	-	8,9602	8,0391	-	6,509	8,1009	-	7,5996	8,07

Kết quả dẫn ra từ bảng 4,5 cho thấy :

- Lượng etanol tạo ra từ dịch bột sắn được đường hoá bằng San Super ở thời điểm 24 và 48 giờ đều cao hơn dịch bột được đường hoá bằng *A. awamori*. Do đó lượng đường sót còn lại ở các thời điểm tương ứng ít hơn.
- Nhưng từ sau 48 giờ cho đến kết thúc lên men, lượng rượu tạo ra dịch bột được đường hoá bằng *A. awamori* lại lớn hơn.

- Đáng chú ý là lượng axit tạo ra trong dấm chín từ dịch đường hoá bằng San Super cao hơn rất nhiều so với dấm chín từ dịch đường hoá bằng *A. awamori*, do đó làm độ chua cao hơn. Như vậy dịch đường hoá bằng *A. awamori*, vì khuẩn lactic hoạt động kém hơn- Điều đó có thể là do các chất đối kháng từ nấm mốc tiết ra và từ môi trường cám ngô đưa vào đã ức chế sự phát triển của vi khuẩn lactic, có thể là những axit béo [3,5]

IV. KẾT LUẬN

Khi sử dụng chế phẩm *A. awamori* để đường hoá bột sắn trong sản xuất rượu có một số ưu thế như: khi lên men rượu axit lactic tạo ra ít và cũng cho hiệu suất rượu cao

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akpan I, Ikenebomenh M.J, Vraith N, Oboekwe C.O., 1998.
Production of ethanol from cassava whey. Acta Biotechnol. 8.1998, p 39-45
2. Bon E. and Weble C., 1993.
Glucoamylase production and nitrogen nutrition in *Aspergillus awamori*.
Applied biochem. Biotechnol. Vol 39140, p349-369
3. Hood A V, 1983
Inhibition of growth of wine lactic acid bacteria by acetaldehyde-bound sulphur dioxide. Ast. Grapegrow. winemaker 232, p34-43
4. Ikenebonmen M.J, Chikwendu A.E., 1990.
Cassava whey treatment with *Aspergillus niger*. Acta Biotechnol, Vol 10, N^o4 p341-348
5. Paraskevopoulos Y, 1982.
Utilisation des enveloppes cellulaires de levure pour la stimulation de la fermentation malolactique- Interpretation de leur mode d'emploi These de Docteur ingénieur Bordeaux

THE CHANGE OF THE SACHARIFICATION OF CASSAVA MASH BY A.AWAMORI AND BY SANSUPER AND THEIR EFFECTS ON ALCOHOL FERMENTATION

Nguyen Thanh Hang

SUMMARY

The use of A. awamori for saccharification of cassava mash in alcohol production has some advantages:

- *Small amount of lactic acid produced*
- *High efficiency of alcohol Production*

1.0.21

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CHỦNG NẤM MEN BIA THÍCH HỢP TRONG LÊN MEN BIA NỒNG ĐỘ CAO

Nguyễn Thu Hà⁽¹⁾, Trương Hương Lan⁽¹⁾,

Phạm Anh Tuấn⁽²⁾, Nguyễn Thu Nga⁽³⁾

(1) : VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

(2) : VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

(3) : VIỆN NGHIÊN CỨU RƯỢU BIA NƯỚC GIẢI KHÁT -
TRƯỜNG ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI

I. MỞ ĐẦU

Lên men bia nồng độ cao là quá trình lên men dịch nước nha có độ đường cô đặc cao hơn bình thường nhằm tạo ra các loại bia có độ cồn theo yêu cầu thị trường. Bia sản xuất theo phương pháp lên men ở nồng độ đường ban đầu cao có thể được pha loãng sau khi lên men bằng cách sử dụng loại nước đặc biệt: nước đã được khử oxy⁽⁷⁾ và từ đó có thể tạo ra nhiều loại bia khác nhau nhằm đáp ứng thị hiếu người tiêu dùng.

Lên men bia nồng độ cao đã được nhiều nhà sản xuất bia trên thế giới nghiên cứu và đã được sản xuất thử nghiệm từ 25 năm qua. Hiện nay đã có một số công trình nghiên cứu tiến hành lên men ở nồng độ cao 14 - 22°P, ở Nam Mỹ phương pháp sản xuất này được dùng nhiều hơn so với phương pháp truyền thống (5,9). Lên men dịch đường ở nồng độ cao làm tăng hiệu quả sử dụng thiết bị nấu, tiết kiệm được nguồn dầu tư cơ bản ban đầu, giảm chi phí về năng lượng, nhân lực lao động, tăng công suất tức thời của nhà máy trong mùa hè mà không cần dầu tư thêm thiết bị nấu, thiết bị lên men, do đó mang lại hiệu quả kinh tế cao cho nhà máy. Đặc biệt công nghệ lên men bia ở nồng độ cao có thể sử dụng nguyên liệu thay thế với tỉ lệ cao hơn do đó làm giảm nguyên liệu nhập ngoại, tiết kiệm ngoại tệ. Ngoài ra lên men bia nồng độ cao còn làm giảm lượng phế thải nên chi phí cho quá trình xử lý chất thải cũng ít hơn điều này cũng rất có ý nghĩa về mặt kinh tế và bảo vệ môi trường. Lên men bia nồng độ cao không những có lợi về mặt kinh tế mà còn tạo cho sản phẩm có những ưu điểm như: nâng cao tính ổn định vật lý, hương bền, vị êm hơn và đa dạng hoá sản phẩm. Mặt khác chất lượng bia luôn luôn ổn định và đồng nhất (5).

Ở Việt Nam công nghệ lên men bia nồng độ cao chưa được nghiên cứu nhiều, mới chỉ dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm và sản xuất nhỏ. Trong đó chủ yếu sử dụng các chủng nấm men thông thường (lên men ở nồng độ dịch đường ban đầu 10 - 12°Bx). Chưa có nhà máy, cơ sở nào có chủng giống nấm men đặc chủng vừa có khả năng lên men mạnh trên môi trường dịch đường nồng độ cao, lại vừa có khả năng kết lắng tốt,

chịu được nồng độ cồn cao, tạo hương và vị đặc trưng. Vai trò của giống nấm men bia đã được biết đến từ lâu, đặc biệt trong lên men nồng độ đường ban đầu cao, tế bào nấm men phải chịu áp suất thẩm thấu lớn. Nồng độ của các chất hoà tan trong dịch đường tạo nên áp suất thẩm thấu của môi trường, gây nên sự chênh lệch áp suất giữa tế bào nấm men và môi trường. Sự chênh lệch này làm cho các chất dinh dưỡng dễ hoà tan và thẩm vào tế bào nấm men qua màng bán thấm, nhưng khi áp suất thẩm thấu vượt quá một giới hạn nào đó sẽ xảy ra hiện tượng khô cạn sinh lý làm cơ nguyên sinh của tế bào. Khi áp suất thẩm thấu tăng, sức sống của nấm men và khả năng lên men của nấm men giảm, do sự tích tụ etanol trong tế bào một cách quá lớn, áp suất thẩm thấu cao cản trở sự khuếch tán của cồn từ tế bào ra môi trường xung quanh, do đó khả năng lên men của nấm men bị thay đổi (5,6). Vấn đề được đặt ra là phải nghiên cứu tuyển chọn được chủng nấm men thích hợp cho công nghệ lên men bia nồng độ cao, tạo ra được sản phẩm giúp tăng công suất tức thời của nhà máy, tiết kiệm về thiết bị máy móc, giảm suất đầu tư, giảm chi phí nhân công...đáp ứng được nhu cầu thị trường tiêu thụ bia ngày càng tăng của người tiêu dùng trong nước. Đây là một hướng đi mới có ý nghĩa trong ngành công nghiệp sản xuất bia ở nước ta và cũng phù hợp với xu hướng phát triển chung của ngành sản xuất bia trên thế giới (8).

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng và nguyên liệu

- Các chủng nấm men bia nổi *Saccharomyces cerevisiae* và men chìm *Sac.carlsbergensis* trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp Thực phẩm.
- Nguyên liệu chính: Malt đại mạch (Pháp, Canada, Úc).
- Các nguyên liệu khác: Gạo tẻ (Việt Nam), Hoa Houblon (Đức, Mỹ), xirô maltoza, xirô glucoza, đường sacaroza.

2. Phương pháp

- Xác định số tế bào sống, chết trong quá trình lên men bằng phương pháp nhuộm xanh metylen (3)
- Xác định số lượng tế bào nảy chồi trên buồng đếm tế bào (4)
- Xác định độ đục của bia bằng phương pháp đo mật độ quang OD (3)
- Xác định hiệu suất lên men cực đại (3)
- Xác định chỉ tiêu vi sinh của nước (4)
- Phân tích axit bằng phương pháp chuẩn độ dung dịch NaOH (4)
- Xác định hàm lượng đạm tổng trong bia thành phẩm bằng phương pháp Kjendal (3)
- Xác định hàm lượng đạm amin trong bia thành phẩm bằng phương pháp Ninhydrin (3)
- Xác định nồng độ chất khô của dịch bằng chiết quang kế (4)

- Xác định lại hàm lượng chất hoà tan còn lại trong bia thành phẩm bằng phương pháp đo tỷ trọng (3)
- Xác định hàm lượng diacetyl trong bia thành phẩm (3)
- Xác định hàm lượng CO₂ trong bia thành phẩm (3)
- Xác định độ bền của bọt (4)
- Xác định màu của bia (4)

III. KẾT QUẢ

1. Xác định chỉ tiêu sinh lý của một số chủng nấm men bia trên các môi trường dịch đường nồng độ cao

Tế bào nấm men sinh trưởng và phát triển tốt ở môi trường có đầy đủ các chất dinh dưỡng, với tỷ lệ các loại đường phù hợp. Trên môi trường dịch đường nồng độ cao, tế bào nấm men phải chịu áp suất thẩm thấu lớn. Từ các chủng nấm men bia trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm, chúng tôi chọn 2 chủng nấm men nổi *Saccharomyces cerevisiae* là H1 và H2 cùng với 3 chủng nấm men chìm *S. carlsbergensis* là H3, H4, H5. Tính chất sinh lý của các chủng nấm men này được thể hiện bằng tỷ lệ tế bào sống trên các môi trường có nồng độ đường khác nhau: 11°Bx, 14°Bx, 16°Bx, 18°Bx, và 20°Bx. Kết quả được trình bày ở bảng 1

Bảng 1. Khả năng phát triển của một số chủng nấm men trên các môi trường dịch đường nồng độ cao

Mẫu Chủng	Tỷ lệ tế bào sống (%)				
	11°Bx	14°Bx	16°Bx	18°Bx	20°Bx
H1	96,0	91,5	88,0	85,0	80,0
H2	94,5	90,0	86,0	82,5	77,0
H3	98,0	98,0	97,0	96,0	94,5
H4	96,0	94,0	91,0	91,0	89,0
H5	93,0	92,	90,	89,0	87,5

Quan sát khả năng sống của tế bào nấm men trong giai đoạn tiềm phát (giờ thứ 36 của quá trình lên men), ở nhiệt độ 20°C chúng tôi nhận thấy tỷ lệ tế bào sống của các chủng nấm men là rất khác nhau trên các môi trường nồng độ đường khác nhau. Ở nồng độ dịch đường 11°Bx, tỷ lệ tế bào sống của các chủng nấm men là 93 - 98%. Khi nồng độ dịch đường tăng lên thì khả năng sống của các chủng nấm men giảm đi trong đó thấp nhất là các chủng men bia nổi H1, giảm từ 96% ở môi trường dịch đường 11°Bx xuống 80% ở nồng độ 20°Bx và tương ứng chủng H2 giảm từ 94,5% xuống 77%. Còn với các chủng nấm men bia chìm H3, H4, H5 thì tỷ lệ tế bào chết giảm ít hơn. Chủng H3 vẫn còn 94,5% tế bào sống ở 20°Bx và hai chủng còn lại (H4, H5) tỷ lệ tế bào sống đều còn xấp xỉ 90%.

2. Xác định hiệu suất lên men trên môi trường dịch đường nồng độ cao

Để khảo sát khả năng lên men của các chủng nấm men bia H1, H2, H3, H4, H5 trên các môi trường dịch đường 11°Bx, 14°Bx, 16°Bx, 18°Bx và 20°Bx, chúng tôi tiến hành xác định hiệu suất lên men cực đại của từng chủng. Kết quả được ở trình bày ở bảng 2

Bảng 2. Hiệu suất lên men của các chủng nấm men bia H1, H2, H3, H4, H5 trên môi trường nồng độ đường cao

Chủng	Mẫu	Hiệu suất lên men (%)				
		11°Bx	14°Bx	16°Bx	18°Bx	20°Bx
H1		82,0	72,0	64,0	55,0	50,0
H2		82,5	60,0	58,0	50,0	40,0
H3		83,5	83,5	82,0	80,0	64,0
H4		81,5	81,0	80,0	79,0	55,0
H5		81,5	76,0	68,0	57,0	48,0

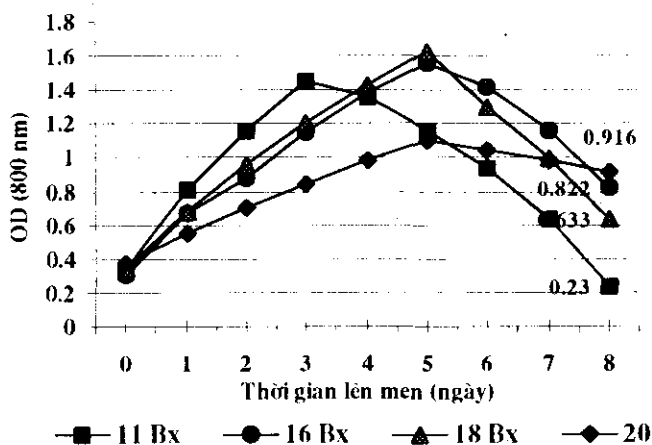
Kết quả ở bảng 2 cho thấy khi nồng độ dịch đường tăng thì hiệu suất lên men giảm, nhưng với giá trị khác nhau. ở nồng độ 11°Bx hiệu suất lên men của tất cả 5 chủng cùng đạt giá trị cao nhất so với các nồng độ khác 81,5 - 83,5%. Các chủng nấm men nổi (H1 và H2) thể hiện khả năng lên men yếu trên môi trường nồng độ đường cao, chỉ đạt 72% và 60% ở nồng độ đường 14°Bx và khi nồng độ của môi trường tăng đến 20°Bx, hai chủng này chỉ lên men được 40 - 50%. Trong 3 chủng nấm men chìm, chỉ có hai chủng H3 và H4 thể hiện khả năng lên men tốt ở môi trường dịch đường nồng độ cao, chủng nấm men H3 đạt hiệu suất lên men tới 83,5%, 82% và 80% ở nồng độ dịch đường từ 14°Bx đến 18°Bx, còn chủng H4 đạt hiệu suất lên men tương ứng là 81%, 80% và 79%. Tuy nhiên khi nồng độ dịch đường cao hơn ở 20°Bx, khả năng lên men của hai chủng này giảm đi một cách rõ rệt, chỉ còn 64% và 55%, và chủng nấm men H5 chỉ đạt 48%.

3. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường dịch đường nồng độ cao đến khả năng kết lắng của tế bào nấm men

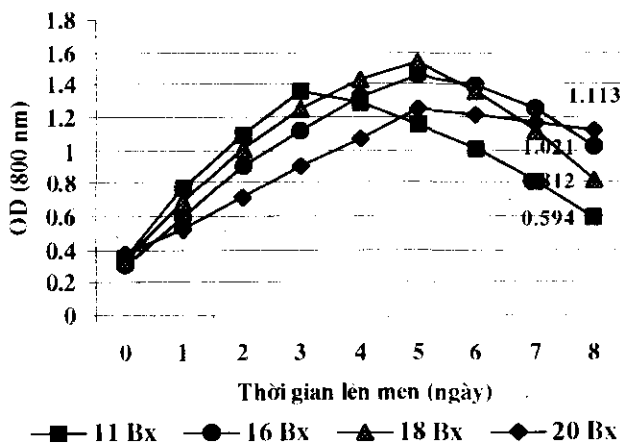
Qua khảo sát hiệu suất lên men của 2 chủng nấm men nổi và 3 chủng nấm men chìm, chúng tôi nhận thấy hai chủng nấm men chìm H3 và H4 thể hiện khả năng lên men tốt trên môi trường dịch đường nồng độ cao, từ 14°Bx đến 18°Bx. Mặc dù khả năng lên men của chúng là tương đương nhau nhưng khả năng kết lắng của hai chủng H3 và H4 lại khác nhau rõ rệt. Trên đồ thị 1 và 2, giá trị OD (optical density) biểu hiện độ đục của dịch lên men ở các nồng độ dịch đường 11°Bx, 16°Bx, 18°Bx và 20°Bx. ở cuối giai đoạn lên men, chỉ số OD càng thấp chứng tỏ dịch lên men càng trong, nấm men kết lắng tốt và ngược lại, chỉ số OD cao chứng tỏ nấm men vẫn còn lơ lửng trong dịch lên men, khả năng kết lắng kém (bảng 3,4).

Bảng 3. Khả năng kết lắng của chủng nấm men H3 trên các môi trường dịch đường nồng độ cao

Thời gian (ngày) Nồng độ đường	OD (800 nm)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
11°Bx	0,342	0,802	1,161	1,450	1,350	1,159	0,930	0,631	0,232
16°Bx	0,303	0,663	0,876	1,141	1,379	1,551	1,412	1,156	0,822
18°Bx	0,334	0,679	0,964	1,209	1,431	1,622	1,303	0,994	0,633
20°Bx	0,372	0,551	0,706	0,846	0,985	1,094	1,041	0,978	0,916



Đồ thị 1. Khả năng kết lắng của chủng nấm men H3 trên các môi trường nồng độ 11°Bx, 16°Bx, 18°Bx và 20°Bx



Đồ thị 2. Khả năng kết lắng của chủng nấm men H4 trên các môi trường nồng độ 11°Bx, 16°Bx, 18°Bx và 20°Bx

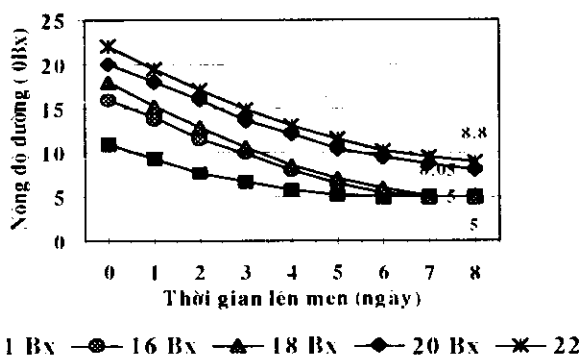
Bảng 4. Khả năng kết lắng của chủng nấm men H4 trên các môi trường nồng độ cao

Thời gian (ngày) Nồng độ đường	OD (800 nm)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
11°Bx	0,345	0,770	1,088	1,360	1,280	1,155	1,013	0,801	0,594
16°Bx	0,302	0,594	0,896	1,120	1,320	1,457	1,396	1,247	1,021
18°Bx	0,335	0,680	1,010	1,247	1,432	1,532	1,360	1,120	0,812
20°Bx	0,370	0,511	0,712	0,904	1,072	1,247	1,214	1,160	1,113

Qua bảng 3, 4 và hai đồ thị 1, 2 chúng tôi nhận thấy, chủng nấm men H4 đã bị mất khả năng kết lắng trên môi trường dịch đường nồng độ cao. Điều đó có nghĩa là một phần tế bào trong tổng số tế bào nấm men của chủng H4 tồn tại ở trạng thái lơ lửng, không kết lắng được. Do khi lên men nồng độ đường cao, áp suất thẩm thấu của dịch đường và hàm lượng cồn sinh ra trong quá trình lên men lớn, do đó tỷ lệ tế bào chết nhiều hơn, khả năng kết lắng của nấm men chậm hơn (9). Trong khi đó, chủng nấm men H3 vẫn duy trì được tính chất kết lắng tốt của mình cả ở cả hai nồng độ 16°Bx và 18°Bx, chứng tỏ chủng H3 có mang gen chứa đặc tính di truyền là khả năng kết lắng tốt, chống chịu được môi trường có áp suất thẩm thấu lớn và hàm lượng cồn cao. Độ kết lắng tốt đảm bảo cho dịch bia trong, dễ lọc, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sản xuất. Do vậy, chúng tôi sử dụng chủng giống nấm men H3 trong quá trình công nghệ lên men bia nồng độ cao.

4. Nghiên cứu xác định nồng độ dịch đường tối ưu cho lên men nồng độ cao

Để xác định môi trường dịch đường nồng độ cao thích hợp nhất đối với sự phát triển của chủng nấm men H3, chúng tôi khảo sát sự thay đổi độ đường trong quá trình lên men của chủng H3 trên các môi trường 11°Bx, 16°Bx, 18°Bx, 20°Bx và 22°Bx. Kết quả được trình bày trong đồ thị 3.



Đồ thị 3. Khả năng tiêu thụ đường của chủng nấm men H3 trên các môi trường nồng độ 11°Bx, 16°Bx, 18°Bx, 20°Bx và 22°Bx

Kết quả trên chỉ ra rằng, trong cùng một điều kiện khả năng lên men của chủng nấm men H3 là rất khác nhau ở các nồng độ dịch đường khác nhau. ở môi trường có nồng độ đường 11°Bx quá trình lên men diễn ra mạnh mẽ, thời gian lên men chính kết thúc sau 6 ngày. Không những thế, chủng H3 cũng thể hiện khả năng lên men tốt trên môi trường có nồng độ đường cao 16°Bx và 18°Bx. Quá trình lên men diễn ra triệt để và kết thúc sau 6,5 ngày và 7 ngày. Còn trên môi trường có nồng độ đường cao hơn, 20°Bx và 22°Bx, do áp suất thẩm thấu của môi trường lớn, quá trình sinh sản của tế bào nấm men bị hạn chế, tốc độ lên men bị chậm lại, đến ngày cuối cùng của quá trình lên men (ngày thứ 8) nồng độ chất khô của môi trường 20°Bx và 22°Bx vẫn còn 8,05°Bx và 8,8°Bx. Trong khi đó quá trình lên men của môi trường dịch đường 18°Bx chỉ diễn ra trong 7 ngày tức là chậm hơn so với mẫu đối chứng (11°Bx) 1 ngày. Điều đó chứng tỏ môi trường dịch đường 18°Bx là môi trường có nồng độ đường cao thích hợp nhất đối với chủng nấm men bia H3.

5. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến quá trình lên men dịch đường nồng độ cao

Như trên đã trình bày, chủng nấm men H3 có khả năng phát triển tốt nhất trên môi trường nồng độ đường 18°Bx. Tuy nhiên, do nồng độ dịch đường cao, nấm men phải chịu áp suất thẩm thấu của môi trường lớn hơn so với lên men bình thường nên sẽ có những ảnh hưởng nhất định đến quá trình sinh trưởng, phát triển và do vậy, quá trình lên men sẽ bị kéo dài nếu như chúng ta không tăng tỷ lệ men giống ban đầu. Để xác định tỷ lệ nấm men cần thiết cho quá trình lên men, chúng tôi tiến hành lên men với các tỷ lệ men giống khác nhau từ 20×10^6 tế bào/ml đến 35×10^6 tế bào/ml. Bảng 5 trình bày các kết quả thu được

Bảng 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống nấm men đến quá trình lên men của chủng H3 trên môi trường 18°Bx

Tỷ lệ men giống (tế bào/ml)	Thời gian lên men (ngày)	Nồng độ chất khô (°Bx)							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
20 x 10 ⁶	18,0	16,0	13,5	11,5	9,65	7,85	6,7	5,75	5,15
25 x 10 ⁶	18,0	15,5	12,8	10,5	8,7	7,0	5,85	5,05	5,0
30 x 10 ⁶	18,0	15,2	12,3	9,75	7,6	6,15	5,1	5,0	5,0
35 x 10 ⁶	18,0	14,6	11,4	8,85	6,55	5,3	5,0	5,0	5,0

Qua bảng 5 chúng tôi nhận thấy, khi hàm lượng men giống tăng lên thì tốc độ lên men nhanh hơn, thời gian lên men được rút ngắn lại. Khi sử dụng lượng men giống tương đương với quá trình lên men dịch đường 11°Bx (20×10^6 tế bào/ml), thời gian lên men của chủng H3 là 8 ngày, ở các tỷ lệ men giống cao hơn (25×10^6 tế bào/ml và 30×10^6 tế bào/ml) thời gian lên men là 7 ngày và 6 ngày. Tỷ lệ cao men giống đảm bảo tính

an toàn cho quá trình lên men, tránh sự nhiễm tạp của các vi sinh vật khác vào môi trường giàu dinh dưỡng này. Điều này phù hợp với tác giả Stewart (7) khi ông cho rằng trong cùng điều kiện như nhau, nếu mật độ men giống cấy ban đầu lớn thì số tế bào nảy chồi ít hơn, cường độ trao đổi chất của tế bào thấp do đó các sản phẩm bậc hai như aldehyt, rượu bậc cao đặc biệt là diacetyl giảm đáng kể so với khi lên men với tỷ lệ men giống thấp. Tuy nhiên ở tỷ lệ men giống 35×10^6 tế bào/ml, do lượng men giống sử dụng quá cao cho nên đã dẫn đến sự phát triển ô ạt của tế bào nấm men trong giai đoạn đầu của quá trình lên men, làm cho bia nhạt đi, đồng thời thời gian lên men của môi trường có tỷ lệ men giống 35×10^6 tế bào/ml cũng không giảm nhiều (5,5 ngày) so với môi trường có tỷ lệ men giống 30×10^6 tế bào/ml. Qua đó có thể thấy rằng tỷ lệ men giống cần thiết cho quá trình lên men trên môi trường dịch đường 18°Bx của chủng H3 là tỷ lệ 30×10^6 tế bào/ml.

6. Đánh giá chất lượng sản phẩm

Trên cơ sở xác định các điều kiện tối ưu cho quá trình lên men trên môi trường dịch đường nồng độ cao của chủng nấm men bia H3 chúng tôi đã tiến hành lên men ở qui mô thực nghiệm 4000 lít. Bia nồng độ cao thu được sẽ pha loãng về nồng độ tương đương với bia nồng độ thường (11°Bx), đem phân tích các chỉ tiêu hoá học và đánh giá cảm quan. Kết quả trình bày ở bảng 6

Bảng 6. Các chỉ tiêu hoá học và đánh giá cảm quan của bia lên men với nồng độ đường ban đầu cao

Các chỉ tiêu	Đơn vị	Bia lên men với nồng độ đường cao	Bia lên men nồng độ đường bình thường
Nồng độ chất khô biểu kiến	$^\circ\text{Bx}$	5,00	5,00
Hàm lượng cồn etylic	% V/V	4,20	4,20
Axit	số ml NaOH 1N/100 ml bia	1,16	1,35
Đạm tổng	mg/l	480,50	485,00
Đạm amin	mg/l	62,15	67,20
Diacetyl	mg/l	0,054	0,048
CO_2	% thể tích	0,30	0,28
Điểm đánh giá cảm quan*		4,20	4,10

* Rất ngon : 5; Ngon : 4; Bình thường : 3; Không ngon : 2

Qua bảng chúng tôi nhận thấy bia lên men từ nồng độ dịch đường ban đầu cao 18°Bx bằng chủng giống H3 đã phân lập, tuyển chọn được, sau khi pha loãng bia về nồng độ chất khô (5°Bx) tương đương với mẫu đối chứng thì các chỉ tiêu phân tích của bia nồng độ cao đạt tương đối tốt: hàm lượng đạm tổng, đạm amin đạt xấp xỉ với mẫu

đối chứng 480,5 và 62,15mg/l, hàm lượng diacetyl cao hơn một chút (0,054 mg/l) nhưng vẫn nhỏ hơn rất nhiều so với giới hạn cho phép: các chỉ tiêu khác như độ axit của mẫu bia nồng độ cao là thấp hơn đối chứng (1,16 và 1,35ml NaOH 1N/100ml bia). Ngoài ra bia nồng độ cao được đánh giá là có vị hấp dẫn hơn. Điểm đánh giá cảm quan của bia nồng độ cao được đánh giá tương đương với mẫu đối chứng. Trên cơ sở đó chúng tôi nhận thấy có thể đưa chủng H3 áp dụng vào sản xuất đại trà trong công nghệ lên men bia nồng độ cao.

IV. KẾT LUẬN

- Đã phân lập, tuyển chọn được chủng nấm men H3 đạt được các chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá, hiệu suất lên men, khả năng kết lắng tốt trên môi trường dịch đường nồng độ cao.
- Đã xác định được nồng độ dịch đường tối ưu cho lên men nồng độ cao của chủng H3 là 18°Bx
- Đã xác định được tỷ lệ men giống cần thiết cho quá trình lên men trên môi trường dịch đường 18°Bx của chủng H3 là 30×10^6 tế bào/ml
- Đã ứng dụng chủng nấm men H3 vào sản xuất thử nghiệm ở qui mô 4000 lít, sản phẩm thu được được đánh giá có chất lượng tốt tương đương với mẫu đối chứng (bia lên men theo phương pháp truyền thống từ dịch đường 11°Bx). Từ đó mở ra triển vọng có thể sản xuất bia theo phương pháp lên men nồng độ cao nhằm nâng cao tỷ lệ nguyên liệu thay thế, tăng công suất của nhà máy trong mùa hè mà không cần đầu tư thêm thiết bị, giảm chi phí về năng lượng, nhân lực lao động đem lại hiệu quả kinh tế trong sản xuất bia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Đình Hoà, 1998.

Công nghệ Malt và Bia. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. 3, 403 - 412.

2. Nguyễn Trọng Căn, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang, Trần Thị Luyến, 1998.

Công nghệ enzym. Nhà xuất bản Nông Nghiệp TP Hồ Chí Minh

3. Analytical - E.B. C, 1987.

AOAC Official Method of analysis, 1984. 195, 196.

4. Bruce W. Hackstaff, 1978.

Various Aspects of High Gravity Brewing. MBAA TECHNICAL QATERLY, vol 15, No.1.

5. Canales, A.M., 1981.

Brewing science. E.d.J.R.A.Pollock, Academic, New York, London. 233-246.

6. E. Pfisterer, G.G. Stewart, June 1976.

High gravity brewing. The Brewers Digest.

7. Nguyễn Văn Việt, 1999.

An Overview of Beer Production in Vietnam. Technical Symposium, Hanoi
Daewoo Hotel

8. Raja Karandikar, 04/ 05/ 1999.

High Gravity Brewing. Seminar on Modern Methods and Practices for Beer
Production, Meritus Westlake Hotel, Hanoi.

1.0.22

ẢNH HƯỞNG CỦA HÀM LƯỢNG ĐẠM AMIN TRONG DỊCH ĐƯỜNG ĐẾN HỆ SỐ SINH SẢN RIÊNG CỦA NẤM MEN BIA

Hồ Phú Hà, Hoàng Đình Hoà, Nguyễn Thị Hiền

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ THỰC PHẨM-

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

I. MỞ ĐẦU

Trong công nghệ sản xuất bia, việc đánh giá một chủng giống nấm men là rất quan trọng, có vai trò quyết định đối với chất lượng sản phẩm về mặt hoá học cũng như cảm quan. Đại lượng đặc trưng để đánh giá chất lượng sinh học của chúng là hệ số sinh sản riêng (μ). Đại lượng này phụ thuộc rất nhiều yếu tố : hàm lượng đạm amin, nhiệt độ lên men, lượng nấm men gieo cấy ban đầu, cường độ khuấy đảo, nồng độ đường ban đầu, ... Trong công trình này chúng tôi quan tâm đến mô hình toán học $\mu=f(s)$ biểu diễn quan hệ giữa hệ số sinh sản riêng của nấm men và nồng độ dịch đường phụ thuộc vào hàm lượng đạm amin trong dịch đường.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

- *Dịch đường*

Được chế biến từ malt đại mạch của Pháp. Đường hoá được thực hiện theo chế độ nhiệt 52°C (30 phút), 65°C (30 phút), 75°C (30 phút).

- *Nấm men*

Nấm men sử dụng trong thí nghiệm là *Saccharomyces carlsbergensis*, chủng của Đan mạch, hiện đang được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam.

- *Dịch tự phân nấm men*

Được chế biến ở điều kiện phòng thí nghiệm: Nấm men bia rửa sạch, thuỷ phân ở nhiệt độ 50-55°C thời gian 3 ngày sau đó lọc và xử lý dịch chiết.

2. Phương pháp

- *Các phương pháp xác định*

- Độ ẩm của men sữa bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi
- Nồng độ dịch đường bằng phương pháp Picromet
- Hàm lượng đạm amin bằng phương pháp chuẩn độ formol

+ Chuẩn bị mẫu và tiến hành thực nghiệm

- Dịch đường lên men được chuẩn bị theo sáu mẫu: Mẫu I, II, III cố định nồng độ đường là 100 ± 2 g/l, hàm lượng đạm amin lần lượt là 250 ± 5 mg/l, 300 ± 5 mg/l, 350 ± 5 mg/l.
- Mẫu IV, V, VI cố định nồng độ đường là 120 ± 2 g/l, hàm lượng đạm amin lần lượt là 250 ± 5 mg/l, 300 ± 5 mg/l, 350 ± 5 mg/l.
- Tiến hành lên men ở nhiệt độ $8-10^\circ\text{C}$ với lượng nấm men gieo cấy ban đầu 10 g/l ($W=87\%$).
- Trong thời gian lên men, theo định kỳ 8 giờ, xác định nồng độ đường sót
- Kết thúc lên men khi tốc độ giảm nồng độ đường là không đáng kể. Hạ nhiệt độ xuống $0-2^\circ\text{C}$ để cho nấm men kết lắng.
- Thu sinh khối nấm men, sấy đến khối lượng không đổi; Xác định lượng sinh khối thu được và hệ số kinh tế Y.

• Phương pháp tính toán

Dựa trên kết quả thực nghiệm thu được, xác định các thông số của mô hình Monod và Endrew nhằm mô tả quan hệ $\mu = f(S)$

- Tính theo Mô hình Monod

Mô hình Monod có dạng tổng quát:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

μ - hệ số sinh sản riêng (1/h)

S - Nồng độ cơ chất tại thời điểm lấy mẫu t, g/l

$\mu_{\max}$ - hệ số sinh sản riêng cực đại

K_s - hằng số, phụ thuộc cơ chất.

Mặt khác
$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (2)$$

X - Nồng độ sinh khối khô tuyệt đối g/l.

Thay vào (1), lấy tích phân với điều kiện ban đầu $X(0) = X_0$, $S(0) = S_0$ và từ đó biểu diễn t qua các tham số còn lại, với lưu ý rằng

$$X = X_0 + Y(S_0 - S)$$

ta được
$$t = \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \left\{ \frac{Y \cdot K_s}{X_{\max}} \cdot \ln \frac{Y \cdot S_0}{X_{\max} - X} + \left(1 + \frac{Y \cdot K_s}{X_{\max}}\right) \cdot \ln \frac{X_0}{X_0} \right\} \quad (3)$$

Trong đó $X_{\max} = X_0 + Y \cdot S_0$

Đặt
$$x_1 = \ln \frac{S_0}{S} \quad x_2 = \ln \frac{X_{\max} - Y \cdot S}{X_0}$$

$$a_1 = \frac{Y \cdot K_s}{\mu_{\max} \cdot X_{\max}} \quad a_2 = \frac{X_{\max} + Y \cdot K_s}{\mu_{\max} \cdot X_{\max}}$$

từ (3) ta thu được phương trình tuyến tính (dạng tường minh của mô hình)

$$t = a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 \quad (4)$$

ở đây Y là hệ số kinh tế, cho biết bao nhiêu phần cơ chất mà nấm men đã tiêu hao để tăng trưởng một đơn vị sinh khối. Trong một môi trường nhất định, đối với một loại nấm men nhất định Y là đại lượng không đổi. Y được xác định bằng thực nghiệm và tính theo công thức:

- Tính theo mô hình Endrew

$$Y = \frac{dX}{dS}$$

Mô hình này có tính đến sự ức chế của cơ chất. Dạng tổng quát của mô hình là:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S + S^2 / K_i} \quad (5)$$

K_i - hằng số tính đến sự ức chế của cơ chất

Tương tự như trên ta thay $\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$ vào (5) và lấy tích phân hai vế với điều kiện ban đầu như mô hình Monod, sau đó biểu diễn t theo các tham số khác, ta được:

$$t = \frac{Y}{\mu_{\max}} \cdot \left\{ \frac{K_s}{X_{\max}} \ln \frac{S_0}{S} + \left(\frac{K_s}{X_{\max}} + \frac{1}{Y} + \frac{X_{\max}}{Y^2 / K_i} \right) \ln \frac{X_{\max} - Y.S}{X_0} + \frac{S_0 - S}{Y.K_i} \right\} \quad (6)$$

$$\text{Đặt} \quad x_1 = \ln \frac{S_0}{S}; \quad x_2 = \ln \frac{X_{\max} - Y.S}{X_0}; \quad x_3 = S_0 - S$$

$$a_1 = \frac{Y}{\mu_{\max}} \cdot \frac{K_s}{X_{\max}}; \quad a_2 = \left(\frac{K_s}{X_{\max}} + \frac{1}{Y} + \frac{X_{\max}}{Y^2 / K_i} \right) \cdot \frac{Y}{\mu_{\max}}; \quad a_3 = \frac{1}{\mu_{\max} \cdot K_i}$$

Ta được phương trình tuyến tính (dạng tường minh)

$$t = a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 \quad (7)$$

- Các bước xác định thông số của hai mô hình

- + Từ các thí nghiệm, thu được các số liệu S , t , X_0 , Y
- + Tính x_1 , x_2 , x_3
- + Từ các phương trình tuyến tính (4) và (7) tính a_1 , a_2 , a_3 theo phương pháp bình phương cực tiểu
- + Tính các thông số $\mu_{\max}$, K_s đối với mô hình Monod và $\mu_{\max}$, K_i , K_s đối với mô hình Endrew, từ đây thu được các mô hình thực nghiệm dạng tổng quát (dạng vi phân)

Quá trình tính toán thực hiện bằng chương trình được lập theo ngôn ngữ Pascal.

III. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

1. Kết quả thực nghiệm

Sự biến đổi của nồng độ đường của các mẫu trong thời gian lên men được xác định 8 giờ một lần, kết quả được biểu diễn ở bảng 1

Bảng 1. Sự tiêu hao đường theo thời gian lên men

Thời gian, h	Nồng độ cơ chất, g/l					
	Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III	Mẫu IV	Mẫu V	Mẫu VI
0	100	100	100	120	120	120
8	97	97	97	115	112	111
16	92	92	91	99	93	93
24	86	85	85	92	84	85
32	74	77	76	82	76	74
40	65	60	60	71	68	66
48	59	48	49	67	62	60
56	51	45	44	59	57	57
64	45	42	41	56	53	54
72	-	-	-	52	51	51
80	-	-	-	50	50	50

Sau khi lên men, sinh khối nấm men được tách khỏi dịch, rửa sạch, ly tâm, sau đó đem sấy, cân và tính hệ số kinh tế. Kết quả thu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Nồng độ sinh khối và hệ số kinh tế của các mẫu

Mẫu	I	II	III	IV	V	VI
Nồng độ nấm men ban đầu (tính theo chất khô) X_0 , g/l	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
Nồng độ nấm men thu được (tính theo chất khô) X , g/l	3.18	3.99	4.654	3.76	4.24	4.98
Hệ số kinh tế Y	0.0375	0.0472	0.0568	0.0325	0.042	0.0526

2. Kết quả tính toán

Từ những số liệu thu được ở bảng 1 và bảng 2 theo trình tự đã dẫn, ta tiến hành tính x_1 , x_2 , x_3 cho từng mẫu thí nghiệm, kết quả thu được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Các biến x_1, x_2, x_3

t, h	Mẫu I			Mẫu II			Mẫu III		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0
8	0,030	0,083	3,0	0,030	0,103	3,0	0,030	0,123	3,0
16	0,083	0,208	8,0	0,083	0,255	8,0	0,094	0,331	9,0
24	0,150	0,339	14,0	0,162	0,434	15,0	0,162	0,504	15,0
32	0,301	0,560	26,0	0,261	0,607	23,0	0,274	0,717	24,0
40	0,430	0,699	35,0	0,510	0,897	40,0	0,510	1,010	40,0
48	0,527	0,782	41,0	0,733	1,060	52,0	0,713	1,171	51,0
56	0,673	0,882	49,0	0,798	1,097	55,0	0,820	1,237	56,0
64	0,798	0,951	55,0	0,867	1,133	58,0	0,891	1,274	59,0
h	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0
8	0,042	0,117	5,0	0,068	0,229	8,0	0,077	0,310	9,0
16	0,192	0,421	21,0	0,254	0,627	27,0	0,254	0,738	27,0
24	0,265	0,530	28,0	0,356	0,771	36,0	0,344	0,882	35,0
32	0,380	0,667	38,0	0,456	0,884	44,0	0,483	1,051	46,0
40	0,524	0,799	49,0	0,567	0,985	52,0	0,597	1,158	54,0
48	0,582	0,843	53,0	0,660	1,0556	58,0	0,693	1,231	60,0
56	0,709	0,926	61,0	0,744	1,110	63,0	0,744	1,266	63,0
64	0,762	0,955	64,0	0,817	1,152	67,0	0,798	1,300	66,0
72	0,836	0,993	68,0	0,855	1,172	69,0	0,855	1,332	69,0
80	0,875	1,011	70,0	0,875	1,182	70,0	0,875	1,343	70,0

Dựa trên phương pháp bình phương cực tiểu ta tính được a_1, a_2, a_3 và các thông số của hai dạng mô hình. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Các thông số của mô hình

Các thông số		Mẫu I	Mẫu II	Mẫu III	Mẫu IV	Mẫu V	Mẫu VI
Mô hình Monod	a_1	14,24	3,95	11,07	113,47	114,79	123,00
	a_2	53,00	47,97	38,27	-17,70	-23,33	-27,25
	$\mu_{\max}$	0,0258	0,0227	0,0368	-0,00762	-0,007	-0,0066
	K_s	49,40	11,43	50,00	-138,40	-125,00	-118,00
Mô hình Endrew	a_1	250,22	314,10	241,88	377,13	339,78	422,62
	a_2	203,54	201,14	133,16	156,45	99,79	102,24
	a_3	-5,98	-7,55	-5,47	-5,73	-4,854	-6,18
	K_i	-126,70	-112,60	-103,00	-121,4	-101,51	-92,86
	$\mu_{\max}$	0,00132	0,00118	0,00177	0,00144	0,00203	0,00174
	K_s	44,40	47,10	52,70	86,76	104,00	106,60

Bảng 5. Các mô hình thực nghiệm thu được từ mô hình Monod và mô hình Endrew

Mẫu	Mô hình Monod		Mô hình Endrew	
	Dạng tuyến tính	Dạng phương trình vi phân	Dạng tuyến tính	Dạng phương trình vi phân
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Mẫu I	$t = 14,24x_1 + 53,00x_2$	$\mu = 0,0258 \frac{S}{49,40 + S}$	$t = 250,22x_1 + 203,54x_2 - 5,98x_3$	$\mu = 0,00132 \frac{S}{44,40 + S - 0,0079S^2}$
Mẫu II	$t = 3,95x_1 + 47,97x_2$	$\mu = 0,0227 \frac{S}{11,43 + S}$	$t = 314,10x_1 + 201,14x_2 - 7,55x_3$	$\mu = 0,0012 \frac{S}{47,10 + S - 0,0089S^2}$
Mẫu III	$t = 11,07x_1 + 38,27x_2$	$\mu = 0,0368 \frac{S}{50,00 + S}$	$t = 241,88x_1 + 133,16x_2 - 4,85x_3$	$\mu = 0,0018 \frac{S}{52,70 + S - 0,0097S^2}$
Mẫu IV			$t = 377,13x_1 + 156,45x_2 - 5,73x_3$	$\mu = 0,00144 \frac{S}{86,76 + S - 0,0082S^2}$
Mẫu V			$t = 339,78x_1 + 102,24x_2 - 6,18x_3$	$\mu = 0,00203 \frac{S}{104,4 + S - 0,0099S^2}$
Mẫu VI			$t = 422,62x_1 + 102,24x_2 - 6,18x_3$	$\mu = 0,00174 \frac{S}{106,6 + S - 0,0107S^2}$

Kết quả tính toán cho thấy, với các mẫu IV, V, VI (tức là các mẫu có nồng độ đường ban đầu là 120 g/l) theo mô hình Monod thì $\mu_{\max} < 0$, như vậy mô hình dạng này không phản ánh được động thái của quá trình phát triển nấm men ở các mẫu đó.

Với nồng độ dịch đường ban đầu như nhau, theo chiều tăng của hàm lượng đạm amin (từ mẫu I đến mẫu III đối với nồng độ 100 g/l và từ mẫu IV đến mẫu VI đối với nồng độ 120 g/l), trị số tuyệt đối của K_i trong mô hình Endrew càng giảm, và do đó giá trị của μ tăng.

Các mô hình dạng tuyến tính và phương trình vi phân của các mẫu được đưa ra ở bảng 5.

III. KẾT LUẬN

Đã xác định mô hình thực nghiệm theo mô hình Monod và Endrew biểu diễn quan hệ giữa hệ số sinh sản riêng và hàm lượng đạm amin thông qua hàm lượng đường của cơ chất bị tiêu hao.

Ở nồng độ cơ chất ban đầu cao, mô hình Endrew thể hiện độ chính xác cao hơn so với mô hình Monod.

Mô hình thực nghiệm theo Endrew cho thấy khi nồng độ đạm amin càng cao, sự ức chế của nồng độ cơ chất đến sinh trưởng và phát triển của nấm men càng giảm, và do đó μ tăng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Hồ Phú Hà, 1996.*

Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến tốc độ sinh sản riêng của nấm men bia. Luận án Thạc sỹ KHKT. Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

2. *Hoàng Đình Hoà, 1984.*

Mô hình hoá và tối ưu hoá quá trình lên men trong sản xuất bia. Luận án PTS KHKT-Plovdiv - Bungari.

3. *Nguyễn Thị Hiền, 1993.*

Những thí nghiệm cần thiết cho công nghiệp sản xuất rượu, bia, nước giải khát. Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

4. *Manakov, Pobedinski, 1990.*

Teoreticheski osnovi technology microbiologytcheskich proizvodstv. VO "Agronomizdat". Moscva.

INFLUENCE OF AMIN CONTENT MOLAHES SPECIFIC PROPOGATIN COEFFCIENTE OF YEASTS

Ho Phu Ha, Hoang Dinh Hoa, Nguyen Thi Hien

SUMMARY

Experimental models in accordance with Monod and Endrew models have shown the correlation between the specific growth rate and the amount of aminoacids. This correlation is founded through the determination of the concentration of the substrates. It is founded from the model that the coefficient μ increases if there is an increase in aminoacids content.

1.0.23

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG LÊN MEN CỦA BÁNH MEN RƯỢU ĐƯỢC LÀM TỪ CÁC VI SINH VẬT THUẦN CHỦNG PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Mạnh Tuấn⁽¹⁾, Nguyễn Thế Trang⁽²⁾,

Nguyễn Thị Hiền⁽³⁾, Lương Đức Phẩm⁽²⁾

(1): VIỆN NGHIÊN CỨU RƯỢU- BIA- NƯỚC GIẢI KHÁT

(2): BỘ MÔN CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM SINH HỌC,

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI.

(3): PHÒNG CÔNG NGHỆ LÊN MEN, VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Ở nước ta, việc dùng bánh men thuốc bắc (MTB) có từ 6÷20 vị thuốc bắc được phổ biến khắp toàn quốc và bánh men đã trở thành một nguyên liệu không thể thiếu được đối với nghề sản xuất rượu truyền thống. Về nguyên tắc, bánh men được làm từ bột gạo (có chứa tinh bột) trộn với men giống. Riêng bánh MTB thì làm từ bột gạo trộn với thuốc bắc và men giống. Hiện nay, các loại bánh MTB hiện đang bán trên thị trường có chất lượng men không ổn định do có nhiều vi sinh vật nhiễm tạp, hiệu suất lên men không cao, rượu cất được còn nhiều tạp chất. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là:

- Tiến hành đánh giá các chủng nấm mốc *Aspergillus awamori*, nấm men *Endomycopsis fibuliger* về khả năng đường hóa tinh bột và chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* về khả năng lên men rượu- đây là các chủng vi sinh vật thuộc bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ lên men- Viện Công nghệ Sinh học. Sau khi được tuyển chọn, các chủng nấm mốc, nấm men thuần chủng này sẽ được nuôi trên các môi trường thích hợp cho các enzym có hoạt tính mạnh.
- Tiến hành nghiên cứu việc đưa các chủng vi sinh vật trên vào sản xuất bánh men rượu với các công đoạn giống như MTB nhưng không sử dụng thuốc bắc nhằm có một loại bánh men có chất lượng cao: hiệu suất lên men rượu, chất lượng rượu ổn định và ít tạp chất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

- Chủng mốc *A. awamori* 9901, *S. cerevisiae* 9902 và *E. fibuliger* 9933 trong Bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ lên men - Viện Công nghệ Sinh học
- Môi trường nhân giống nấm men: Hansen-cao nấm men (g/l).[5]

- Môi trường lên men (g/l): Glucoza 200; KH_2PO_4 1,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,5; Cao men 5, pH= 6, nước cất.[5]
- Môi trường nhân giống nấm mốc: Cám gạo: ngô = 5,8; Trấu 11%; Nitơ vô cơ 0,37%, độ ẩm 55÷58%.
- Gạo CR 203 và trấu được mua ở chợ Bưởi - Hà Nội.

2. Phương pháp

- Do vòng thủy phân tinh bột trên các môi trường thạch:
 - + Czapeck-Dox để sơ bộ tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng đường hóa cao[5].
 - + Hansen- tinh bột để xác định khả năng đường hóa của chủng nấm men *E. fibuliger* được đưa vào bánh men rượu.
- Xác định hoạt lực glucoamilaza theo phương pháp vi lượng của V.Y.Rodzevich, O.P.Korenbiakina để chọn thời điểm nấm mốc có khả năng sinh bào tử đồng đều, có hoạt lực amilaza cao.
- Sơ bộ tuyển chọn chủng nấm men có khả năng lên men tốt bằng phương pháp bình "Elnhorn- Smith".
- Xác định mật độ tế bào bằng phương pháp dùng buồng đếm Thoma.
- Xác định độ ẩm của bột gạo sau nghiền bằng phương pháp sấy tới khối lượng không đổi.
- Phương pháp tạo bánh men rượu: Gạo tẻ sau khi ngâm nước, vớt để ráo nước rồi xay bột mịn được đem trộn đều với nước, nấm mốc giống, nấm men giống theo tỷ lệ thích hợp và tạo bánh men, bánh nhô này được rải ra khay đã được phủ bằng một lớp trấu. ủ bánh men ở 30°C, thời gian khoảng 24-30 giờ, sau đó đem sấy ở nhiệt độ khoảng 35°C trong thời gian 10÷15 giờ.
- Xác định khả năng lên men của bánh men rượu bằng phương pháp lên men truyền thống và chưng cất đơn giản- tính theo lượng rượu thành phẩm 40%V thu được từ 1kg gạo.
- Tiến hành phân tích cảm quan chất lượng rượu thành phẩm theo TCVN 3217-79.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trên cơ sở các chủng vi sinh vật đã được phân lập từ các MTB, tiến hành đánh giá các chủng có hoạt tính cao theo yêu cầu công nghệ dùng trong nghiên cứu: 4 chủng nấm mốc *A. awamori*; 5 chủng nấm men rượu (trong đó có 1 chủng giả nấm men).

1. Nấm mốc

1. Sơ bộ tuyển chọn chủng có vòng phân giải tinh bột cao

Trên môi trường thạch Czapeck-Dox, tiến hành cấy chấm điểm 4 chủng nấm mốc *A. awamori*, nuôi ở $t^0 = 30^0\text{C}$ trong 36 giờ, giở thuốc lugol để xác định vòng thủy phân tinh bột của các chủng nấm mốc. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Khả năng đường hóa tinh bột của các chủng *A. awamori*

Chủng mốc	Đường kính trong (d-mm)	Đường kính ngoài (D-mm)	D/d
<i>A. awamori</i> 9901	17	26	1,5294
<i>A. awamori</i> 9903	19	28	1,4736
<i>A. awamori</i> 9908	15	22	1,4667
<i>A. awamori</i> 9909	17	24	1,4117

Từ bảng 1 ta thấy, chủng *A. awamori* 9901 có đường kính vòng thủy phân tinh bột là lớn nhất ($D/d=1,5294$) → chọn chủng này để nhân giống đưa vào bánh men.

2. Xác định khả năng sinh glucoamilaza của nấm mốc

Tiến hành xác định hoạt lực glucoamilaza sinh ra bởi chủng *A. awamori* 9901 theo phương pháp đã đề cập ở mục II.2: Cấy chủng *A. awamori* 9901 trên môi trường cám ngô và nuôi trong điều kiện nhiệt độ 30^0C . Trong khoảng 36÷60 giờ, từ giờ thứ 36, cách 4 giờ lấy mẫu một lần, sấy ở 40^0C tới độ ẩm 10÷12% sau đó đem xác định hoạt lực glucoamilaza, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Hoạt lực glucoamilaza của chủng *A. awamori* 9901 trong thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi (giờ)	GIA (đv/g)
36	14,32
40	15,54
44	19,42
48	27,66
52	27,73
56	20,15
60	18,2

Từ bảng 2 ta thấy, tại thời điểm từ 48÷52 giờ là thời điểm mà *A. awamori* 9901 sinh enzym có hoạt lực mạnh nhất: 27,66÷27,73 đv/g. Và chúng tôi chọn thời điểm kết thúc nuôi cấy mốc giống ở 48÷52 giờ vì ở thời điểm này hệ sợi của nấm mốc đã có khả năng sinh bào tử đồng đều.

2. Nấm men

1. Sơ bộ tuyển chọn chủng có khả năng lên men tốt

Tiến hành lên men các chủng nấm men rượu có khả năng thuộc giống *Saccharomyces cerevisiae* 9902, 9904, 99TL, 9932T, 9932N trên môi trường malt tại các bình Elnhorn-Smith nhằm xác định khả năng lên men: Nếu chủng nào có khả năng tạo CO₂ đầy hết 5ml dịch trong thời gian ngắn nhất thì chủng đó có khả năng lên men mạnh nhất. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Sơ bộ tuyển chọn chủng nấm men có khả năng lên men tốt

Chủng số	9902	9904	99TL	9932T	9932N
Thời gian (h)	8 ^h 45'	10 ^h 35'	60"	22 ^h 45'	19 ^h 45'

Từ bảng 3 ta thấy, chủng *Saccharomyces cerevisiae* 9902 có khả năng lên men mạnh nhất. Vì vậy, chọn chủng này để đưa vào bánh men.

2. Xác định khả năng lên men

Tiến hành nuôi chủng *S. cerevisiae* 9902 trên môi trường nhân giống Hansen- cao nấm men (g/l) ở 30°C, cứ sau 4 giờ lại xác định các chỉ tiêu: Độ đường, pH, mật độ tế bào (tế bào/ml). Kết quả cho thấy: sau 72 giờ lên men, hàm lượng đường sót còn lại 4,5"S, độ cồn tạo thành đạt 9,2%V; pH giảm xuống thấp nhất trong quá trình lên men (sau 36 giờ) là 3,47; trong khoảng thời gian từ 20÷24 giờ mật độ tế bào nấm men tăng nhanh nhất, đạt (5,40÷ 5,55)x10⁸tb/ml. Như vậy, ta có thể sử dụng chủng này để đưa vào sản xuất bánh men cho quá trình lên men rượu sau này.

3. Đánh giá chủng *Endomycopsis fibuliger* 9933

Để kiểm tra khả năng sinh glucoamilaza, khả năng sinh cồn của chủng *E. fibuliger* 9933, ta tiến hành song song việc nuôi cấy chấm điểm trên môi trường thạch Hansen-tinh bột (thay glucoza bằng tinh bột tan với hàm lượng 4g/l) và nuôi cấy trên môi trường lên men ở t°=30°C. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Khả năng đường hóa và lên men của chủng *E. fibuliger* 9933

Thời gian (giờ)	Hoạt tính	
	Hàm lượng (đo vòng thủy phân tinh bột - D/d-mm)	Lượng cồn tạo thành
24	2	Không
36	2.25	Không
48	2.31	Không
60	2.38	Không
72	2.44	Không

Từ bảng 5 ta thấy, *E. fibuliger* 9933 không có khả năng tạo cồn mà có khả năng sinh glucoamilaza thủy phân tinh bột. Một ưu điểm của chủng này là không sinh transglucozidaza [4] nên làm tăng hiệu suất chuyển hóa tinh bột thành đường glucoza. Thời điểm enzym có hoạt lực mạnh nhất là 24÷36 giờ. Vì vậy, ta có thể đưa chủng này vào nghiên cứu sản xuất bánh men để hỗ trợ nấm mốc giống *A. awamori* 9901 chuyển hóa tinh bột sống thành đường glucoza.

4. CHUẨN BỊ GIỐNG VÀ TẠO BÁNH MEN

1. Quá trình nhân giống

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã đưa ra được điều kiện nhân giống thích hợp cho các chủng:

- Nấm mốc giống *A. awamori* 9901: Nuôi trên môi trường cám ngô ở nhiệt độ 28÷30°C, thời gian 48÷50 giờ, độ ẩm môi trường 50÷55%. Nhiệt độ các buồng 28÷32°C có thông gió và giữ độ ẩm không khí 90÷95%, trong quá trình nuôi cấy cần lật và bẻ nhỏ cám vì hệ sợi mốc phát triển làm cơ chất kết thành bánh. Thu nhận mốc giống khi quan sát thấy hệ sợi của mốc có khả năng sinh bào tử đồng đều và hoạt lực glucoamilaza của mốc giống $\approx 27,66$ đv/g. Sấy mốc giống không quá 45°C cho tới độ ẩm 10÷12% và nghiền nhỏ. Đựng mốc trong các bao hoặc thùng kín, bảo quản ở chỗ mát ($\leq 20^\circ\text{C}$) và để dùng dần.
- Nấm men giống *S. cerevisiae* 9902: giữ giống trên môi trường thạch malt, nhân giống trên môi trường malt. Thời gian nhân giống 20÷24 giờ, nhiệt độ nuôi 28÷30°C, mật độ tế bào: $\geq 5.4.10^8$ tế bào/ml, tỉ lệ tế bào nảy chồi: $\geq 30\%$, pH: 3,7.
- Giả nấm men giống *E. fibuliger* 9933: Giữ giống trên môi trường thạch-Hansen. Nhân giống trên môi trường Hansen-cao nấm men (hoặc trên môi trường malt), $t^\circ=28-30^\circ\text{C}$, thời gian nhân giống 20-24 giờ, pH 3,44, độ đường 3°Bx, mật độ tế bào $\geq 1,44.10^8$ tế bào/ml, tỉ lệ tế bào nảy chồi $\geq 37,8\%$

2. Xác định độ ẩm bột gạo trước khi nhào

Gạo được ngâm 2 giờ, để dốc nước rồi đem nghiền lấy bột khô để nhào bánh. Cân chính xác 5g bột để xác định độ ẩm theo phương pháp sấy tới khối lượng không đổi:

Kết quả, độ ẩm của bột gạo sau khi nghiền: $W = 33,38\%$.

3. Quá trình tạo bánh: tiến hành theo phương pháp đã đề cập ở mục 2.1

5. Ảnh hưởng của độ ẩm bột nhào đến chất lượng bánh men

Độ ẩm thích hợp là yếu tố vô cùng quan trọng trong sản xuất bánh men. Với độ ẩm thích hợp, các chủng nấm mốc và nấm men giống thuần chủng sẽ phát triển mạnh, quá trình tạo bánh dễ dàng, hạn chế được sự phát triển của vi khuẩn. Trên môi trường bột gạo có bổ sung các vi sinh vật thuần chủng (% trọng lượng bột gạo): *A. awamori* 9901-2%, *S. cerevisiae* 9902-5% và hàm lượng nước thay đổi từ 40 đến 70%, kết quả được trình bày ở bảng 5:

Bảng 5. Ảnh hưởng của độ ẩm bột nhào đến chất lượng bánh men

Độ ẩm (%)	40	45	50	55	60	65	70
Khả năng lên men (lit/kg)	0,35	0,55	0,70	0,74	0,68	0,55	0,40

Từ bảng 5 ta thấy: với độ ẩm 70% khả năng lên men đạt 0,40 l/kg gạo, với 40% chỉ đạt 0,35 l/kg gạo và với 50% đạt 0,70 l/kg gạo. Còn ở độ ẩm 55% đạt cao nhất là 0,74 l/kg gạo. Như vậy với độ ẩm 50÷55% đạt hiệu suất thu hồi cao nhất và chọn giá trị này để tiến hành những nghiên cứu tiếp theo.

6. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống *S. cerevisiae* 9902 đến chất lượng bánh men

Cố định độ ẩm của bột nhào là 50-55%, nấm mốc giống là 2%, thay đổi lượng *S. cerevisiae* 9902 từ 2÷14%. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của tỉ lệ nấm men giống *S. cerevisiae* 9902 đến chất lượng của bánh men

Chất lượng	Tỉ lệ <i>S. cerevisiae</i> 9902 (%)						
	2	4	6	8	10	12	14
Khả năng lên men (lit/kg)	0,6	0,75	0,72	0,65	0,58	0,50	0,45

Từ bảng 6 ta thấy: với lượng nấm men giống 2% khả năng lên men rượu của bánh men đạt 0,6 l/kg gạo, 14% đạt 0,45 l/kg gạo, 6% đạt 0,72 l/kg gạo. Còn với lượng nấm men giống 4% đạt 0,75 l/kg gạo là cao nhất. Như vậy với lượng nấm men giống 4÷6% cho khả năng thu hồi rượu là cao nhất và chọn giá trị này để tiến hành những nghiên cứu tiếp theo.

7. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống *A. awamori* 9901 đến chất lượng bánh men

Cố định độ ẩm của bột nhào là 50÷55%, nấm men giống *S. cerevisiae* 9902 là 4÷6%, thay đổi tỉ lệ nấm mốc giống *A. awamori* 9901 từ 0,5 ÷ 3,5%.

Kết quả được trình bày ở bảng 7:

Bảng 7. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống *A. awamori* 9901 đến chất lượng bánh men

Chất lượng	Tỉ lệ <i>A. awamori</i> 9901 (%)						
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
Khả năng lên men (lit/kg)	0,60	0,68	0,74	0,72	0,67	0,60	0,50

Từ bảng 7 ta thấy: với lượng mốc giống 1% khả năng lên men rượu của bánh men đạt 0,6 l/kg gạo, 3,5% đạt 0,5 l/kg gạo, 2% đạt 0,72 l/kg gạo, còn với 1,5% đạt 0,74 l/kg gạo là cao nhất. Như vậy với lượng mốc giống 1,5-2% cho ta khả năng thu hồi rượu là cao nhất.

8. Ảnh hưởng của tỉ lệ *E.fibuliger* 9933 giống đến chất lượng chế phẩm bánh men

Với tỉ lệ độ ẩm của bột nhào: 50-55%, nấm mốc giống *A. awamori* 9901 là 1,5-2%, nấm men giống *S. cerevisiae* 9902 là 4-6%, thay đổi lượng nấm men giống *E. fibuliger* 9933 từ 2 đến 10%. Kết quả được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Ảnh hưởng của tỉ lệ *E. fibuliger* 9933 giống đến chất lượng chế phẩm bánh men.

Chất lượng	Tỉ lệ <i>E. fibuliger</i> 9933 (%)				
	2	4	6	8	10
Khả năng lên men (lit/kg)	0,75	0,80	0,85	0,80	0,665

Từ bảng 8 ta thấy: với lượng nấm men giống 2% khả năng lên men rượu của bánh men đạt 0.75 lit, 10% đạt 0.665 lit, 6% đạt 0.85 lit. Còn với 4% và 8% giống đạt 0,8 l/kg gạo. Như vậy với lượng men giống 5-6% cho ta khả năng thu hồi rượu là cao nhất $0.8 \div 0.85$ lit/kg nguyên liệu (gạo).

9. Đánh giá chất lượng sản phẩm

Bánh men sau khi đã sấy khô bảo quản 5÷7 ngày cho tiến hành lên men từ nguyên liệu là gạo tẻ. Chưng cất đơn giản được loại rượu "thủ công", sau khi được cảm quan đánh giá bởi năm thành viên A, B, C, D, E được trình bày ở bảng 9:

Bảng 9. Chất lượng rượu gạo được sản xuất từ bánh men nghiên cứu sản xuất

Chỉ tiêu chất lượng	Điểm chưa có trong lượng					Tổng số điểm chưa có trong lượng	Điểm trung bình chưa có trong lượng	Hệ số quan trọng	Điểm đã được hiệu chỉnh
	A	B	C	D	E				
Độ trong và màu sắc	4	4	3	4	4	19	3,8	0,8	3,04
Mùi	4	5	5	4	5	23	4,6	1,2	5,52
Vị	5	4	4	4	4	21	4,2	2,0	8,4

Tổng cộng: 16,96

Đối chiếu với bảng (*) của TCVN 3217-79 ta có mẫu rượu trắng đạt mức chất lượng loại khá.

IV. KẾT LUẬN

1. Nghiên cứu chọn được 3 chủng vi sinh vật tốt nhất trong số 4 chủng nấm mốc *A. awamori*; 5 chủng nấm men rượu (trong đó có 1 chủng *E. fibuliger*) thuộc bộ sưu tập giống của phòng Công nghệ lên men- Viện Công nghệ Sinh học- Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia.

+ Nấm mốc *A. awamori* 9901.

+ Nấm men *S. cerevisiae* 9902.

+ Giả nấm men *E. fibuliger* 9933.

Ba chủng này được xác định điều kiện tối thích để sử dụng làm giống cho việc nghiên cứu đưa vào sản xuất bánh men rượu.

2. Đã xác định được các điều kiện thích hợp nhất để sản xuất bánh men rượu có sử dụng các vi sinh vật thuần chủng: Độ ẩm bột nhào 50÷55 %; tỉ lệ giống (tính theo %khối lượng bột khô) *A. awamori* 9901: 1,5÷2 %; *S. cerevisiae* 9902: 4÷6% và *E. fibuliger* 9933: 4÷6%; ở $t^0 = 28\div 30^0\text{C}$, thời gian ủ bánh 24÷ 30 giờ, lượng rượu thành phẩm 40%V thu được cao nhất là 0,8-0,85 l/kg gạo. Từ những kết quả thu được cho thấy khả năng sử dụng các chủng nấm mốc, nấm men thuần chủng trong sản xuất bánh men rượu sẽ đem lại hiệu quả tốt: hiệu suất thu hồi rượu cao, chất lượng bánh men và chất lượng rượu ổn định.
3. Kết quả nghiên cứu đã được đưa đi áp dụng thử nghiệm tại một cơ sở sản xuất bánh men rượu thuộc làng Đại Lâm (Bắc Ninh).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lân Dũng và cộng sự, 1993.

Tạp chí Sinh học tập 15 số 4 tháng 12-1993.

- Hoạt tính glucoamilaza thủy phân tinh bột sống của một số chủng nấm sợi mới phân lập được.
- Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm men thuộc chi *Saccharomycopsis* tích lũy sinh khối cao trong môi trường có nguồn cacbon duy nhất là tinh bột.

2. Nguyễn Văn Hiệu, 1993.

Nghiên cứu góp phần hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất bánh men cổ truyền và ứng dụng trong sản xuất rượu. Luận án Phó tiến sĩ khoa học kỹ thuật, Hà Nội.

3. TCVN 3219-79. Rượu-phân tích cảm quan phương pháp cho điểm.

4. Đặng Thị Thu, 1989.

Nghiên cứu glucoamilaza của *Endomycopsis fibuliger* và một vài ứng dụng. Luận án Phó tiến sĩ khoa học kỹ thuật, Hà Nội.

5. Nguyễn Lân Dũng và những người khác, 1972.

Thực tập vi sinh vật, tập II. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

RESEARCH ON ABILITY OF ALCOHOL FERMENTATION OF RICE BY USING THE YEAST CAKES ADDED WITH SOME PURE STRAINS OF MICROORGANISMS ISOLATED IN VIETNAM

Nguyen Manh Tuan, Nguyen The Trang,
Nguyen Thi Hien, Luong Duc Pham

SUMMARY

Five strains of fungi, four strains of yeast (one of them is *Endomycopsis fibuliger*) were isolated from the traditional yeast cakes of Vietnam from collection of Microorganism of Department of Fermentation Technology, Institute of Biotechnology. Three strains of them were chosen for studying as follow:

- + *Aspergillus awamori* 9901.
- + *Saccharomyces cerevisiae* 9902.
- + *Endomycopsis fibuliger* 9933.

Some suitable technical conditions for making the yeast cakes added with three above strains as follow:

Humidity of dough: 50-55 %; rate of cultures (as per cent amount of rice powders) are: *A.awamori* 9901: 1,5-2 %; *S.cerevisiae* 9902: 4-6% and *E.fibuliger* 9933: 4-6%; $t_{opt} = 28-30^{\circ}\text{C}$ in 24-30 hour, yield of alcohol fermentation (40%V) is 0,8-0,85 l/kg of rice. These results show the ability of using Fungi and Yeast strains in the production of yeast cake with the high productivity of collecting wine, the high and stable quality of yeast cake and wine.

The cakes of yeast were applied in small-scale production in Bacninh province with better results in comparison with original traditional ones.

1.O.24

NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ĐẬU TƯƠNG LÊN MEN TỪ VI KHUẨN *Bacillus subtilis* NATTO

Trương Thị Thanh Bình, Đỗ Thị Ngọc Huyền,

Trần Văn Tuấn, Bùi Thị Hương, Nguyễn Thụy Châu

BỘ MÔN VI SINH-VIÊN CÔNG NGHỆ SAU THU HOẠCH

4-NGÔ QUYẾN, HÀ NỘI, VIỆT NAM

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ hơn một nghìn năm trước đây, đậu tương đã được sử dụng như một trong những nguồn protein quan trọng nhất. Về mặt dinh dưỡng, đậu tương khác các loại đậu và hạt lương thực khác là chứa từ 35% đến 40% protein, 15-20% hydrat cacbon và các muối khoáng. Nhưng do có cấu trúc đặc biệt nên các protein của đậu tương khó tiêu hoá hơn các protein của động vật. Cấu trúc protein của đậu tương chia thành các hai nhóm axit và base. Các nhóm base chứa các axit amin kỵ nước nên khó tan trong nước. Ngoài ra đậu tương còn chứa các chất kháng dinh dưỡng như chất kháng tripsin, chất kháng chymotrypsin, đó là những peptid chịu nhiệt, khó tiêu hoá và là những chất độc đối với cơ thể. Ở liều cao, các chất kháng dinh dưỡng này có thể gây bệnh phù thán [6]. Để nâng cao giá trị dinh dưỡng của đậu tương và khắc phục những nhược điểm trên của protein đậu tương, người ta đã sử dụng các phương pháp lên men vi sinh trong quá trình chế biến đậu tương. Việc dùng khuẩn *Bacillus subtilis* natto để lên men đậu tương đã trở thành những món ăn truyền thống ở nhiều nước châu Á như Nhật Bản, Ấn Độ, Nepal, Indonesia, Thái Lan [4,7]. Ở nước ta công nghệ lên men này chưa được nghiên cứu một cách có hệ thống và chưa trở thành món ăn phổ biến trong nhân dân. Vì vậy chúng tôi đã phân lập, tuyển chọn các chủng *Bacillus subtilis* natto và nghiên cứu công nghệ lên men loại thực phẩm này nhằm phổ biến trong nhân dân và đặc biệt góp phần vào phong trào chống suy dinh dưỡng ở trẻ em của các vùng nông thôn nghèo.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Phân lập và tuyển chọn các chủng *Bacillus subtilis* natto từ lá cây

Một trăm mẫu lá cây của các tỉnh Hà Nội, Hưng Yên, Thái Bình đã được sưu tập cho mục đích phân lập và tuyển chọn các chủng *Bacillus subtilis* natto.

Một mẫu lá có diện tích 1 cm được hoà với 10ml nước cất vô trùng, lắc ở máy lắc 30 min. Mẫu được diệt tế bào sinh đường của vi khuẩn ở nhiệt độ 80°C trong 10 phút ở nơi cách thủy. Hỗn dịch được trải trên môi trường ở các đĩa Petri theo phương pháp pha loãng và được ủ ở 30°C trong 2 ngày. Chọn những khuẩn lạc có hình thái của *Bacillus subtilis* và phân loại theo Buchanan và Gibsons [2].

2. Xác định hoạt tính protease của các chủng *Bacillus subtilis* natto

Các chủng *Bacillus subtilis* natto được nuôi cấy trên môi trường số 1 có thành phần: dịch nấm men thủy phân 5 g/l, pepton 7,5 g/l, cao thịt 5 g/l, K_2HPO_4 0,5%, glucose 5 g/l, thạch 20 g/l.

Thời gian nuôi cấy 24h. Hoạt tính protease của các chủng *Bacillus subtilis* natto được xác định theo phương pháp của M. Kunits (1947) [M.Kunit, J. Gen Physiol 30:291 (1947)] đã được biến đổi và tối ưu hoá tại phòng Hoá sinh Protein, Viện Công nghệ Sinh học.

Hoạt tính proteinase được xác định bằng cách đo lượng sản phẩm sinh ra sau khi đã li tâm loại sinh khối.

Enzyme chuẩn : trypsin (do Hãng WAKO, Nhật Bản)

Cơ chất : Casein " Hammarstein" - (do Hãng WAKO, Nhật Bản).

Đơn vị enzyme : được tính bằng lượng enzyme cần thiết để có thể tạo lượng sản phẩm thủy phân cơ chất là casein 0,5% có độ hấp thụ ở 280nm tăng 1.00 sau 1 phút.

3. Xác định hoạt tính amylase của các chủng *Bacillus subtilis* natto

Theo phương pháp Bowneld, P. (1955) [methods in enzymology, Academic Press, Newyork, p.149-158] được cải tiến với thuốc thử 3,5 - dinitrosalicylate kiềm.

Hoạt tính amylase được tính bằng hàm lượng μ mol glucose được giải phóng từ tinh bột trên 1ml dịch nuôi cấy trong 1 phút ở 37°C.

4. Xác định hàm lượng protein tan của các chủng *Bacillus subtilis* natto

Theo phương pháp Lowry (1951) [Lowry, OH.; Rpsenbrough, N.JFarr: A.L and Randall, R.J (1951) J.Biol Chem. 193, 265] với thuốc thử Folin đã được chuẩn bị tại phòng Hoá sinh Protein, Viện Công nghệ Sinh học. Hàm lượng protein trong mẫu được tính theo đơn vị g protein (100g mẫu hoặc g protein/100ml dịch nuôi cấy).

5. Xác định axit amin tự do tổng số của các chủng *Bacillus subtilis* natto

Theo phương pháp Lowry đã được cải biến tại phòng Hoá sinh Protein, Viện Công nghệ Sinh học.

Các axit amin tự do tổng số được xác định trong dịch chiết mẫu với thuốc thử Folin sau khi đã loại protein

Hàm lượng axit amin tự do tổng số được tính bằng g acid amin/100g mẫu hoặc g axit amin/1ml dịch mẫu.

6. Nghiên cứu công nghệ lên men đậu tương bằng *Bacillus subtilis* natto

1. Nuôi cấy dịch nhân giống *Bacillus subtilis* natto

Chủng *Bacillus subtilis* natto được cất giữ trên ống thạch nghiêng. 1 vòng que cấy đã được truyền vào 100ml môi trường số 1. Vi khuẩn được nuôi cấy lắc ở 30°C trong 24 giờ.

2. Chuẩn bị đậu tương cho lên men

Chọn loại đậu tương hạt nhỏ, ngâm nước qua đêm, bóc vỏ, hấp trong 20-30 phút cho đến khi đậu mềm.

3. Nghiên cứu công nghệ lên men đậu tương bằng *Bacillus subtilis* natto

Đậu tương hấp được nuôi cấy với hỗn dịch chủng *Bacillus subtilis* natto ủ từ 20 đến 24h, ở 40°C, cho đến khi *Bacillus subtilis* natto phủ lên đậu một lớp phủ màu trắng. Khả năng thủy phân đậu tương bằng *Bacillus subtilis* natto được đánh giá bằng hàm lượng protein tan, axit amin tổng số và được xác định tại các thời điểm lên men khác nhau: 0,4,8,12, 16,20, 24 giờ với nồng độ hỗn dịch *Bacillus subtilis* natto cấy vào đậu tương hấp là 10^4 tế bào/ml và 10^6 tế bào/ml.

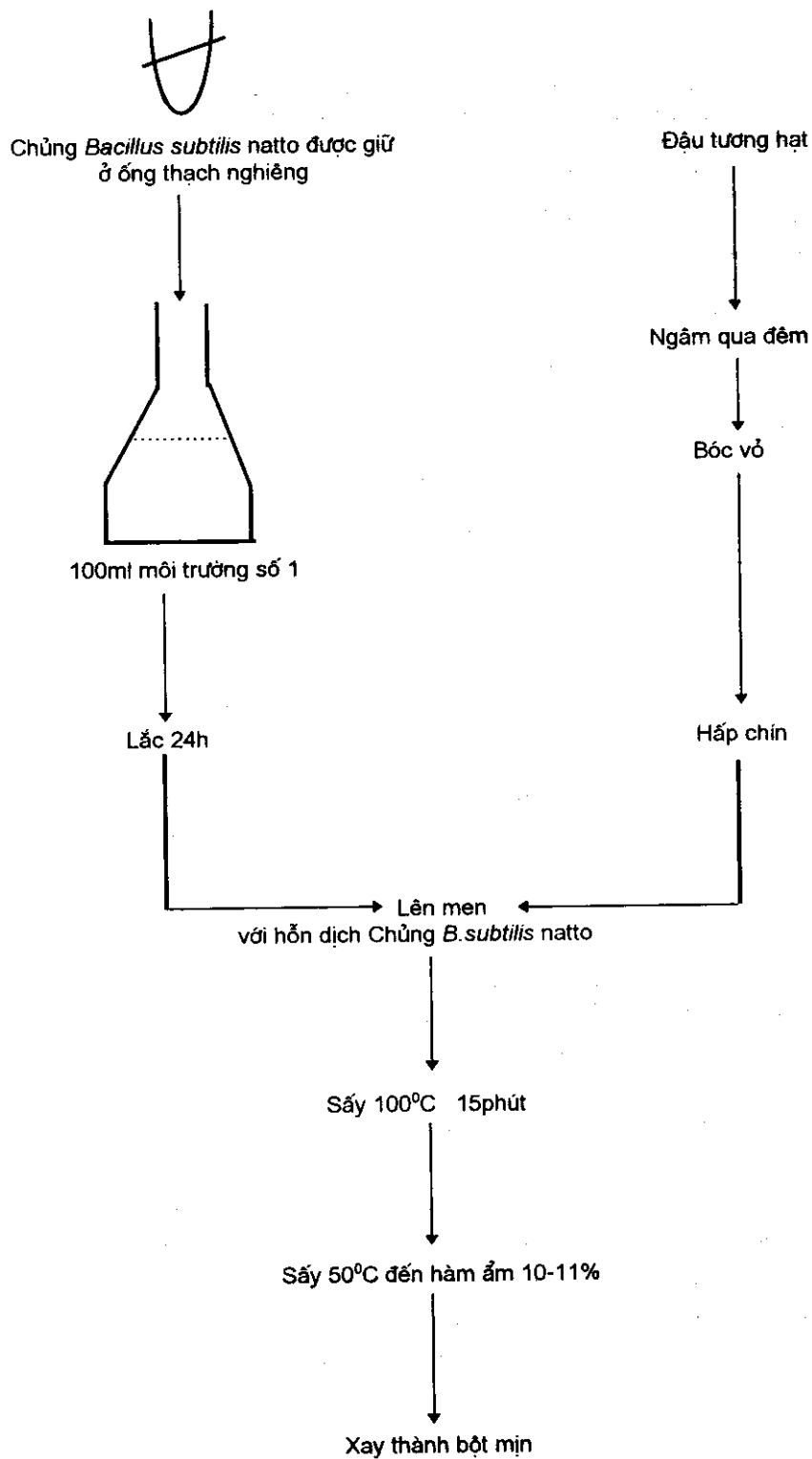
Đậu tương lên men có thể bảo quản lạnh để ăn dần hoặc sấy khô, xay thành bột mịn và phối trộn với các thành phần dinh dưỡng khác thành bột dinh dưỡng có vị thơm ngon, hấp dẫn.

7. Nghiên cứu công nghệ nhân giống *Bacillus subtilis* natto

Bằng phương pháp nuôi cấy chìm, quy mô 5l/mẻ Sử dụng môi trường số 1. Tỷ lệ tiếp giống là 10%. Thổi khí vào môi trường với áp suất khí là 1atm. Thời gian lên men là 24h.

8. Nghiên cứu công nghệ bảo quản *Bacillus subtilis* natto bằng bột sắn, không qua đông khô

Bacillus subtilis natto ở dạng bào tử sau khi lên men được trộn với bột sắn tỷ lệ 100ml/100g bột sắn. Hỗn hợp được sấy khô với hàm ẩm 10% sản phẩm được chia nhỏ và bảo quản trong túi nilông.

Sơ đồ qui trình công nghệ lên men đậu tương bằng *Bacillus subtilis* natto

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Tuyển chọn và xác định hoạt tính protease, amylase của các chủng *Bacillus subtilis* natto

Bảng 1. Một số đặc tính sinh hoá và cảm quan của một số chủng *B.natto* phân lập từ lá cây và các chủng đối chứng

Số chủng phân lập có hoạt tính protease cao nhất trong tổng số 60 chủng phân lập	Hoạt tính Protease (U/ml) ⁽¹⁾	Mùi thơm	Độ nhớt	Độ cứng	Vị ngọt	Vị đắng
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>miura</i> (chủng thương mại của Nhật Bản)	58	Mùi thơm	++	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> natto 175 (Viện Công nghiệp Thực phẩm)	60	Mùi thơm	++	+	+	-
V23	75.30	Mùi thơm hấp dẫn	+++	-	+++	-
V24	99.30	Mùi thơm hấp dẫn	++++	-	++++	-
V33	67.5	Mùi thơm	++	-	++	-
V34	76.62	Mùi thơm	+++	-	+++	-
V35	75.6	Mùi thơm	+++	-	+++	-
V38	65.28	Mùi thơm khai	++	+	++	+

Ghi chú :

- Hoạt tính protease được tính theo độ phân giải casein (0,5%) sau một giờ của 1ml dịch nuôi cấy ở 37°C.
- Độ nhớt, độ ngọt được đánh giá cảm quan ở các mức độ khác nhau từ + đến ++++.
- Độ cứng, độ đắng được đánh giá cảm quan ở các mức độ khác nhau từ âm tính (-) đến dương tính (+).

Kết quả ở bảng 1 cho thấy: 6 trong 60 chủng *Bacillus subtilis* natto phân lập từ lá của một số tỉnh miền Bắc Việt Nam đã có hoạt tính protease cao hơn hoạt tính protease của chủng *B. miura*, Nhật Bản và chủng *Bacillus subtilis* natto 175, Viện công nghiệp thực phẩm. Các đặc tính cảm quan thực phẩm đều tốt hơn so với các chủng đối chứng. Như vậy những chủng này có thể sử dụng cho lên men đậu tương để thủy phân protein với hiệu quả cao.

Ngoài enzyme protease thì các chủng *B.natto* phân lập được còn tạo enzyme amylase. Kết quả ở bảng 2 cho thấy hoạt tính amylase ở chủng V23, V24 và V34 là 32,

36, 32 đơn vị, theo thứ tự, trong khi đó hoạt tính amylase ở các chủng đối chứng chỉ là 8 đơn vị. Như vậy các chủng *Bacillus subtilis* natto phân lập được càng có ý nghĩa về mặt dinh dưỡng hơn khi dùng đậu tương lên men để bổ sung vào bột dinh dưỡng trẻ em

Bảng 2. Hoạt tính amylase của các chủng *Bacillus subtilis* natto khảo sát

Chủng <i>Bacillus subtilis</i> natto	Hoạt tính amylase (đơn vị/ml dịch lên men)
<i>B. subtilis</i> var. <i>miura</i>	8
<i>B. subtilis</i> natto 175	8
V23	32
V24	36
V33	8
V34	32
V35	16
V38	16

2. Xác định hàm lượng protein tan và axit amin tự do, sự giảm hoạt tính chất ức chế tripsin trong đậu tương lên men

Bảng 3. Khả năng thủy phân protein đậu tương trong quá trình lên men bằng các chủng *Bacillus subtilis* natto

Tên chủng <i>B. subtilis</i> dùng cho lên men	Protein tan tổng số (g/100gmẫu)	Axit amin tự do tổng số (ga/100g mẫu)	Tỷ lệ protein tan/ protein tổng số (%)	Tỷ lệ axit amin tự do tổng số/ protein tổng số (%)
Đối chứng	8,5	3,45	20	8
<i>B. subtilis</i> miura (Nhật Bản)	16,29	9,01	38	21
<i>B. subtilis</i> natto 175(Viện CNTP)	14,74	8,37	34	20
V23	23,6	17,98	55	42
V24	31,71	23,70	72	56
V 33	21,14	16,41	49	38
V 34	23,52	19,7	54	45
V 35	22,35	17,83	52	41
V 38	20,39	16,76	47	39

Chú thích: Hàm lượng protein tổng số trong các mẫu đậu tương nghiên cứu là 43g/100g mẫu

Sáu chủng *Bacillus subtilis* natto phân lập từ lá có hoạt lực cao nhất đã được sử dụng để nghiên cứu khả năng thủy phân protein đậu tương và có đối chứng với chủng *Bacillus subtilis* var. *miura* và *Bacillus subtilis* natto 175. Kết quả ở bảng 3 cho thấy: đậu tương được thủy phân bằng protease của các chủng V23, V24, V33, V34, V35, V38 có tỷ lệ protein tan/protein tổng số thấp nhất là 47% và cao nhất là 72% , trong khi đó tỷ lệ này là 38% đối với chủng *Bacillus subtilis* var. *miura* và 34% đối với chủng *Bacillus subtilis* natto 175. Khả năng thủy phân protein của các chủng khảo sát được thể hiện rõ ràng ở tỷ lệ axit amin tự do tổng số/ protein tổng số. Tỷ lệ này là 42%, 56%, 38%, 45%, và 41% đối với các chủng V23, V24, V33, V34, V35, V38, theo thứ tự, trong khi đó tỷ lệ này chỉ là 8%, 21% và 20% ở mẫu đậu tương không lên men, đối với chủng *Bacillus subtilis* var. *miura* và *Bacillus subtilis* natto 175. Kết quả này cho thấy chủng V24 có khả năng thủy phân protein đậu tương thành các axit amin tự do với tỷ lệ cao nhất và có thể sử dụng chủng này cho việc sản xuất đậu tương lên men thành thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao.

Bảng 4. Kết quả xác định hiệu quả sự giảm hoạt tính chất ức chế trypsin của đậu tương lên men bằng *Bacillus subtilis* natto (*)

Đậu tương lên men bằng các chủng	Hoạt tính chất ức chế trypsin (UI/g)	Hiệu quả của sự giảm hoạt tính (%)	Hoạt tính chất ức chế (α -Chimotrypsin (UI/g)
Chủng 175 (Viện Công nghiệp Thực phẩm)	0,224	99,5	CXĐ
<i>B. var. miura</i> (Nhật Bản)	0,224	99,5	CXĐ
Đậu tương lên men bằng vi khuẩn lactic	1,62	96	CXĐ
Mẫu đối chứng (đậu tương không lên men)	39-40	0	CXĐ
V23	0	100	0
V24	0	100	0
V33	0	100	0
V34	0	100	0
V35	0	100	0
V38	0	100	0

Kết quả ở bảng 4 cho thấy hoạt tính chất ức chế tripsin ở các mẫu đậu tương lên men bằng 6 chủng *B. subtilis* natto phân lập được là bằng không, trong khi đó hoạt tính này ở mẫu đậu tương không lên men là 39-40 đơn vị, ở chủng 175 (Viện Công nghiệp Thực phẩm), *B. var. miura* (Nhật Bản) là 0,224, 0224.

3. Nghiên cứu công nghệ lên men, nhân giống vào bảo quản *Bacillus subtilis* natto bằng bột sắn, không qua đông khô

Bảng 5. Ảnh hưởng của mật độ tế bào và thời gian lên men đến sự thủy phân protein đậu tương

Mật độ <i>Bacillus subtilis</i> natto cho lên men	Thời gian lên men (giờ)	Protein tan tổng số (%)	Axit amin tự do tổng số (g a.a. /100g mẫu)
10^4 tế bào/ml	4	8,17	3,53
	8	12,70	9,13
	12	15,9	13,80
	16	19,40	16,90
	18	20,89	17,07
	20	21,50	19,15
	24	22,52	20,53
10^6 tế bào/ml	4	8,88	4,81
	8	15,34	10,99
	12	19,22	16,00
	16	22,25	18,60
	18	23,52	19,70
	20	24,88	20,50
	24	25,45	21,12
	Mẫu đối chứng	5,34	3,25

Ở bảng 5 kết quả nghiên cứu công nghệ lên men đã cho thấy mật độ tế bào cấy vào ban đầu đã ảnh hưởng đến hàm lượng protein tan tổng số và hàm lượng axit amin tổng số. Với mật độ tế bào cấy vào là 10^6 tb/ml thì tỷ lệ protein tan tổng số và axit amin tự do tổng số cao hơn so với tỷ lệ cấy vào ban đầu là 10^4 tb/ml ở các thời điểm lên men như nhau.

Để triển khai công nghệ sản xuất đậu tương lên men ở quy mô lớn, từ vài chục kg đến 200 kg, chúng tôi đã nghiên cứu công nghệ nuôi cấy chìm *B. subtilis* natto ở quy mô máy lắc và lên men sục khí trong bình lên men 5l. Kết quả ở bảng 6 cho thấy, trên môi trường dinh dưỡng số 1, sản lượng tế bào/ml đạt được bằng lên men trên máy lắc là $4,3.10^7$. Sản lượng tế bào *B. subtilis* natto/ml đạt được bằng lên men trên bình 5l là $1,4.10^7$ trên cùng môi trường dinh dưỡng số 1. Hệ thống lên men sục khí do bộ môn Vi sinh thiết kế chế tạo rất đơn giản và rẻ tiền, hoàn toàn thích hợp cho việc sản xuất đậu tương lên men ở các làng xã hoặc các cơ sở chế biến đậu tương với quy mô khoảng 200kg/mẻ.

Bảng 6. Sản lượng *B. subtilis* natto đạt được bằng phương pháp nuôi cấy chìm ở các quy mô khác nhau trên môi trường dinh dưỡng số 1

Quy mô lên men	Sản lượng tế bào/ml
Trên máy lắc	$4,3 \times 10^7$
Trên bình lên men 5l	$1,4 \times 10^7$

Để phục vụ cho việc chế biến đậu tương bằng phương pháp lên men, việc nghiên cứu công nghệ bảo quản *B. subtilis* natto thích hợp để làm giống là rất cần thiết.

Bảng 7. Sự sống sót của bào tử *B. subtilis* natto ở các phương pháp bảo quản khác nhau

Phương pháp bảo quản	Số bào tử sống/g sau các thời gian bảo quản			
	0 tháng	3 tháng	6 tháng	trên 1 năm
Bào tử trộn với bột sắn, không qua đông khô	$4,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$	3×10^5	
Đông khô	$4,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$

Việc nghiên cứu giữ giống *B. subtilis* natto ở dạng bào tử với khối lượng lớn, không qua đông khô đã được tiến hành nghiên cứu. Kết quả ở bảng 7 cho thấy: số bào tử sống/g của *B. subtilis* natto được bảo quản bằng bột sắn, không qua đông khô sau thời gian 3 tháng là $1,4 \cdot 10^6$ bt/g, sau 5 tháng là $3 \cdot 10^5$ bt/g. Như vậy cứ sau 3 tháng, số bào tử sống/g chỉ giảm 10 lần so với lượng bào tử bảo quản ban đầu. Mặc dù phương pháp đông khô cho phép bảo quản giống trong thời gian lâu hơn, có thể tới hàng chục năm, nhưng phương pháp này đòi hỏi máy móc đắt tiền và kỹ thuật cao, không thích hợp cho công nghệ chế biến ở quy mô địa phương. Vì vậy, việc nghiên cứu công nghệ bảo quản *B. subtilis* natto bằng bột sắn không qua đông khô là một thành công của đề tài^(*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akimoto T., Matsumoto, I., and Imai S., 1993.

Effect of Temperature and Inoculum Size on Natto's Enzyme activities during Fermentation.

2. Buchanan R. E., and Gibbons N. E., 1974.

Bergey manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins company, Baltimore.

(*) Chúng tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới TS. Phạm Thị Trân Châu, PTS. Phan Văn Chí, PTS. Nguyễn Thị Bích Nhì, KS. Hoàng Thị Tý, Thạc sỹ Trần Tuấn Quỳnh đã nhiệt tình cộng tác phân tích các chỉ số hoá sinh cho công trình nghiên cứu này.

3. Kakade M. L., Rackis J.J., Mc Ghee J.E., and Puski G., 1974.

Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products : A Collaborative Analysis of an improved Procedure.

4. Nagai T., Nishimura K., Suzuki H., Banba Y., Sasaki H., and Kan Kiuchi, 1994.

Isolation and Characterization of a *Bacillus subtilis* Strain Producing Natto with strong Umami-Taste and High Viscosity.

5. Nikkuni S., Kari T. B., Vilkhuk K. S., 1995.

Mineral and Amino Acid Contents of Kinema, a Fermented Soybean Food Prepared in Nepal.

6. Phan Văn Chi, Nguyễn Thị Bích Nhi và cộng sự, 1985.

Một số kết quả nghiên cứu về đậu mè ở Việt Nam. Báo cáo nghiên cứu khoa học, Viện Khoa học Việt Nam.

7. Steinkraus K. H., 1996.

Cornell University, Ithaca, New York: Hand book of Indigenous Fermented Food.

THE STUDY ON THE SOYBEAN FERMENTATION TECHNOLOGY BY *Bacillus subtilis* NATTO

Trương Thị Thanh Bình, Đỗ Thị Ngọc Huyền,
Trần Văn Tuấn, Bùi Thị Hương, Nguyễn Thụy Châu

SUMMARY

We collected 60 *Bacillus subtilis* isolates from leaf samples and total 6 isolates having high activity of protease and amylase. The protease activity of the obtained strains ranged from 65,28 uI/ml to 99,3 uI/ml. The amylase activity of these strains ranged from 8 uI/ml to 32 uI/ml. These strains were used for soybean fermentation as Natto. The fermentation technology of soybean was investigated such as influence of starter density and fermentation period to the soybean hydrolyzation. We found that 10^6 cell/ml of starter was better for fermentation compared with 10^4 cell/ml. The optimal period for fermentation was 18 hours, at that time the total soluble protein and total free amino acid were higher and the taste of Natto was better. The trypsin inhibitor in soybean was reduced significantly in soybean fermented sample in comparison with nonfermented sample. The yield of *B. subtilis* natto for starter was $4,3 \times 10^7$ cell/ml in shaker and $1,4 \times 10^7$ in 5l fermentor in the medium containing hydrolyzed yeast extract, pepton, meat extract and glucoza. The storage of *Bacillus subtilis* natto for survivality was also studied. We found that the total survival cell of *Bacillus subtilis* natto did not change so much after 6 months stored in manioc flour.

1.O.25

TẠO CHỦNG NẤM MEN BÁNH MỠ CÓ KHẢ NĂNG LÊN MEN ĐƯỜNG CAO BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI RARE-MATING

Phạm Thuý Hồng⁽¹⁾, Yasuo Nakatomi⁽²⁾, Hiroyuki Takano⁽³⁾

(1): VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC;

(2): ORIENTAL YEAST COMPANY LTD. 3-6-10,
AZUSAWA, ITABASHI-KU TOKYO 174, JAPAN;

(3): NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE,
2-1-2 KANNONDAI, TSUKUBA, IBARAKI 305, JAPAN.

I. MỞ ĐẦU

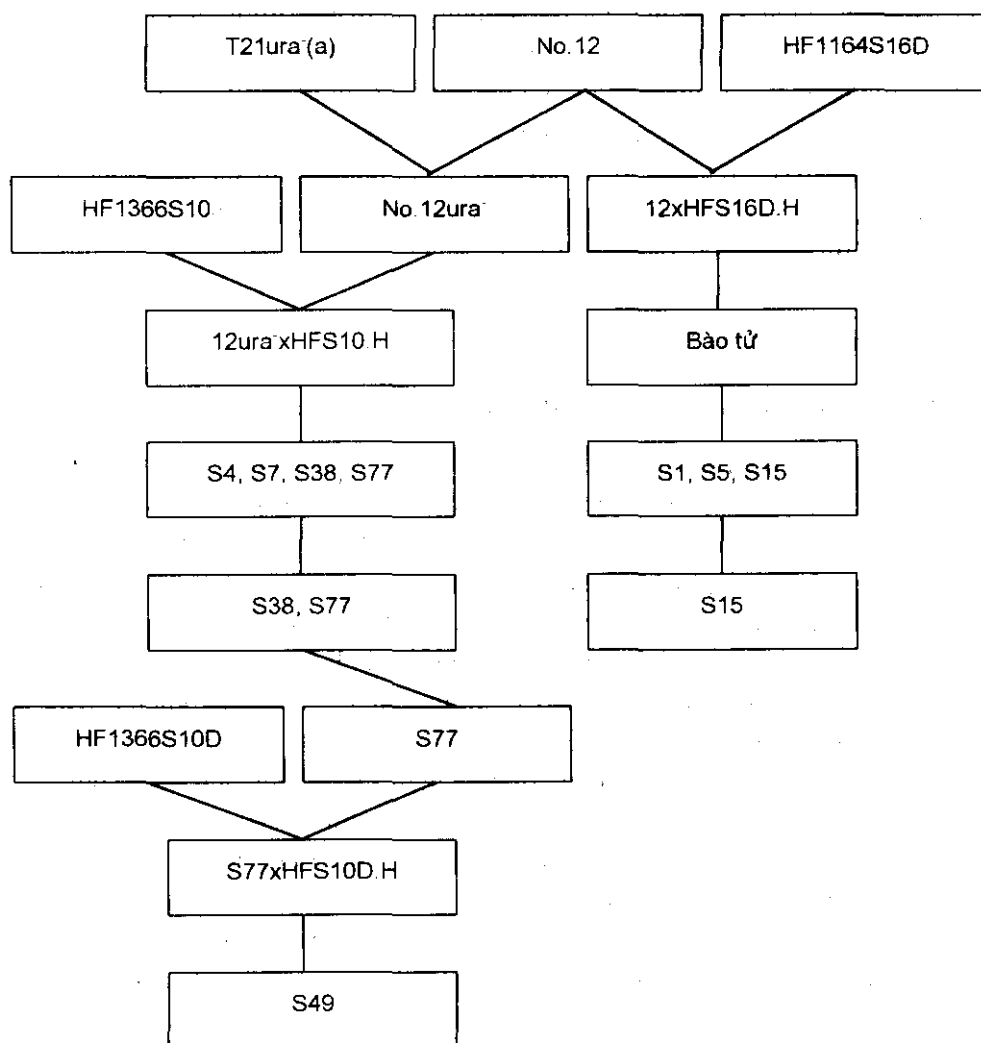
Nấm men phân lập từ các nguồn khác nhau trong thiên nhiên của nước ta có nhiều đặc điểm ưu việt như khả năng tạo sinh khối tốt, thành phần trehalose và hoạt tính enzym invertase cao, một số chủng có khả năng chịu lạnh, chịu nhiệt v.v..., nhưng chúng cũng có nhiều yếu điểm so với các chủng công nghiệp của nước ngoài như dung lượng tế bào nhỏ, khả năng lên men đường và tạo khí kém, tỷ lệ các thành phần cồn cao chưa thích hợp để tạo được mùi vị thơm ngon. Song ta có thể cải tiến chúng để dùng trong các ngành công nghiệp sản xuất và chế biến thực phẩm, đặc biệt đối với công nghiệp sản xuất bánh mỳ. Một số chủng *S.cerevisiae* có thể cải tiến dần thành các chủng nấm men bánh mỳ. Một trong những đặc tính cần được cải tiến trước tiên là khả năng lên men đường và tạo khí cac bonic của nấm men trong quá trình ủ bột. Đặc tính này đóng vai trò quan trọng nhất quyết định chất lượng của nấm men bánh mỳ. Việc tạo được các chủng nấm men bánh mỳ từ nguồn nấm men địa phương sẽ mở ra khả năng phát triển của ngành công nghiệp nấm men bánh mỳ của Việt Nam.

Các chủng nấm men có trong tự nhiên hầu hết tồn tại ở dạng non-mater (a/α), rất hiếm trường hợp thể hiện giới tính mater (aa) hoặc ($\alpha\alpha$)(5). Vì vậy, muốn tạo được chủng nấm men mới trên cơ sở các tính trạng ưu việt của nấm men prototrophic và nấm men công nghiệp, thường phải sử dụng một số kỹ thuật như gây đột biến (6), dung hợp tế bào trần (7) và các phương pháp lai khác nhau (8). Trong các phương pháp lai, rare-mating là phương pháp tốt nhất được sử dụng đối với các chủng không có khả năng sinh bào tử, nhưng cảm ứng với các chất gây đột biến ADN ty thể. Trong báo cáo này, chúng tôi sẽ trình bày một số kết quả nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn các chủng *Saccharomyces cerevisiae* từ các nguồn nấm men tự nhiên của Việt Nam, dùng kỹ thuật rare-mating lai chúng với các chủng nấm men công nghiệp của Nhật Bản, tăng cường khả năng lên men và tạo khí nhằm tạo chủng nấm men bánh mỳ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Chủng nấm men

55 chủng nấm men prototrophic phân lập từ nhiều nguồn khác nhau trong thiên nhiên của Việt Nam được dùng trong việc tuyển chọn các chủng *S.cerevisiae* có những đặc điểm phù hợp với nhu cầu của thí nghiệm lai. Chủng kí hiệu No.12 được tuyển chọn làm chủng gốc (parental strain). Chủng nấm men bánh mỳ công nghiệp của Nhật Bản HF1164S16, HF1366S10 và HF1164S16D dùng làm chủng lai (mating strains). Các chủng dị dưỡng T19 ura (α) và T21 ura (a) dùng để tạo chủng tam bội. Các chủng công nghiệp STI-8 và HF1275 nhận của công ty nấm men Oriental được dùng làm chủng chuẩn để so sánh.



Hình 1. Sơ đồ lai của chủng No.12 với nấm men bánh mỳ Nhật Bản

2. Môi trường và dung dịch

Môi trường dùng để giữ và nuôi cấy chủng (YPD, yeast extract 1%, *polypeptone* 2%, glucose 2%, pH5.2), môi trường sinh bào tử (SPO, glucose 0.05%, yeast extract 2%, potassium acetate 1%), môi trường chọn lọc (dye plate, sucrose 5%, yeast extract 0.3%, potassium monophosphate 0.2%, ammonium sulphate 0.1%, citric acid monohydrate 0.1%, tripotassium citrate monohydrate 0.5%, agar 2%, ponceur 3R 0.5%, aniline blue 0.25%), môi trường nuôi cấy thu sinh khối và xác định khả năng lên men của chủng (Nestle medium, sucrose 2%, sodium succinate 1%, yeast extract 0.5%, yeast nitrogen base 0.67%, pH4.5).

3. Phương pháp

Các phương pháp dùng trong thí nghiệm gồm phương pháp phân tích bào tử (6), lai tế bào bằng kỹ thuật rare- mating (8), phương pháp xác định thành phần trehalose (Trevelian and Harrision, 1956) (9), xác định hoạt tính invertase (Oda and Ouchi, 1990) (10), các phương pháp xác định khả năng lên men đường bằng BCP (Nakatomi et al, tài liệu không công bố), fermograph ss(Dunas, 1988), fermograph(Hino et al, 1991) (11), kỹ thuật điện di CHEF' (Oda et al, 1995) (12) các phương pháp xác định chất lượng nấm men bánh mỳ, làm bánh mỳ và đánh giá chất lượng bánh mỳ (theo tiêu chuẩn của Hội công nghiệp nấm men Nhật Bản, 1991) (13).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập, tuyển chọn và xác định các đặc điểm sinh học của chủng

55 chủng nấm men ký hiệu No.1- No.55 được cấy chấm trên môi trường thạch YPD và cấy chuyển sang môi trường chọn lọc (dye plate) để làm sạch chủng. Theo Nakatomi và cộng sự, các chủng phân lập trong tự nhiên hầu hết đều nhiễm rất nhiều vi khuẩn và các loại nấm khác, do đó dùng đĩa chọn lọc chứa chất màu ponceur 3R và Aniline blue sẽ phân biệt được rất rõ các chủng bị nhiễm, bằng sự khác biệt về màu sắc khuẩn lạc, ta có thể nhận biết chủng nào bị nhiễm để làm sạch. Trên môi trường chọn lọc, những chủng bị nhiễm thường là các khuẩn lạc có màu sắc không đồng nhất và khuẩn lạc bị khía thành các búi nhỏ. Các chủng này được cấy nhiều lần trên môi trường chọn lọc và các khuẩn lạc đồng nhất về màu sắc và tròn đều được chọn ra để tiến hành phân tích các đặc điểm của chủng. Tất cả 55 chủng đều thể hiện giới tính non-mater, chúng không có khả năng lai trực tiếp với các chủng mater. Sự khác nhau về màu sắc và kích thước khuẩn lạc cho thấy chúng rất đa dạng, kích thước tế bào cho thấy hầu hết chúng tồn tại trong thiên nhiên ở dạng nhị bội, 24 chủng có khả năng cảm ứng với tác nhân gây đột biến ở mức độ ADN ty thể, các tế bào ρ^+ được biến đổi thành ρ^- dưới tác dụng của ethidium bromide ở nồng độ 10%, 19 chủng có khả năng sinh bào tử trên môi trường SPO sau khi được nuôi cấy ở 30°C trong 4-5 ngày. Khả năng tạo sinh khối tế bào của các chủng có khác nhau và giao động trong khoảng từ 10-44mg/ml (trọng lượng khô), 24 chủng có trọng lượng khô cao hơn 30mg/ml, trong đó có 7 chủng có

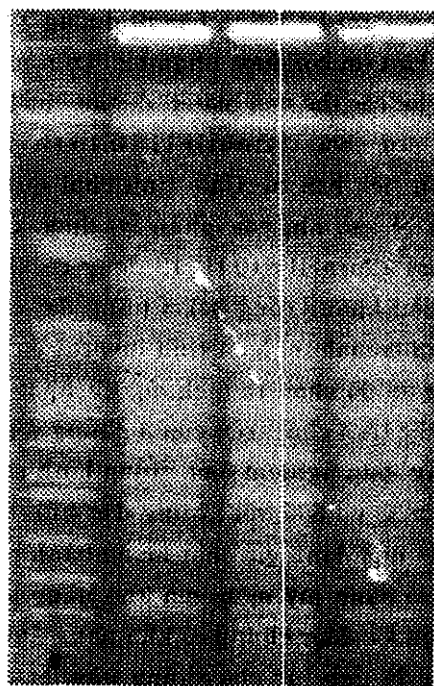
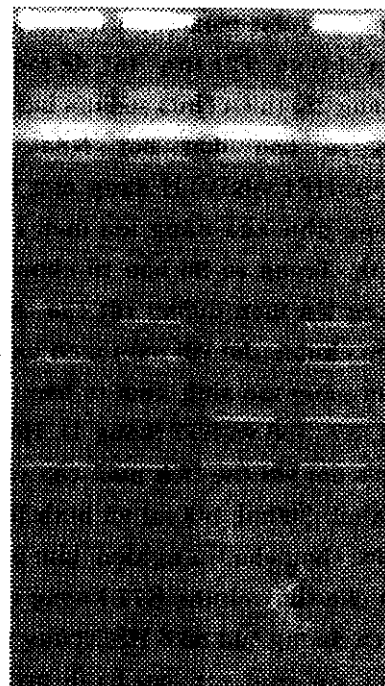
khả năng tạo sinh khối tế bào cao hơn 40mg/ml, đây là một đặc điểm rất quý đối với các chủng tự nhiên dùng để cải tạo thành các chủng công nghiệp. Thành phần trehalose tương đối cao, giao động giữa các chủng từ 10-16% (các chủng công nghiệp của nước ngoài có thành phần trehalose là 12%), hoạt tính invertase giao động trong khoảng 100-200Unit, phù hợp với yêu cầu đối với việc tạo chủng nấm men bánh mì loại không đường (NSD, non sugar dough), hoặc ít đường (LSD, low sugar dough). Ngoài một số ưu điểm trên, nấm men tự nhiên có một số nhược điểm như khả năng lên men ở các điều kiện không đường, lượng đường thấp (LSD, low sugar dough) và lượng đường cao (HSD, high sugar dough) đều rất kém so với các chủng công nghiệp Nhật Bản (tư liệu không công bố). Dựa trên các ưu điểm của các tính trạng đã xác định, chủng No.12 là 1 trong 4 chủng được chọn để lai với nấm men bánh mì Nhật Bản làm tăng cường khả năng lên men của chủng đối với LSD và HSD (sơ đồ).

2. Lai

Chủng No.12 được lai với các nấm men bánh mì dạng đơn bội HF1164S16(α), HF1366S10(a) và dạng nhị bội HF1164S16D($\alpha\alpha$) có nguồn gốc từ nấm men bánh mì thương mại của Nhật Bản, nhằm tăng cường khả năng lên men LSD và HSD. No.12 là nấm men Việt Nam *S. cerevisiae* dạng non-mater nhị bội, không có khả năng sinh bào tử, do đó thí nghiệm lai được tiến hành bằng kỹ thuật rare-mating. Trước tiên, No.12 được gây đột biến với ethidium bromide để tạo tế bào ρ rồi lai với tế bào dị dưỡng T19 ura (α) và T21 ura (a) để tạo chủng tam bội. Thể lai tam bội được nhận biết trên môi trường tối thiểu chứa sodium lactate, chúng được chọn lọc các thể non mater để tiếp tục lai với tế bào đơn bội Nhật Bản. Chủng lai tứ bội 12uraHF1164S16.H và 12uraHF1366S10.H dạng non mater được đem phân tích bào tử. Các tính chất quan trọng như khả năng lên men LSD và HSD của các tế bào nhị bội (phân ly) được xác định. Trong số 96 bào tử chọn lọc từ các chủng loại 12uraHFS10.H, 12 dòng có khả năng lên men đường rất cao so với chủng gốc (tư liệu không công bố). Chúng đạt các tiêu chuẩn đối với nấm men bánh mì về thành phần trehalose, hoạt tính invertase, và khả năng tạo sinh khối tế bào. Trong số này, chúng tôi đã chọn ra 4 chủng tốt nhất là S4, S7, S38 và S77 (bảng 1). Hoạt tính lên men và các tính chất trên của 4 chủng được theo dõi với thể tích nuôi cấy tăng dần từ nuôi trong ống nghiệm 5ml, trong bình cầu 100ml, 200ml, 500ml và bình lên men 2 lít. Chủng S38 và S77 với những đặc tính tốt được chọn cho thí nghiệm làm bánh mì. Đặc biệt, kết quả đánh giá chất lượng bánh mì đã cho thấy chủng S77 không chỉ có thể dùng đối với bánh mì mạn, mà khả năng lên men đường của nó ở HSD cũng rất cao. Do đó, để chọn lọc được chủng có khả năng dùng cho sản xuất các loại bánh mì tổng hợp, chúng tôi đã tiếp tục cho chủng này lai với chủng nấm men công nghiệp của Nhật HF1366S10D bằng kỹ thuật rare-mating. Từ 72 bào tử chọn lọc của chủng lai 12S77HF1366S10D, chúng tôi đã chọn được 4 chủng có khả năng lên men đường rất tốt là S7, S39, S49 và S63. Trong số 4 chủng này S49 thể hiện khả năng lên men tốt cả ở điều kiện LSD và HSD, do đó S49 được chọn để tiến hành thí nghiệm làm bánh mì.

Bảng 2. Một số tính chất của các dòng tế bào lai 12* X HF1366S10.H, 12S77XHF1366S10D.H và 12XHF1164S16D.H

Hybrid	Bác tử	Kiểu giới tính	Tạo sinh khối (mg/ml)	Tạo CO ₂ (ml/2hr) LSD	Tạo CO ₂ (ml/2hr) HSD	Trehalose (%)	Invertase (U)
12*XHF1366S10.H	S4	non	34.8	26.8	32.1	11.96	11.55
	S7	non	36.0	33.0	24.8	10.80	45.23
	S38	a	35.6	27.2	33.7	8.75	15.42
	S77	non	37.0	31.1	28.7	12.01	52.54
S77XHF1366S10D.H	S7	non	39.88	30.0	27.5	8.19	46.24
	S39	non	39.48	30.7	33.1	8.66	45.02
	S49	non	40.12	35.1	22.0	8.68	46.35
	S63	non	39.96	33.9	33.1	8.34	42.16
12XHF1164S16D.H	S1	non	38.0	25.2	11.0	8.97	88.09
	S5	non	48.2	26.5	10.8	5.58	765.56
	S15	non	36.8	24.9	14.5	10.61	89.80

**A****B****Hình 2. Điện di ADN chromosome**

ADN chromosome toàn phần

ADN chromosome toàn phần

1. ADN S. cerevisiae; 2. HFS16D; 3. No. 12; 4. 12xHFS16D.H

3. Điện di đảo trường

Toàn bộ ADN chromosome và ADN chromosome kích thước nhỏ của các chủng lai nhận được sau khi lai được kiểm tra và so sánh với ADN của bố mẹ. Thí nghiệm được tiến hành theo các bước như sau :

1. *Chuẩn bị mẫu ADN:* được tiến hành theo phương pháp của Schwartz và Cantor, 1986, có một số cải tiến. Các tế bào lai và tế bào bố mẹ được nuôi cấy lắc 24 giờ trong môi trường YPD. Nồng độ tế bào được xác định trên máy quang phổ ở bước sóng 660nm. Sau khi hoà loãng ở nồng độ thích hợp, tế bào được đem ly tâm ở 12000 g trong 20 giây, rửa 2 lần với nước cất và hoà tế bào trong 120µl Tris-buffer. Hút 150µl dịch tế bào vào ống Eppendorf, chứa 5µl β -mercaptoethanol và 2µl dung dịch enzym zymolyase (100mg/ml). Bổ sung 250µl agarose 1% vào dịch tế bào và đổ gel. Gel được giữ trong đá 30 phút và chuyển vào ống nhựa đã khử trùng 500µl LET-buffer và 35µl β -mercaptoethanol. Ủ toàn bộ mẫu ở 37°C trong 24 giờ. Xử lý protease được tiến hành với 0.5ml dung dịch protease (2mg/ml), lắc nhẹ nhàng trong máy ổn nhiệt 50°C trong 24 giờ. Gel sau đó được rửa 2 lần với 1ml Tris-buffer, rồi tiếp tục ủ không lắc ở 50°C trong 1 giờ. Mẫu gel này có thể giữ ở 4°C.
2. *Điện di :* A CHEF Mapper™ và CHEF Mapper XA Pulsed field electrophoresis System (Bio-Rad, USA) được dùng để tách DNA chromosom. Các mẫu gel chứa DNA chromosom được chuyển vào giếng gel agarose 1% và điện di trong dung dịch 0.5% TBE (10X TBE buffer: 108g Tris base, 55g boric acid, 40ml 0.5M EDTA, pH 8.0). Điện di được tiến hành ở 14°C trong điều kiện: thời gian điện di 24 giờ, điện trường 6 V/cm, góc quay 120°, buffer 0.5x TBE, thời gian đổi cực đối với DNA chromosomal toàn phần là 60-90 giây, đối với DNA chromosomal kích thước nhỏ là 20-20 giây. Sau khi điện di, gel được nhuộm với ethidium bromide. ADN chuẩn được dùng là *S. cerevisiae* YNN295 chromosomes (Bio-Rad).

Kết quả điện di cho thấy mặc dù đối với điện di toàn phần ADN nhiễm sắc thể, ta cũng có thể thấy sự tương đồng về nhiễm sắc thể của bố mẹ và con cái, và cũng thấy một vài điểm khác nhau giữa bố mẹ hoặc con cái, dựa trên sự chuyển dịch của các vạch điện di, song rất khó có thể nhận biết các con lai. Trong thí nghiệm của chúng tôi, các con lai được phát hiện bằng điện di các nhiễm sắc thể có kích thước nhỏ, đặc biệt là nhiễm sắc thể III chứa gen xác định giới tính (MAT). Các con lai mang các đoạn ADN nhiễm sắc thể đặc trưng của bố và mẹ được phát hiện trên cơ sở so sánh vị trí các vạch của nhiễm sắc thể III của bố mẹ cũng như độ đậm nhạt của các vạch trên gel. Tất cả các con lai thu được trong thí nghiệm của chúng tôi đều khẳng định chúng có nguồn gốc từ bố mẹ chúng (ảnh điện di)

4. Thí nghiệm làm bánh mỳ

Các con lai S1, S15 (12XHF1164S16D.H) S38, S77 (12XHF1366S10.H) và S49 (12S77XHF1366S10.H) có nguồn gốc từ chủng No.12 được dùng thử nghiệm lên men bánh mỳ. Hai loại bánh mỳ mặn và ngọt được làm theo tiêu chuẩn bánh mỳ thử nghiệm

của Mỹ. Qua các thí nghiệm làm bánh mỳ bằng sử dụng các chủng lai nhận được ở trên, kết quả đánh giá chất lượng bánh mỳ cho thấy chủng S15 có nguồn gốc từ hybrid 12HF1164S16D.H đạt tiêu chuẩn làm nấm men bánh mỳ (bảng 2). Song so với chủng công nghiệp của Nhật thì chất lượng bánh mỳ còn kém, chủng này được giữ lại để tiếp tục nghiên cứu cải tiến chất lượng của chủng. S77 có nguồn gốc từ hybrid 12uraHF1366S10, được chấp nhận là chủng nấm men dùng cho sản xuất loại bánh mỳ mặn. Chủng S38 tuy khả năng lên men đường ở điều kiện HSD rất cao, song chất lượng bánh mỳ không đạt tiêu chuẩn. Chủng này được giữ lại để nghiên cứu tiếp, trường hợp này cũng tương tự đối với S49 (kết quả không công bố). Qua kết quả đánh giá, chúng tôi thấy rằng chủng S77 là chủng tốt nhất trong số những chủng mới tạo thành (bảng 2).

Bảng 2. Đánh giá chất lượng bánh mỳ làm với các chủng nấm men thí nghiệm

	12	HFS10D	12x S16D.H	12uraxHF S10.H	S1	S15	S38	S77	CY
Thể tích bánh(ml)	600	690	575	585	550	630	655	730	695
Trọng lượng bánh (gr)	152	146	151	149	150	147	149	147	148
Thể tích đặc hiệu	4.0	4.7	3.8	3.9	3.7	4.3	4.4	5.0	4.7
Đặc điểm bên ngoài bánh (50)									
Thể tích đặc hiệu (30)	10.0	17.0	10.0	10.0	10.0	13.0	14.0	20.0	17.0
Màu vỏ (10)	4.0	8.0	3.0	4.0	3.5	4.0	6.0	8.5	4.5
Độ đồng đều (5)	6.0	4.0	5.0	3.0	5.5	8.0	3.5	4.5	9.0
Đặc điểm vỏ (5)	4.0	4.0	3.5	3.0	3.5	4.2	4.0	4.5	4.5
Đặc điểm bên trong bánh (50)									
Độ xốp (10)	7.5	8.0	5.5	4.0	5.0	8.0	7.5	8.5	9.0
Màu ruột (5)	4.0	4.5	3.5	3.0	3.5	4.3	4.0	4.5	4.5
Độ dai (5)	3.7	4.0	3.5	3.0	3.0	4.3	3.8	4.5	4.5
Mùi (15)	10.0	13.0	8.0	8.0	8.0	12.5	10.0	13.0	14.0
Vị (15)	11.0	12.0	9.0	7.0	7.0	13.0	12.0	13.0	14.0
Tổng số điểm	61.2	74.5	51.0	45.0	49.0	71.3	64.8	81.0	81.0
Đánh giá chất lượng	D	C	E	E	E	C	D	B	B

A > 91

A: rất tốt

81<B<90

B: tốt

71<C<80

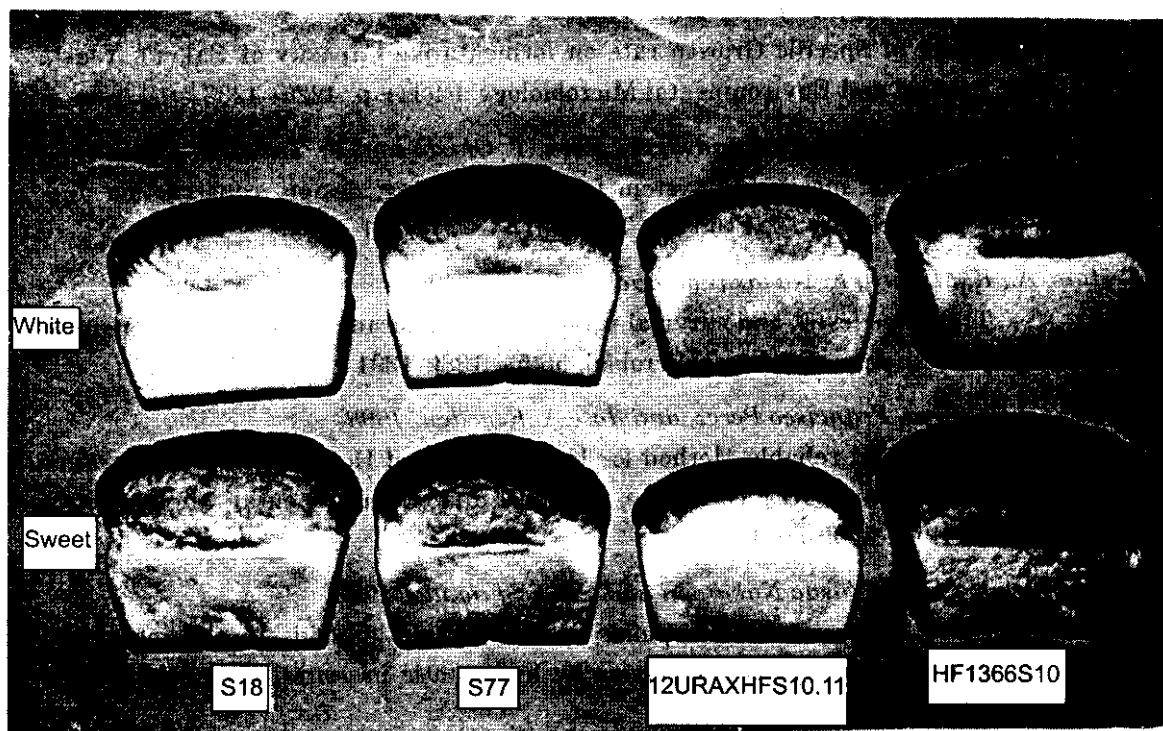
C: chấp nhận

61<D<70

D: xấu

E<60

E: rất xấu



Hình 3. Bánh mỳ được làm với chủng nấm men S77 so sánh với các các chủng bố mẹ và các chủng lai khác

Từ trái sang phải : S18, S77, 12ura x HFS10.H, HF1366S10
Trên : Bánh mỳ mặn Dưới : bánh mỳ ngọt

III. KẾT LUẬN

Nấm men tự nhiên của Việt Nam có nhiều ưu điểm phù hợp với yêu cầu cần có đối với chủng nấm men bánh mỳ, những nhược điểm của chúng như dung lượng tế bào nhỏ, khả năng lên men đường thấp... có thể được cải tạo bằng sử dụng phương pháp lai để tạo thành các chủng nấm men công nghiệp sản xuất bánh mỳ. Sau khi lai, khả năng lên men đường của chủng No.12 đã được cải tiến và có thể sử dụng các chủng mới S15 và S77 cho thử nghiệm sản xuất bánh mỳ mặn ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kienle I., Markus Burgert and Helmut Holzer, 1993.

Assay of trehalose with Acid Trehalase Purified from *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, Vol.9: 607-611.

2. Spencer J.F.T and Dorothy Spencer M., 1980.

The use of Mitochondrial Mutants in the Isolation of Hybrids Involving Industrial Yeast Strains. Molec. Gen. Genet. 177, 355-358.

3. *Pim Van Hoek, Johannes P Van Dijken and Jack T. Pronk, 1998.*
Effect of Specific Growth rate on fermentative Capacity of Baker's Yeast. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(11): p. 4226- 4233.
4. *Hino, A., H. Takano, N. Kitabayashi, F. Nitta, T. Ohishi and Y. Tanaka. 1988.*
Automatic measuring system for dough testing: design, construction and reproducibility. *J. Food Sci. Technol.* 35 : 344-351.
5. *Hino, A., K. Mihara, K. Nakashima and H. Takano, 1990.*
Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(5) : 1386-1391.
6. *Manuel Ramirez, Francisco Perez, and Jose A. Regodon, 1998.*
Simple and reliable Method for Hybridization of Homothallic Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(12) p. 5039-9041.
7. *Kazuhiro Hamada, Yasuo Nakatomi and Shoji Shimada, 1992.*
Direct induction of tetraploids or homozygous diploids in the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* by hydrostatic pressure. *Curr. Genet.* 22: 371-376.
8. *Naumov G., Naumova E., Korhola M., 1992*
Genetic identification of natural *Saccharomyces sensu stricto* yeasts from Filand, Holland and Slovakia. *Antonie van Leewenhoek* 61: 237-243.
9. *Codon A.C., Gasent- Ramirez J.M, Benitez T., 1995.*
Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* Baker's yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(2) p 630-638.
10. *Norio Gunge and Yasuo Nakatomi., 1972.*
Genetic mechanisms of rare matings of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* heterozygous for mating type. *Genetics*. 70: 41-58.
11. *Yuji Oda and Kozo Ouchi., 1990.*
Hybridization of baker's yeast by the rare-mating method to improve leaving ability in dough. *Enzyme Microb. Technol.* Vol 12, p 989-993.
12. *Bun-Ichiro Ono and Yumiko Ishino-Arao., 1988.*
Inheritance of chromosome length polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 14: 413-418.
13. *American Association of Cereal Chemists., 1983.*
Approved Methods of the AACC. AACC Methods 10-90. The Association : St. Paul, MN.
14. *Japan Yeast Industry Association., 1985*
(Revised Edition), Evaluation Method of Bakers' Yeast. P. 8,16.

15. Oda, Y. and K. Ouchi., 1990.

Effects of invertase activity on the leavening ability of yeast in sweet dough. Food Microbiology. 7 : 241-248.

16. Travecyan, W. E. and J. S. Harrison., 1956.

Studies on Yeast Metabolism. 1. The trehalose content of Baker's yeast during anaerobic fermentation. Biochem. J. 62 : 177-183

CONSTRUCTION OF HIGH SUGAR-FERMENTABLE BAKER'S YEAST BY RARE-MATING TECHNIQUE

Pham Thuy Hong, Yasuo Nakatom, Hiroyuki Takano

SUMMARY

Rare-mating technique has been used for hybridization of Vietnamese prototrophic yeasts with Japanese industrial yeasts to construction sugar fermentable baker's yeast. The new constructed strains that have higher sugar fermentation ability compared to their parents. They have been accepted as baker's yeasts

1.0.26

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU LÊN MEN VANG TỪ QUẢ VẢI THIÊU (*Litchi chinensis*)

Nguyễn Quang Thảo, Nguyễn Thành Đạt, Nguyễn Quang Hào
KHOA SINH HỌC - TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM HÀ NỘI

I. MỞ ĐẦU

Vang (còn gọi là rượu chát, rượu nho...) đã được biết đến từ thời Ai Cập cổ đại khi con người lần đầu tiên biết sử dụng đồ uống lên men tự nhiên từ dịch trái nho. Song phải đến hàng ngàn năm sau nhờ có sự phát triển mạnh mẽ của khoa học, kỹ thuật mà việc sản xuất vang mới trở thành nghề sản xuất thực sự mang tính thương mại tại nhiều quốc gia thuộc châu Âu, châu Mỹ... Cho đến nay việc sản xuất vang đã trở thành một trong những ngành sản xuất lớn, mang lại hiệu quả kinh tế rất cao ở nhiều quốc gia như: Pháp, Italia, Nga, Đức, Bungari, Mỹ, Argentina, Australia... với tổng sản lượng ≈ 29 tỉ lít/năm [6]

Trước kia nguồn nguyên liệu để sản xuất vang ở hầu hết các quốc gia chỉ là quả nho chín được thu hoạch từ một số giống nho đã được tuyển chọn kỹ dành riêng cho sản xuất vang và chỉ được trồng ở một số vùng nhất định [8]. Ngày nay, do sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ sinh học nhất là các lĩnh vực: sinh hóa, vi sinh học,... mà nguồn nguyên liệu để sản xuất vang cũng đã chuyển dần sang một số loại quả khác: dâu, mơ, đào, sherry, táo, lê, dưa... Vì vậy, trên thị trường vang quốc tế hiện nay có tới hàng trăm loại vang khác nhau mang những nét đặc trưng riêng của từng hãng, từng nguyên liệu sản xuất, từng quốc gia và từng khu vực.

Ở Việt Nam, ngành sản xuất vang mới thực sự bắt đầu từ những năm 80 của thế kỷ 20 được đánh dấu bằng sự hiện diện của vang mang nhãn hiệu Thăng Long trên thị trường nội địa. Cho đến nay, nguồn nguyên liệu chủ yếu để sản xuất vang của Việt Nam chủ yếu là một số loại quả nho, dâu, dưa, táo, sơn tra [2][6] với sản phẩm chủ yếu là loại vang bàn án có màu đỏ.

Thực tế sản xuất vang tại Việt Nam cho thấy: phần lớn các loại quả có chứa đường, axit và không độc hại thì đều có thể được sử dụng để lên men vang. Song để có được loại vang chất lượng cao thì không phải bất kỳ loại quả nào cũng có thể sử dụng để sản xuất vang được. Vì vậy, việc lựa chọn nguyên liệu phù hợp với yêu cầu của công nghệ và chất lượng sản phẩm đã và đang là vấn đề cấp thiết đối với ngành sản xuất vang của Việt Nam. Mặt khác, thực tế cho đến nay ngành sản xuất vang cũng chưa có được một quy trình công nghệ hoàn thiện để sản xuất được loại vang có chất lượng cao như nhiều quốc gia khác[3][6]. Đó cũng là mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi.

Sau nhiều năm nghiên cứu khảo sát, thực nghiệm... chúng tôi đã chọn quả Vải thiều làm đối tượng nghiên cứu sản xuất vang tại Việt Nam bởi lẽ:

- Đây là loại quả hiện đang được trồng ở hầu hết các tỉnh phía Bắc với tổng sản lượng quả cho thu hoạch đạt tới hàng chục ngàn tấn/năm và vẫn đang tiếp tục tăng nhanh trong những năm tới đây, trong khi nhu cầu sử dụng để ăn trực tiếp và đóng hộp chỉ chiếm khoảng 20% tổng sản lượng. Đây cũng là mối lo lớn nhất của hầu hết các địa phương trồng Vải thiều, trong khi hầu như chưa có công nghệ chế biến cho quả Vải thiều tại Việt Nam.
- Kết quả phân tích một số thành phần hóa học cơ bản của quả Vải thiều như: hàm lượng đường, axit, khoáng, vitamin... cho thấy hoàn toàn có thể sử dụng quả Vải thiều để sản xuất vang được[5]. Vì vậy mục đích của chúng tôi là: Trên cơ sở phân tích thành phần hóa học cơ bản của quả Vải thiều để xây dựng quy trình công nghệ sản xuất vang từ quả Vải thiều ở quy mô thí nghiệm và sản xuất thực nghiệm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu và hóa chất

Nguyên liệu chính là dịch quả Vải thiều được chúng tôi lấy mẫu tại hai trung tâm trồng và thu hoạch Vải thiều lớn nhất toàn quốc là huyện Lục Ngạn (Bắc Giang) và huyện Thanh Hà (Hải Dương). Thời điểm thu mua và chế biến dịch quả là lúc chính vụ thu hoạch. Quả vải sau khi rửa sạch tách bỏ toàn bộ vỏ và hạt chúng tôi thu lấy phần thịt quả sau đó tiếp tục thu hồi lấy dịch ép nước quả bằng máy xay ly tâm [5].

- Đường Saccharose của công ty đường Lam Sơn (Thanh Hóa).
- Metabisulfite de potassium (BAKTOL- C.H.Pháp).
- Bình thủy tinh có dung tích 10lit, 20lit và nổi lên men có dung tích 1000 lit, 3000 lit và 5000 lit.
- Enzym Depectil Extraction (Martin Vialatte- C.H.Pháp).
- Bentonite (Mỹ) và Albumin lòng trắng trứng.
- Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* LT2 do chúng tôi phân lập từ dịch ép quả Vải thiều.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác định hàm lượng đường tổng số và đường khử bằng phương pháp Bectrand[1].
- Xác định hàm lượng axit tổng số bằng phương pháp chuẩn độ NaOH 0,1N với chỉ thị màu là phenolphtalein.
- Xác định hàm lượng axit bay hơi bằng phương pháp lôi cuốn bởi hơi nước [1].

- Xác định hàm lượng cồn bằng phương pháp gián tiếp dùng bình tỷ trọng [1] và bằng máy Density/ Specific Gravity Meter của hãng Kyoto Electronic MFG Co-ltd Japan.
- Xác định hàm lượng pectin bằng phương pháp Canxipectat [1].
- Xác định hàm lượng oxy trong dịch lên men bằng máy đo oxy (Hãng ORION-Đức).
- Xác định pH bằng máy đo pH (BASIC- Mỹ).
- Xác định độ trong của sản phẩm qua chỉ số OD (optical density) bằng máy Beckman (Mỹ) ở bước sóng 600nm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thành phần cơ bản của dịch thịt quả Vải thiều

Dịch thịt quả Vải thiều sau khi được xử lý và phân tích một số chỉ tiêu cơ bản, chúng tôi thu được kết quả như sau (bảng1):

Bảng 1. Thành phần hóa học cơ bản của thịt quả Vải thiều:[5]

TT	Thành phần hóa học	Đơn vị	Kết quả	TT	Thành phần hóa học	Đơn vị	Kết quả
1	Đường tổng số	g/l	161± 0,3	9	Protein toàn phần	%	0,7± 0,04
2	Đường khử	g/l	103,5± 0,2	10	Tro	%	0,44± 0,1
3	Saccharoza	g/l	55,6±0,4	11	Nước	%	84,28±0,5
4	Axit tổng số	g/l	5,16± 0,01	12	Vitamin C	mg%	38,5± 0,5
5	Axit tartric	g/l	1,69 ± 0,02	13	Tanin	g/l	0,83± 0,02
6	Axit malic	g/l	0,42± 0,02	14	Pectin	g%	0,249± 0,003
7	Axit Citric	g/l	2,00± 0,03	15	pH		3,98± 0,03

Kết quả phân tích cho thấy:

- Hàm lượng đường tổng số≈161g/l (Trong đó đường khử đạt tới ≈103,5g/l):rất phù hợp cho sự sinh sản và phát triển của nấm men.
- Hàm lượng axit tổng số là ≈ 5,16g/l (trong đó axit tartric đạt 1,69g/l, còn axit malic chỉ có ≈ 0,42g/l) và độ pH của dịch quả Vải thiều ≈ 3,98 là những chỉ tiêu rất phù hợp với chất lượng của sản phẩm và công nghệ sản xuất vang [8][10][12].

2. Lên men vang từ dịch quả Vải thiều

1. Xử lý dịch quả

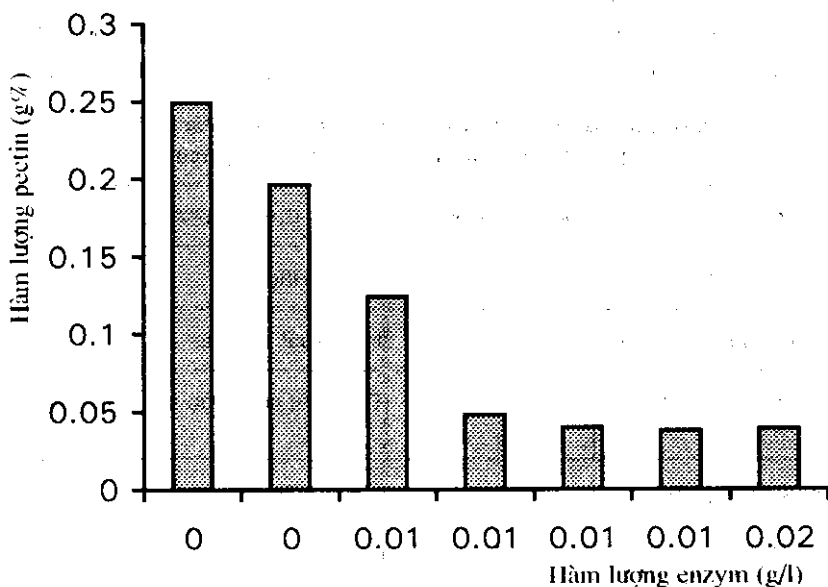
Đây là khâu quan trọng và quyết định cơ bản đến chất lượng vang thành phẩm [2][8]. Để có dịch lên men có chất lượng cao, chúng tôi tập trung giải quyết hai vấn đề chủ yếu là làm giảm lượng pectin có trong dịch lên men đồng thời hạn chế sự tạp nhiễm của vi sinh vật trong quá trình xử lý bằng 2 biện pháp kỹ thuật:

- *Sử dụng enzym pectinaza để phân giải pectin:* Qua khảo sát và thí nghiệm sử dụng một số enzym phân giải pectin trên thị trường Việt Nam, chúng tôi chọn enzym Depectil Extraction (Martin Vialatte- C.H. Pháp) để tiến hành các thí nghiệm phân giải pectin có trong dịch ép thịt quả Vải thiều ở điều kiện nhiệt độ: 52-54°C, pH của dịch: 3,8-4,0, thời gian: 120 phút [4][7]. Kết quả thu được như sau: (bảng 2 và hình 1)

Bảng 2. Tác động của enzym Depectil extraction đến hàm lượng pectin trong dịch quả Vải thiều

Hàm lượng enzym g/l	0	0,003	0,005	0,008	0,01	0,12	0,015
Hàm lượng pectin g%	0.249	0.196	0.124	0.480	0.400	0.380	0.039

Khi sử dụng enzym Depectil Extraction ở hàm lượng 0,01- 0,012g/l dịch quả thì mức độ phân giải pectin là tốt nhất. dịch quả trong và thơm hơn mẫu đối chứng, màu dịch quả vàng rơm nhạt, sáng hơn mẫu đối chứng.



Hình 1. Tác động của enzym Depectil extraction đến hàm lượng pectin trong dịch quả Vải thiều.

Căn cứ vào kết quả thí nghiệm theo chúng tôi có thể dùng enzym Depectil Extraction (C.H.Pháp) để phân giải pectin trong dịch quả Vải thiều sẽ cho sản phẩm có

chất lượng cảm quan và màu sắc phù hợp hơn. Vì vậy trong các thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi tiếp tục sử dụng enzyme với liều lượng 0,01-0,012g/l để sử lý dịch quả Vải thiều.

• *Sử dụng metabisulfite de potassium*: để hạn chế tối đa sự nhiễm khuẩn trong quá trình sử lý dịch quả, chúng tôi đã sử dụng Metabisulfite de potassium với hàm lượng 0,2g/l dịch quả, và bổ sung ngay sau khi sử lý dịch quả bằng enzyme pectinaza. Kết quả cho thấy với hàm lượng của Metabisulfite de potassium là 0,2g/l dịch quả hầu như không ảnh hưởng tới sự sinh sản phát triển của nấm men và chất lượng của vang thành phẩm[8][9][12].

2. Nhân giống và chuẩn bị dịch lên men vang

- Chúng tôi sử dụng chủng nấm men *Sacchromyces cerevisiae* LT2 do chúng tôi phân lập được từ dịch quả Vải thiều và tiến hành nhân giống trên môi trường dịch quả Vải thiều trong thời gian 24÷32 giờ trên máy lắc 150vòng/phút.
- Dịch lên men Vải thiều: chính là dịch ép quả Vải thiều sau khi đã tiến hành phân giải pectin và bổ sung Metabisulfite de potassium. Để đạt độ cồn như mong muốn, chúng tôi đã bổ sung đường saccharo ở dạng siro đặc để hàm lượng đường tổng số trong dịch lên men đạt: 200g/l.

3. Lên men vang ở quy mô thí nghiệm

Dịch lên men được tiếp giống nấm men với tỉ lệ 10% và được lên men trong các bình thủy tinh có dung tích 10lit, 20lit ở điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ lên men 28- 32°C, hàm lượng oxy ban đầu trong dịch lên men từ 3,5-4,0mg/l. Theo dõi quá trình lên men và lắng trong sản phẩm, chúng tôi thu được kết quả sau: (bảng 3)

Bảng 3. Kết quả lên men vang từ dịch quả Vải thiều ở quy mô thí nghiệm trong bình thủy tinh có dung tích 10lit và 20lit

Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Kết quả	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Kết quả
Thời gian lên men	giờ	96÷102	Hàm lượng cồn	%V	11,76
Hàm lượng đường ban đầu	g/l	200	Hiệu suất lên men	%	91,34
Hàm lượng đường sót	g/l	6,3	Độ trong của rượu sau 30 ngày	OD (600nm)	0,120
Hàm lượng đường khử	g/l	5,2	Cảm quan		Thơm, đặc trưng
Hàm lượng axit tổng số	g/l	5,24	pH (khi kết thúc lên men)		3,74
Hàm lượng axit bay hơi	g/l	0,36			

Kết quả lên men cho thấy: Thành phần hóa học cơ bản của dịch quả Vải thiều phù hợp với sự sinh sản, phát triển của chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* LT2, thời

gian lên men 90-102 giờ, hiệu suất lên men đạt 91,34% và độ trong của sản phẩm có giá trị $OD_{600nm} = 0,120$ là phù hợp với công nghệ lên men vang[8][9][11].

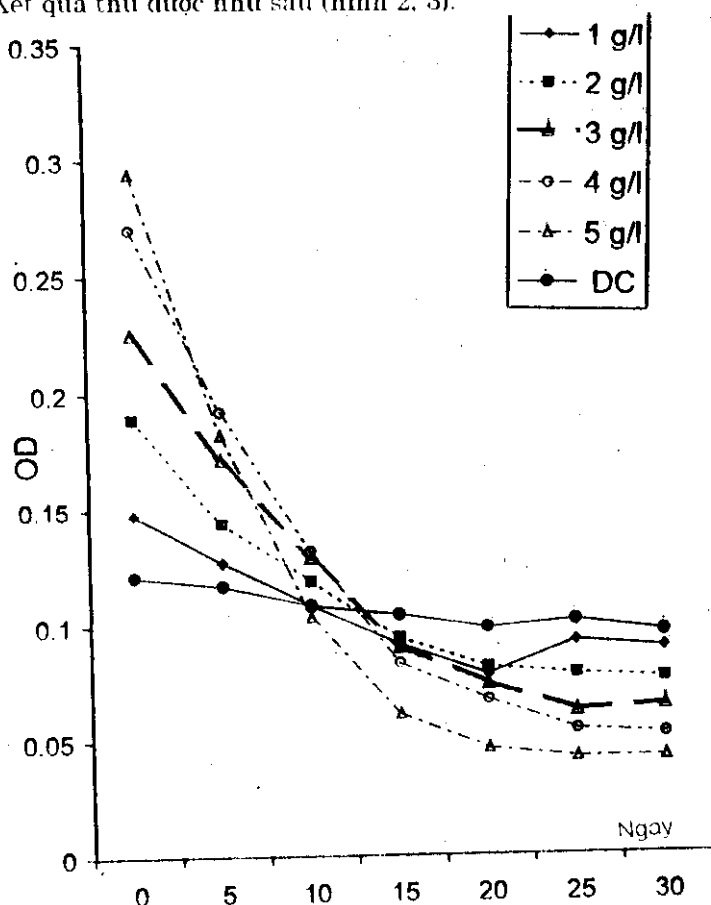
Trong quá trình tiến hành lên men vang từ dịch quả Vải thiều, chúng tôi không chủ động tiến hành lên men Malolactic theo công nghệ lên men vang từ quả nho, bởi lẽ: Hàm lượng axit malic trong dịch quả Vải thiều rất thấp (chỉ có 0,42g/l) hầu như không ảnh hưởng xấu tới chất lượng cảm quan của sản phẩm.

4. Lắng trong vang

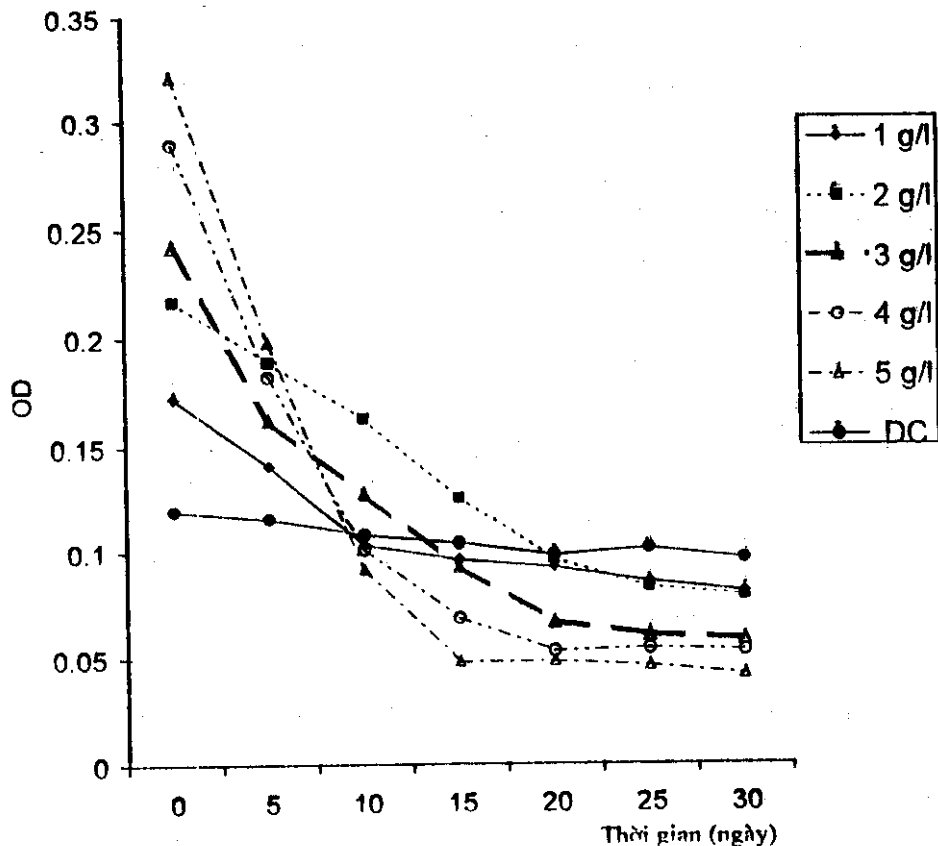
Để rút ngắn thời gian lắng trong của vang trong giai đoạn tàng trữ, chúng tôi đã sử dụng Bentonite (Mỹ) và Albumin (lòng trắng trứng) để tiến hành các thí nghiệm bằng cách: loại bỏ hết cặn ở đáy bình lên men (sau khi kết thúc lên men khoảng 45 ngày), chỉ thu lấy phần vang đã đạt độ trong tương đối để tiến hành các thí nghiệm lắng trong vang. Các thí nghiệm được bố trí thành 3 lô:

- Lô thứ nhất là lô đối chứng (kí hiệu là ĐC): không bổ sung chất lắng trong.
- Lô thứ 2 là lô thí nghiệm bổ sung Bentonite để lắng trong (kí hiệu là B).
- Lô thứ 3 là lô thí nghiệm bổ sung Albumin để lắng trong (kí hiệu là A).

Hàm lượng chất lắng trong là : 1, 2, 3, 4, 5 g/l vang non. Tiến hành đo OD trên máy BECKMAN (Mỹ) ở bước sóng 600 nm tại các thời điểm : 5, 10, 15, 20, 25, 30 ngày. Kết quả thu được như sau (hình 2, 3).



Hình 2. Hàm lượng bentonite và thời gian lắng trong vang Vải thiều



Hình 3. Hàm lượng albumin và thời gian lắng trong vang Vải thiều.

Kết quả trên cho thấy:

Khi sử dụng Bentonit và Albumin ở hàm lượng càng cao thì thời gian lắng trong của vang càng ngắn, độ trong càng tốt hơn. Tuy nhiên ở hàm lượng Bentonit 5g/l thì màu sắc và vị của vang lại giảm đi rõ rệt, còn ở hàm lượng Albumin là 5g/l thì gây hiện tượng dư thừa albumin trong vang. Vì vậy, theo chúng tôi chỉ nên dùng Albumin ở hàm lượng 3-4g/l còn đối với Bentonit chỉ nên dùng ở hàm lượng 3g/l là phù hợp với chất lượng vang thành phần, và thời gian để lắng trong hoàn toàn không nên ít hơn 30 ngày. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Quỳnh Vân và cộng sự [6], Rodopitilo.A.K [12]

5. Lên men vang ở quy mô thực nghiệm

Dựa trên các kết quả lên men vang từ dịch quả Vải thiều ở quy mô thí nghiệm, chúng tôi tiếp tục lên men vang Vải thiều ở qui mô thực nghiệm trong các nôi lên men bằng inox có dung tích: 1000, 3000 và 4500lit.

Dịch lên men được chúng tôi bổ sung thêm đường Saccharose (ở dạng siro) cho tới khi đạt các mức độ: 200g/l, 240g/l, 280g/l, 300g/l, còn các chỉ tiêu khác vẫn giữ nguyên như khi tiến hành thí nghiệm ở qui mô 10lit và 20lit. Theo dõi quá trình lên men và phân tích một số chỉ tiêu hóa lý, cảm quan đối với sản phẩm, chúng tôi thu được kết quả như sau (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả lên men vang từ dịch quả Vải thiều ở một số nồng độ đường khác nhau trong các tank inox có dung tích 300 lít và 5000lít

TT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Hàm lượng đường trong dịch lên men (g/l)			
			200	240	260	300
1	Thời gian lên men	giờ	98-104	102-108	112-120	118-130
2	Hàm lượng đường sót	g/l	8,0	18,6	42,8	70,8
3	Hàm lượng đường khử	g/l	6,4	14,3	43,7	53,8
4	Hàm lượng axit tổng số	g/l	5,2	5,26	5,29	5,47
5	Hàm lượng axit bay hơi	g/l	0,35	0,38	0,4	0,67
6	Hàm lượng cồn	%V	11,62	13,69	14,32	14,6
7	Hiệu suất lên men	%	90,26	88,61	85,56	75,6
8	Độ trong của sản phẩm sau 30 ngày	OD	0,123	0,131	0,153	0,176
9	pH sau khi kết thúc lên men		3,74	3,72	23,72	3,58
10	Màu sắc		Vàng rơm	Vàng rơm	Vàng rơm	Vàng rơm
11	Hương vị		Thơm	Thơm	Thơm	Thơm

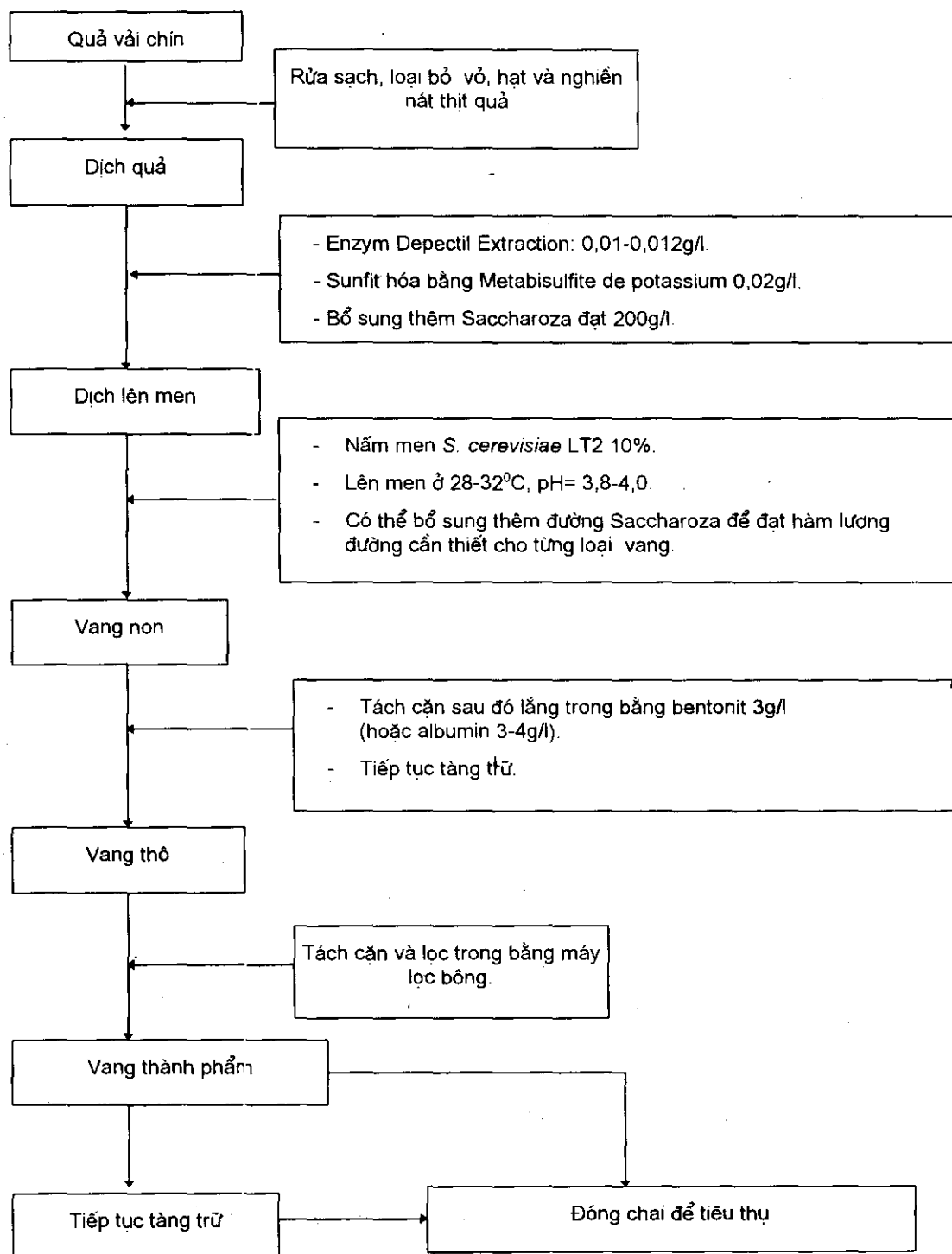
Kết quả phân tích cho thấy :

- Khi hàm lượng đường trong dịch lên men càng cao thì thời gian lên men càng kéo dài, hàm lượng đường sót càng tăng, hàm lượng axit tổng số và axit bay hơi đều tăng, hiệu suất lên men và độ trong của vang lại càng giảm.
- Điều này hòa toàn phù hợp vì hàm lượng đường trong dịch lên men càng cao thì áp suất thẩm thấu càng lớn sẽ ức chế sự phát triển của nấm men và hạn chế quá trình tạo cồn [3].
- Mẫu vang lên men từ dịch lên men có hàm lượng đường tổng số 200g/l có hiệu suất lên men cao nhất (90,26%), độ cồn 11,62%V, axit tổng số 5,2g/l, hàm lượng đường sót 8g/l - tương đương với loại vang bàn ăn.
- Mẫu vang lên men từ dịch lên men có hàm lượng đường tổng số 260g/l có độ cồn 14,32%V, hàm lượng axit tổng số 5,29. hàm lượng đường sót 42,8g/l - tương đương với loại vang điểm tâm. Đó là hai mẫu vang có giá trị cảm quan khá tốt.

IV. QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VANG TỪ QUẢ VẢI THIỀU

Tổng hợp các kết quả nghiên cứu ở quy mô thí nghiệm và sản xuất thử nghiệm tại một số cơ sở sản xuất vang như Xí nghiệp rượu bia Haba, Viện nghiên cứu Rượu - Bia -

Nước giải khát bước đầu chúng tôi đã xác định được quy trình công nghệ sản xuất vang từ quả Vải thiều theo sơ đồ tóm tắt như sau:



V. KẾT LUẬN

1. Kết quả phân tích cho thấy: Trong dịch ép của dịch quả Vải thiếu có chứa hàm lượng đường tổng số 160g/l, trong đó hàm lượng đường khử $\approx 103,5\text{g/l}$, hàm lượng axit tổng số $\approx 5,16\text{g/l}$ (trong đó axit tartric $\approx 1,69\text{g/l}$), độ pH của dịch 3,8-4,0 là những chỉ tiêu cơ bản rất phù hợp với công nghệ lên men vang từ quả Vải thiếu.
2. Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* LT2 do chúng tôi phân lập được từ dịch ép của thịt quả vải thiếu hoàn toàn đáp ứng được các yêu cầu của công nghệ lên men và chất lượng cao của sản phẩm.
3. Để hạn chế hàm lượng pectin trong dịch lên men và tăng giá trị cảm quan của vang sản xuất từ quả Vải thiếu, theo chúng tôi, việc sử dụng enzym Depectil Extraction (C.H.Pháp) ở hàm lượng: 0,01-0,012g/l dịch thịt quả là cần thiết và phù hợp.
4. Để tăng độ lắng trong và rút ngắn thời gian tàng trữ đối với vang sản xuất từ quả Vải thiếu, sau khi kết thúc lên men 40-45 ngày có thể sử dụng: Bentonit ở hàm lượng 3g/l (hoặc Albumin ở hàm lượng 3-4g/l) làm chất phụ gia lắng trong.
5. Để sản phẩm có chất lượng cao, ổn định lâu dài thì thời gian tàng trữ đối với vang Vải thiếu không nên ít hơn 8 tháng (kể từ khi kết thúc quá trình lên men) trong thời gian tàng trữ cần tiến hành tách cặn thường xuyên.
6. Quy trình sản xuất vang từ quả Vải thiếu như chúng tôi đề xuất là phù hợp với thực tiễn sản xuất vang tại Việt Nam hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Đạt, Ngô Văn Tâm, 1974.
Phân tích lương thực thực phẩm. Bộ Lương thực và Thực phẩm. Hà Nội (52, 53, 126, 127, 230).
2. Vũ Công Hậu, 1992.
Chế vang trái cây trong gia đình. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. Hà Nội (11-16, 41- 46).
3. Nguyễn Quang Hào, Nguyễn Quang Thảo, Trần Quý Thắng. 1998.
Nâng cao chất lượng vang Việt Nam. Báo cáo-nghiệm thu đề tài khoa học. Hà Nội.
4. Lê Phương Thảo, 1997
Nghiên cứu sử dụng enzym để chế biến nước quả từ một vài loại quả của Việt Nam. Luận văn tốt nghiệp đại học. ĐHBK. Hà Nội (18,19,22-24).

5. Nguyễn Quang Thảo, Lê Văn Nhương, Nguyễn Thành Đạt, 1999.

Phân tích thành phần cơ bản của quả Vải thiều (*litchi chinensis*) ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. Thông báo khoa học. ĐHSP. ĐHQG Hà Nội. ISSN 0868-3719. Số 4-1999 (81-85).

6. Nguyễn Quỳnh Vân, Nguyễn Văn Việt, Nguyễn Quang Thảo, Nguyễn Thu Vinh, Tào Thành Nam, 1999.

Nghiên cứu hoàn thiện quy trình nâng cao chất lượng vang từ hoa quả nhiệt đới. Báo cáo tổng kết nghiệm thu đề tài cấp Bộ. Viện nghiên cứu Rượu- Bia- NGK. (5-16,48-50).

7. V.L. Kretovito, V.L. Larovenko, 1982

Sử dụng chế phẩm enzym trong công nghệ thực phẩm. NXB Khoa học và Kỹ thuật.

8. Amerine. M. A and Cruess. W.V., 1960.

The Technology of Wine making. The avi publishing company. Inc. (21- 23, 92- 94).

9. Carrousel. L.

Wine and spirits of France. Sopexa 43-45 Racde naples. Paris (p.5- 10).

10. Gerasimov. M. A., 1964.

Công nghệ vang. Công nghiệp Thực phẩm Maxcova (74-91). *Bản tiếng Nga*.

11. Kiskovkij. D.N, Skyrikhin.I.M., 1976

Hóa học của vang. Công nghiệp thực phẩm. Maxcova (132-146). *Bản tiếng Nga*.

12. Rodopulo. A. K., 1983

Hóa sinh học cơ bản trong sản xuất vang. Công nghiệp nhẹ và thực phẩm. Maxcova (158- 172, 310-340) (*tiếng Nga*).

SOME STUDYING RESULTS IN WINE MAKING FROM LYCHEE FRUITS

Nguyen Quang Thao, Nguyen Thanh Dat, Nguyen Quang Hao

SUMMARY

Wine has been produced several thousand years before in many states of the world with traditional material source as ripen grape growed in particular regions. Nowadays, some different sorts of fruit such as mulberries, pineapples, apples, pears, apricots,... have used for wine making.

In Vietnam, yield of lychee fruit obtained several thousand tones per year but consumption ability of them only is 20 per cent, other parts were not used effectively, because the lack of harvested lychee processing technology.

After several years, lychee wine was researched and produced experimentaly in HaBa Brewery, The Research institute of Brewing. The first step we attacked some following results:

1. Composition of lychee pulp suit for technology processing of wine making can make high quality wine.
2. Strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* LT2 were isolated from lychee must on natural collected regulation by us, it absolutely accord with requirement of technology and quality of production.
3. Setting up technology processing of wine making form lychee fruits, with our proposition, accordance with practical wine making in Vietnam.

1.0.27

NGHIÊN CỨU CỐ ĐỊNH CÁC TẾ BÀO NẤM MEN TRONG CA-ALGINAT ĐỂ LÊN MEN RƯỢU VANG

Giang Thế Bình⁽¹⁾, Giang Thế Việt⁽¹⁾,
Đặng Hồng Ánh⁽¹⁾, Đặng Kim Tuyền⁽¹⁾, Nguyễn Thị Hiền⁽²⁾

(1): VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

(2): TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

I. MỞ ĐẦU

Kỹ thuật cố định xúc tác sinh học nói chung và cố định tế bào nói riêng tuy mới ra đời nhưng đã có nhiều ứng dụng quan trọng trong nhiều lĩnh vực khoa học và đời sống. Trong những năm gần đây, việc cố định tế bào đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu (2,3,7,8,9,12,13,15). Quan điểm chung của họ là: cố định tế bào có lợi hơn cố định enzym ở chỗ cố định được cả một hệ thống đa enzym hoặc cố định được cả các enzym mà trong thực tế rất khó phân tách hoặc phân tách được thì giá thành cũng rất cao. Đã có khá nhiều công trình nghiên cứu đề cập đến việc sử dụng các tế bào cố định để lên men đồ uống, trong đó có vang và sâm banh (5,6,10,11,14,16,21). Trên cơ sở đó, nhiều dây chuyền thiết bị có qui mô từ nhỏ tới lớn đã ra đời và ít nhiều thương mại hoá, bước đầu khẳng định tính ưu việt của công nghệ mới so với công nghệ truyền thống. Đó là hệ thống thiết bị không phức tạp lắm và xúc tác sinh học có thể sử dụng liên tục trong thời gian dài (4,18,19,20). Hơn nữa, lên men vang hoặc sâm banh nhờ các tế bào cố định diễn ra nhanh hơn, thu được sản lượng cồn cao hơn, ít phụ phẩm hơn và dễ làm trong hơn so với lên men nhờ tế bào tự do. Trong công trình nghiên cứu này, các tác giả trình bày một số kết quả của việc ứng dụng kỹ thuật cố định các tế bào nấm men trên chất mang Ca-alginat là chất rất dễ kiếm và có thể sản xuất được ở trong nước dùng cho lên men vang quả của Việt Nam.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Giống vi sinh vật

Sử dụng các chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* với các ký hiệu là Tva, Tvb, Lv7, SLS có trong bộ sưu tập giống của Bộ môn công nghệ đồ uống thuộc Viện Công nghiệp Thực phẩm.

Các tác giả chân thành cảm ơn Viện 69 Bộ Tư lệnh láng Chủ tịch Hồ Chí Minh, Trung tâm kỹ thuật 1, Tổng cục tiêu chuẩn đo lường chất lượng, Phòng hoá sinh protein Viện công nghệ Sinh học, Bộ môn phân tích và giám định thực phẩm Viện Công nghiệp Thực phẩm đã nhiệt tình giúp đỡ chúng tôi trong khi thực hiện công trình nghiên cứu này.

2. Các loại môi trường điều kiện nhân giống, lên men, cố định tế bào nấm men và xử lý dịch men

Như đã trình bày trong luận văn của Giang Thế Việt (22)

3. Phân tích

Quan sát trạng thái nấm men nhờ kính hiển vi quang học Carton hoặc kính hiển vi điện tử cắt lớp JEOL-JSM 5410; phân biệt tế bào sống với tế bào chết nhờ xanh methylen. Chụp ảnh hạt Ca^{+2} - alginat gel nhờ kính hiển vi điện tử cắt lớp JEOL-JSM 10 LV, Nhật. Xác định tế bào nấm men nhờ buồng đếm Thomas. Khi xác định lượng tế bào trong hạt, thì lấy một lượng hạt nhất định, rửa sạch rồi xử lý với dung dịch xitrat- Na 5% trong 30 phút sau đó pha loãng và đếm. Xác định tế bào sống bằng cách nuôi và đếm số khuẩn lạc thực mọc trên đĩa thạch rồi nhân với hệ số pha loãng. Xác định pH nhờ máy Mettler-TOLEDO 320 của Anh. Xác định độ đục OD (optical density): nhờ máy so màu Trung Quốc 722, $\lambda = 630$ nm không pha loãng đối với dịch men tế bào cố định và pha loãng 5 lần đối dịch men tế bào tự do. Xác định hàm lượng chất khô nhờ chiết quang kế cầm tay (Đức). Xác định nồng độ cồn nhờ máy DUJARDIN - SALLERON. Xác định lượng CO_2 thoát ra trong quá trình lên men theo phương pháp cân trọng lượng trên cân điện tử OHOUS USA. Xác định hàm lượng andehyt, ester và cồn bậc cao nhờ máy sắc ký khí Shi-madzu LZC8A, Nhật. Xác định hàm lượng axit amin nhờ máy sắc ký axit amin HP-Amino Quant II, Nhật. Xác định thành phần axit hữu cơ trong vang nhờ máy sắc ký lỏng cao áp Shimadzu, Nhật. Xác định axit tổng theo phương pháp chuẩn độ bằng NaOH 0,1N. Xác định đường khử theo phương pháp DNS (dinitro-salicylic). Xác định Ca^{+2} và Na^{+1} nhờ máy quang phổ hấp thụ nguyên tử (22).

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Chọn giống

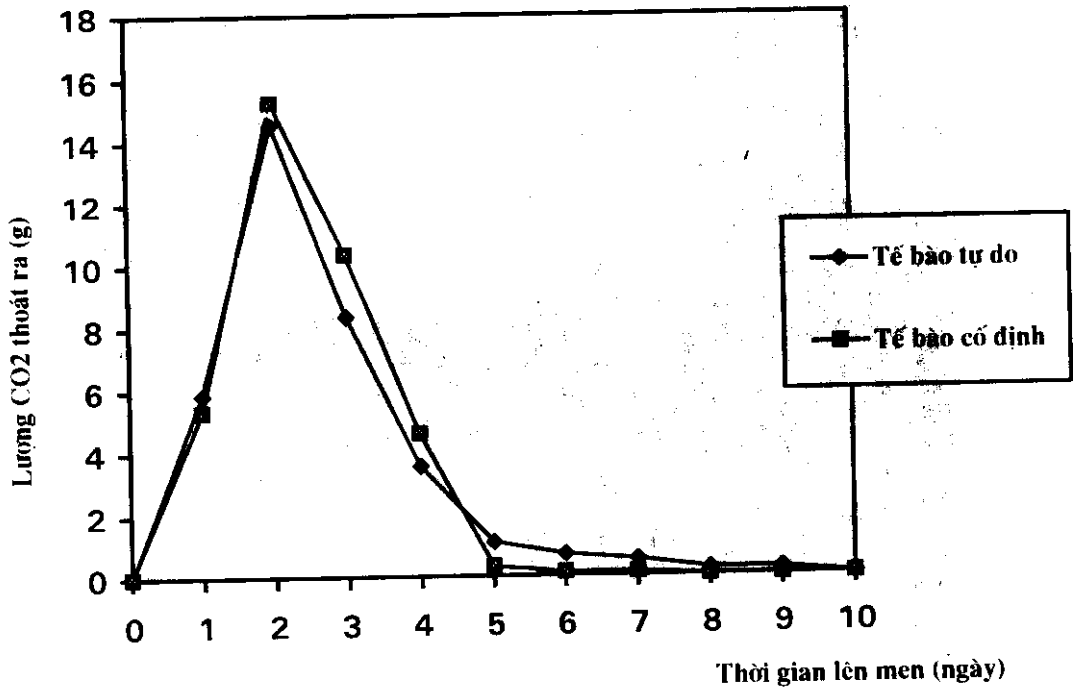
Lên men song song bốn loại tế bào cố định cùng tế bào tự do 10 ngày ở 28°C , pH ban đầu 4,5 nồng độ đường đầu 20% trong bình tam giác 500 ml có nút cổ cong chứa dung dịch glycerine. Lượng CO_2 thoát ra sau 24 giờ lên men được ghi ở bảng 1, hình 1, 2: Hình ảnh hạt cố định trước và sau lên men được ghi ở hình 3 và 4.

Số liệu cho thấy tế bào cố định lên men nhanh hơn tế bào tự do (cố định 7 ngày, tự do 9 ngày), nhất là vào ngày thứ hai và ba; tế bào cố định tiêu hao đường nhanh hơn và tạo nhiều cồn hơn tế bào tự do mặc dầu hiệu suất chuyển hoá tương tự nhau. Điều đó chứng tỏ tế bào cố định có khả năng lên men kiệt đường hơn tế bào tự do; dịch men tế bào cố định trong nhanh hơn (sau 3 ngày) dịch men tế bào tự do (sau 7 ngày) và độ trong ở tế bào cố định luôn trong hơn so với độ trong ở tế bào tự do. Dịch men dùng tế bào cố định có mùi thơm rõ rệt hơn dịch men dùng tế bào tự do.

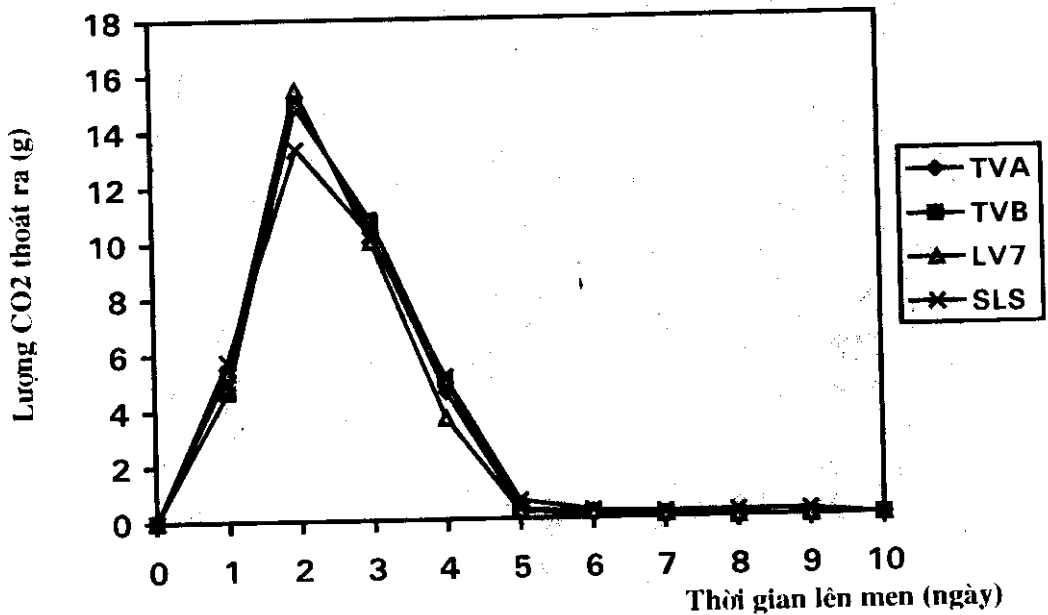
Bảng 1. So sánh kết quả lên men của 4 giống nấm men

Thời gian (ngày)	Lượng CO ₂ tạo thành theo thời gian lên men (gam)							
	Cố định				Tự do (mẫu đối chứng)			
	TVA	TVB	LV7	SLS	TVA	TVB	LV7	SLS
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5,3	4,65	5,35	5,75	5,85	6,65	6,5	5,35
2	15,25	14,9	15,5	13,35	14,55	12,3	14,15	12,6
3	10,35	10,8	10,0	10,25	8,35	9,7	8,25	9,4
4	4,6	5,0	3,65	5,15	3,55	4,35	3,3	4,5
5	0,3	0,35	0,25	0,65	1,1	0,85	1,05	1,3
6	0,1	0,2	0,2	0,3	0,7	0,5	0,7	0,85
7	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,35	0,4	0,5
8	0	0	0	0,2	0,2	0,15	0,2	0,35
9	0	0	0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2
10	0	0	0	0	0	0	0	0
Đường dư (%	1,14	1,14	1,57	1,12	1,7	1,62	1,75	1,5
Chất khô (%)	5,4	5,5	6,0	5,2	6,2	6,5	6,3	6,1
HSCH đường ra cồn (%)	47,2	45,3	44,9	45,3	47,5	43,2	43,5	45,5
Acid tổng (ml)	5,2	5,2	5,0	5,3	5,4	5,2	5,0	5,4
Cồn % (v/v)	11,2	10,8	10,4	10,8	11	10	10	10,6
PH	4,27	4,25	4,29	4,25	4,27	4,3	4,3	4,27
OD (630 nm) x 10	0,35	0,48	0,46	0,41	0,58	0,57	0,63	0,56

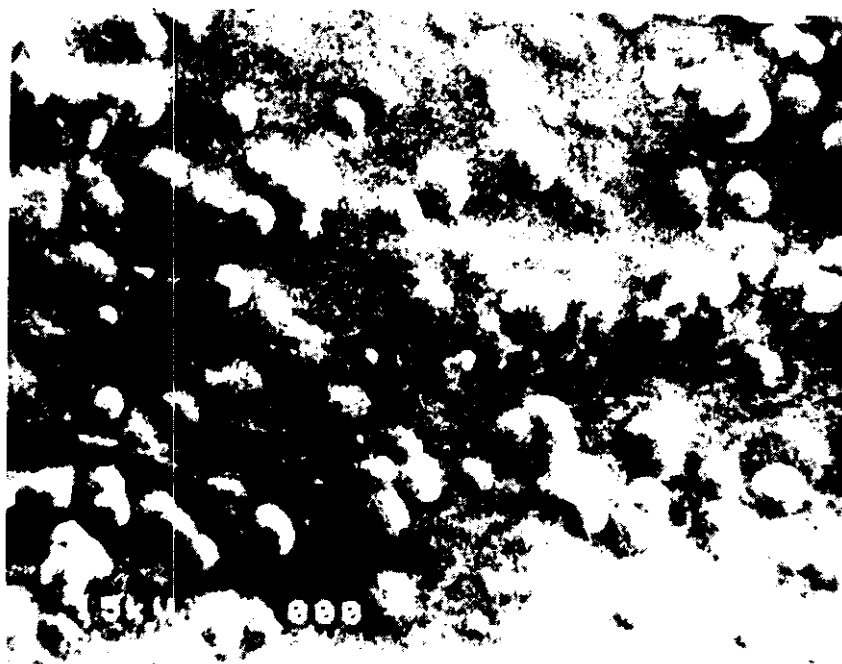
Quan sát các hạt xúc tác sinh học trước và sau khi lên men qua kính hiển vi điện tử cắt lớp(hình 3 và 4) thì thấy bề mặt hạt bị thay đổi khá nhiều : trước lúc lên men, bề mặt hạt nhẵn và chỉ có ít tế bào nấm men; sau khi lên men bề mặt hạt lồi lõm khác thường, nhiều chỗ nhô lên tựa như những cồn cát. Trên đó có những lỗ hổng hằn là dấu tích của lối thoát của nấm men từ trong hạt ra ngoài.



Hình 1. Sự hình thành CO₂ trong quá trình lên men nhờ các tế bào cố định và tự do ở chủng TVA



Hình 2. Sự hình thành CO₂ trong quá trình lên men nhờ các chủng nấm men khác nhau cố định trong Ca-alginat



Hình 3. Ảnh chụp hạt xúc tác sinh học trước khi lên men qua kính hiển vi điện tử cắt lớp JEOL-JSM 10 LV, Nhật.



Hình 4. Ảnh chụp hạt xúc tác sinh học sau khi lên men qua kính hiển vi điện tử cắt lớp JEOL-JSM 10 LV, Nhật.

2. Ảnh hưởng của nồng độ tế bào trong hạt

Giữ nguyên tỷ lệ hạt so dịch men là 5% , nhưng thay đổi nồng độ giống trong hạt từ 10^6 đến 10^{10} tế bào trong 1 ml và tiến hành lên men theo phương pháp đã chọn. Kết quả thu được ghi ở bảng 2. Số liệu cho thấy, nồng độ tế bào trong hạt càng cao thì thời gian lên men càng ngắn (8 ngày đối với 10^6 - 10^8 và 4 ngày đối với 10^{10}), axit dịch men càng cao, tế bào chết càng nhiều, nhưng lượng tế bào thoát vào dịch men càng ít. Trong khi dịch men nồng độ tế bào trong hạt 10^{10} /ml chỉ có nồng độ tế bào trong dịch là $0,25.10^6$ thì ở dịch men nồng độ tế bào trong hạt thấp (10^6 /ml) lại là 80.10^6 , cao hơn 320 lần. Nhưng điều quan trọng là hiệu suất chuyển hoá đường ra cồn và nồng độ cồn trong dịch của hạt nồng độ tế bào cao thì cao hơn dịch của hạt nồng độ tế bào thấp; tức là nếu dùng hạt với nồng độ tế bào cao thì ta được lợi về sản lượng sản phẩm chủ yếu là cồn và rất ít tế bào thoát khỏi hạt vào dịch. Điều này rất thích hợp cho việc sản xuất rượu vang.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ tế bào trong hạt đến các chỉ tiêu dịch men

Chỉ tiêu dịch lên men vang	Nồng độ tế bào trong hạt(tế bào/ml gel)				
	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}
Thời gian lên men (ngày)	8	8	8	6	4
Đường dư (%)	1,8	1,5	1,42	1,2	1,1
Chất khô (%)	7,3	7,0	75,6	5,2	5,2
HSCH đường thành cồn (%)	41,7	43,6	46,8	47,4	48,9
pH	4,31	4,27	4,21	4,2	4,2
Axit tổng (ml)	4,6	4,8	5,2	5,4	5,5
Nồng độ tế bào dịch men $\times 10^6$ tế bào/ml	80	10	10	2,5	0,25
Tế bào chết/tế bào sống	2,5	2,6	5,0	5,6	6,0
Nồng độ tế bào trong hạt $\times 10^8$ tế bào/ml hạt	0,01	0,1	2,0	14,0	99,0
OD dịch men (630 nm) $\times 10$	4,16	0,66	0,43	0,32	0,32

3. Ảnh hưởng của tỷ lệ hạt so với dịch men

Giữ nguyên nồng độ giống trong hạt là 10^9 (tế bào/ 1ml gel) và thay đổi lượng hạt so với dịch men: 1,0%; 2,5%; 5,0%; 7,5% nhằm thay đổi lượng giống cũng như lượng hạt, để tìm ra lượng hạt dùng thích hợp nhất , nhưng không làm ảnh hưởng đến hoạt lực lên men cũng như các chỉ tiêu phân tích khi kết thúc. Điều kiện lên men tương tự như trên: nhiệt độ 28°C, pH 4,5 và nồng độ đường đầu 20%, thời gian 15 ngày. Kết quả ghi ở bảng 3 cho chúng ta rõ là tỉ lệ hạt so dịch men thích hợp nhất là 5%-7,5% vì ở đây hiệu suất lên men cồn cao nhất , hiệu suất chuyển hoá đường ra cồn cũng cao nhất, thời gian lên men ngắn nhất và cũng có ít tế bào thoát khỏi hạt nhất. Nếu dùng tỉ lệ hạt thấp hơn thì hiệu quả kinh tế sẽ kém.

4. Ảnh hưởng của pH môi trường

Thay đổi pH môi trường ban đầu từ 3,0- đến 5,0 và tiến hành lên men như bình thường với tỉ lệ hạt 5%, nồng độ tế bào trong hạt là 10^9 tb/ml hạt, nhiệt độ 28°C nồng độ đường đầu 20% bình $\Delta 500$ ml, thời gian 10 ngày. Kết quả ghi ở bảng 4. Người ta dễ dàng nhận ra rằng pH ban đầu của môi trường từ 3,5-5,0 là thích hợp cho lên men vang nhờ tế bào cố định, vì trong các điều kiện này hiệu suất chuyển hoá đường ra cồn, hiệu suất tạo cồn là cao nhất và đặc biệt là lượng tế bào trong hạt không bị ảnh hưởng. Nếu lên men ở pH 3,0 thì không có lợi, vì tế bào nấm men bị chết tương đối nhiều và khá nhiều tế bào thoát khỏi hạt (gấp gần 3 lần so với bình thường).

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ hạt tới các chỉ tiêu phân tích dịch men

Chỉ tiêu	Tỷ lệ hạt (%)			
	1,0	2,5	5,0	7,5
Thời gian lên men (ngày)	14	12	8	8
Đường dư (%)	1,7	1,14	1,14	1,14
Chất khô (%)	6,5	5,5	5,2	5,4
Cồn % (v/v)	9,0	10,1	11,2	11,1
HSCH đường ra cồn (%)	38,8	42,4	47,2	46,6
pH	4,31	4,3	4,2	3,9
Axit tổng (ml)	5,0	5,0	5,4	6,3
Nồng độ tế bào trong dịch $\times 10^6$ (tế bào/ ml)	7,5	7,5	5,0	5,0
Tỷ lệ tế bào chết/ sống trong dịch.	5,1	5,2	5,1	5,0
Nồng độ tế bào trong hạt $\times 10^8$ (tế bào/ ml gel)	14,0	14,0	14,0	14,0
OD (630 nm) $\times 10$.	0,5	0,5	0,4	0,4

Bảng 4. Ảnh hưởng pH của môi trường tới các chỉ tiêu phân tích dịch men

Chỉ tiêu	pH môi trường				
	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Thời gian lên men (ngày)	9	9	9	9	9
Đường dư (%)	0,9	0,9	1,1	1,1	1,05
Chất khô (%)	5,0	5,0	5,1	5,0	5,0
Cồn % (v/v)	11,5	11,7	12,0	11,8	12,0
HSCH đường ra cồn (%)	47,8	48,7	48,9	49,6	48,8
pH	3,13	3,45	3,73	4,02	4,23
Axit tổng (ml)	7,2	6,3	5,1	5,0	4,6
Nồng độ tế bào trong dịch $\times 10^6$ (tế bào/ ml)	4,0	4,0	2,5	1,5	1,5
Tỷ lệ tế bào chết/ sống trong dịch.	5,0	5,4	5,0	6,0	6,0
Nồng độ tế bào trong hạt $\times 10^8$ (tế bào/ ml gel)	0,01	35,0	36,0	36,0	35,0
OD (630 nm) $\times 10$.	0,82	0,85	1,15	0,8	0,8

5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men

Tiến hành lên men như trên, nhưng thay đổi nhiệt độ từ 25-35°C để tìm nhiệt độ thích hợp cho lên men vang bằng tế bào cố định. Kết quả thu được ghi ở bảng số 5. Số liệu cho thấy nhiệt độ lên men tốt ở trong khoảng 25-35 °C, có xu hướng 35°C là tốt nhất, vì trong các điều kiện này hiệu suất thu hồi cồn đạt được cao nhất và thời gian lên men cũng ngắn nhất. Tuy nhiên có nhược điểm là tỉ lệ tế bào chết tương đối cao, gấp 1,5 lần so với khi lên men ở 20°C. Nếu lên men ở nhiệt độ 20 °C thì tế bào chết ít, nhưng quá trình lên men diễn ra chậm, thời gian lên men bị kéo dài, gấp 1,5 lần bình thường. Một điểm lợi khác của lên men nhiệt độ thấp có lẽ là nồng độ andêhyt của rượu vang sẽ tương đối thấp, điều này có thể cảm nhận được qua cảm quan bằng khứu giác.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới các chỉ tiêu phân tích dịch men

Chỉ tiêu	Nhiệt độ lên men (°C)			
	20	25	30	35
Thời gian lên men (ngày)	>15	12	10	10
Đường dư (%)	1,5	1,12	1,14	0,9
Chất khô (%)	6,2	5,8	5,8	5,6
Cồn .%(v/v)	11,1	11,7	11,7	12,2
HSCH đường ra cồn (%)	47,5	49,3	49,2	50,5
pH	3,91	3,92	3,97	4,11
Axit tổng (ml)	6,8	6,0	5,5	4,5
Nồng độ tế bào trong dịch $\times 10^6$ (tế bào/ ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Tỷ lệ tế bào chết/ sống trong dịch.	4,0	4,1	5,0	6,0
Nồng độ tế bào trong hạt $\times 10^8$ (tế bào/ ml gel)	10,0	10,0	10,0	10,0
OD (630 nm) $\times 10$.	1,29	0,79	0,76	0,64

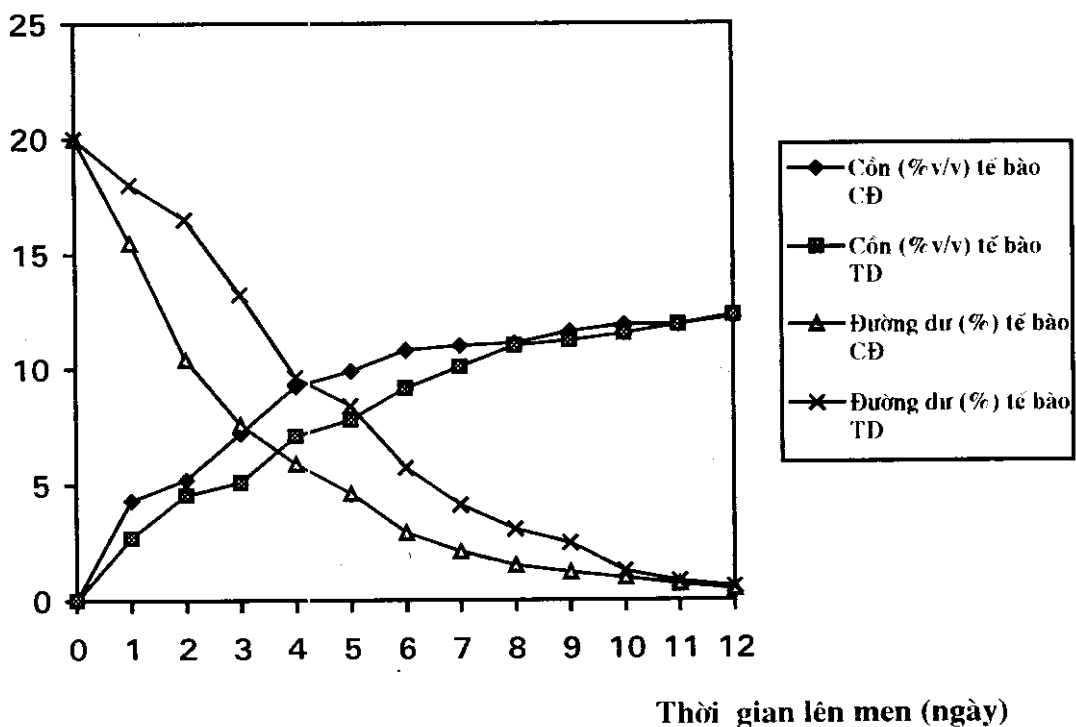
Bảng 6. Ảnh hưởng của số lần lên men liên tiếp tới các chỉ tiêu dịch men

Chỉ tiêu	Số lần lên men liên tiếp			
	1	2	3	4
Thời gian lên men (ngày)	8	7	7	7
Đường dư (%)	1,2	1,2	0,9	0,9
Chất khô (%)	5,4	5,4	5,5	5,6
Cồn .%(v/v)	11,1	11,0	11,3	11,3
HSCH đường ra cồn (%)	46,8	46,2	47,2	47,2
pH	4,21	39,5	3,9	3,9
Axit tổng (ml)	5,0	5,1	5,1	5,1
Nồng độ tế bào trong dịch $\times 10^6$ (tế bào/ ml)	1,2	1,3	1,2	1,0
Tỷ lệ tế bào chết/ sống trong dịch.	5,5	5,4	5,5	5,4
OD (630 nm) $\times 10$.	0,32	0,32	0,32	0,32

6. Ảnh hưởng của số lần tái sử dụng nấm men cố định

Một ưu thế của nấm men cố định là có thể tái dụng nhiều lần. Chúng tôi đã gạn lấy hạt cố định, rửa nhiều lần bằng nước muối sinh lí và tiếp môi trường để lên men lại. Kết quả ghi ở bảng số 6. Điều làm cho chúng tôi vui mừng là sau 4 lần sử dụng liên tiếp không thấy có dấu hiệu giảm hoạt lực lên men của các tế bào cố định. Mà hơn thế, có xu hướng là hoạt lực lần sau có vẻ khá hơn lần trước, tuy không rõ rệt lắm (thời gian lên men ngắn hơn và hiệu suất thu hồi cồn cũng hơi cao hơn). Điều này cũng phù hợp với kết quả mà Millies đã thông báo (14). Thực tế này cho phép các nhà công nghệ có thể dùng nấm men cố định để lên men liên tục sản xuất các sản phẩm mong muốn (4,18,19,20).

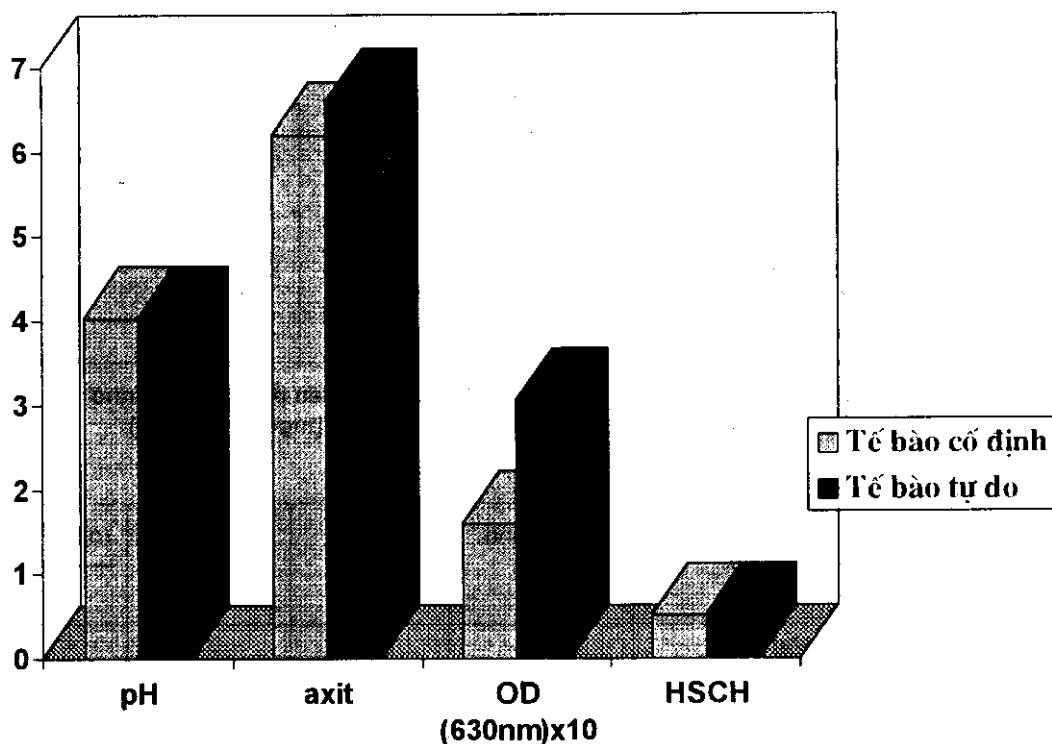
7. Lên men vang trong bình inox 4 lít



Hình 5. Sự biến đổi nồng độ cồn và đường trong quá trình lên men vang ở bình inox 4 lít nhờ nấm men cố định và tự do

Kết quả thí nghiệm lên men ở bình inox 4 lít ghi lại ở hình 3,4 và bảng 7,8,9. Theo hình số 3, tốc độ hao đường và tốc độ tạo cồn của nấm men cố định hơi nhanh hơn nấm men tự do tương tự như đã thấy khi thí nghiệm ở bình tam giác 500 ml. Hình số 4 và bảng 7 chỉ ra rằng hiệu suất chuyển hoá đường thành cồn ở cả hai loại giống là giống nhau, tương tự là pH dịch vang. Tuy nhiên axit hữu cơ trong vang tế bào tự do hơi cao hơn trong vang tế bào cố định. Số liệu còn cho thấy nồng độ Na^+ và Ca^{++} trong vang tế bào cố định cao hơn hẳn trong vang tế bào tự do. Điều này có thể lí giải là Na^+ và Ca^{++}

còn dư trong hạt vì hạt chưa được rửa triệt để trước khi dùng. Ngoài trừ hàm lượng izoamilic, còn hàm lượng các sản phẩm phụ khác trong vang tế bào cố định cao hơn trong vang tế bào tự do. Hàm lượng axeton trong cả hai loại vang rất ít và chỉ có vết mà thôi.



Hình 6. Một số chỉ tiêu hoá lý của vang sau 12 ngày lên men ở bình inox 4 lít

Bảng 7. Thành phần hoá học dịch vang lên men nhờ nấm men cố định hoặc tự do ở bình inox (4lít)

Chỉ tiêu	Tế bào cố định	Tế bào tự do
Đường dư (%)	0,57	0,49
Cồn %(v/v)	12,3	12,2
Hiệu suất chuyển hoá	50,3	49,9
pH	4,03	4,03
Axit tổng số (ml)	6,2	6,4
OD (630nm) x 10	1,6	3,05
Nồng độ axit L-malic (g/l)	2,57	3,48
Nồng độ axit xitric (g/l)	1,7	1,9
Nồng độ axit tartaric (g/l)	3,24	3,26
Ca ²⁺ (mg/l)	154,0	96,0
Na ⁺ (mg/l)	404,0	362,0

Bảng 8. Hàm lượng sản phẩm phụ trong vang lên men ở bình Inox nhờ nấm men cố định và tự do

TT	Loại tế bào	Cố định	Tự do	a-b	$\frac{(a-b) \times 100\%}{a}$
	Các chỉ tiêu	(a)	(b)		
1	Hàm lượng etylaxetat, mg/l	76,6	53,8	+ 22,8	+ 29,8
2	Hàm lượng axetaldehyt, mg/l	70,9	49,9	+ 21	+ 29,6
3	Hàm lượng propanol, mg/l	21,5	17,2	+ 4,3	+ 20,0
4	Hàm lượng izobutanol, mg/l	64,6	57,2	+ 7,4	+ 11,5
5	Hàm lượng isoamilic, mg/l	103,0	115,7	- 12,7	- 12,3
6	Hàm lượng axeton, mg/l	vết	vết		

Bảng 9. Hàm lượng các axit amin dịch vang lên men ở bình Inox nhờ nấm men cố định và tự do (đơn vị tính: mg% [mg/100 g mẫu])

TT	Các chỉ tiêu	Tb.cố định	Tb.tự do	a-b	$\frac{(a-b) \times 100\%}{a}$
		(a)	(b)		
1	Histidin	0,16	0,06	+ 0,10	+ 62,5
2	Lyzin	0,08	0,06	+ 0,02	+ 52,1
3	Threonin	0,14	0,07	+ 0,07	+ 50,0
4	Valin	0,10	0,05	+ 0,05	+ 50,0
5	Alanin	0,14	0,08	+ 0,04	+ 28,6
6	Tyrosin	0,27	0,21	+ 0,06	+ 22,2
7	Serin	0,06	0,05	+ 0,01	+ 16,6
8	Leuxin	0,12	0,11	+ 0,01	+ 8,30
9	Axit aspartic	3,05	2,96	+ 0,09	+ 2,90
10	Izoleuxin	0,07	0,05	+ 0,02	+ 2,80
11	Tryptophan	0,22	0,03	- 0,01	- 50,0
12	Axit glutamic	0,33	0,44	- 0,11	- 33,3
13	Prolin	0,03	0,04	- 0,01	- 33,3
14	Arginin	0,02	0,29	- 0,07	- 31,8
15	Glyxin	0,10	0,12	- 0,02	- 20,0
16	Asparagin	0,06	0,07	- 0,01	- 16,6
17	Glutamin	0,39	0,42	- 0,03	- 7,69
18	Phenylalanin	0,07	0,07	0	0
19	Methionin	0,04	0,04	0	0
20	Cystein + Cystin	0,04	0,04	0	0
Tổng		5,49	5,26	+ 0,23	+ 4,19%

Khác với kết quả mà Pisanelli và cộng sự đã công bố (17), chúng tôi thấy trong vang tế bào cố định có 10 axit amin (histidin, lizin, threonin, valin, alanin, tyrosin, serin, leuxin, aspartic và izoleuxin) có nồng độ cao hơn so với vang tế bào tự do; trong đó cao nhất là histidin (62%), trung bình là lizin, threonin và valin (50%). Ngược lại vang tế bào tự do lại có 7 axit amin với nồng độ cao hơn vang tế bào cố định (tryptophan, glutamic, prolin, arginin, glixin, asparagin và glutamin); trong đó cao nhất là tryptophan (50%). Bốn loại axit amin khác như phenylalanin, methionin, xistein và xistin ở cả hai loại vang đều có nồng độ giống nhau (bảng 8,9).

Tuy thành phần axit hữu cơ và axit amin của hai loại vang có sự khác biệt như vừa nêu trên, nhưng về mặt cảm quan khó ai có thể phân biệt được đâu là vang tế bào cố định và đâu là vang tế bào tự do. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả khác (10,11,12,14,21).

IV. KẾT LUẬN

Sau khi cố định tế bào các loại nấm men để lên men vang trong bình tam giác 500ml và bình inox 4 lít chúng tôi sơ bộ rút ra một số kết luận sau đây:

- Trong 4 loại nấm men đem thử thì chủng TVA cho hoạt lực tốt nhất cả ở hai dạng cố định và tự do; tế bào cố định thường bắt đầu lên men sớm và cho hiệu suất chuyển hoá đường ra cồn cao hơn tế bào tự do;
- Điều kiện lên men thích hợp là pH 4,5; nhiệt độ 30°C, nồng độ tế bào trong hạt 10^9 tế bào/ml hạt, nồng độ hạt so với dịch men 5%;
- Có thể sử dụng hạt cố định lên men 4 lần mà vẫn không làm thay đổi hiệu suất lên men;
- Có sự khác nhau về thành phần axit hữu cơ, thành phần axit amin giữa hai loại vang lên men nhờ tế bào cố định hoặc tự do, nhưng về mặt cảm quan không thấy có sự khác biệt nào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Giang Thế Bình, Đặng Kim Tuyền và Klaus Korner, 1996.*

Cố định tế bào *Sorangium cellulosum* So ce 12 trong hạt Ca-alginate để sản xuất kháng sinh mới Sorangicin. Viện Công nghiệp thực phẩm, Các công trình nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học và công nghiệp thực phẩm giai đoạn 1986-1995, Nhà xuất bản KHKT Hà Nội, tr. 180-184.

2. *C. Cantarelli, 1989.*

The use of immobilized yeast wine fermentation. I tal. J. Food Sei. N^o3, 4-20.

3. *O.Colagrande, A.Silva and M.D.Fumi, 1994.*

Recent Applications of Biotechnology in wine production. Biotechnol Prog, 10, 2 - 18.

4. *L.I. Conomous, M. Kanellaki, S. Voliotis, K. Agelopoules, 1996.*
Continuous wine making by delignified cellulosis materials supported biocatalyst, an attractive process for industrial application. *Applied Biochem. and Biotechnol.* Vol 60, 303-313
5. *B. Deuteurtre, M. Charpentier, P. Ors, D. Hennequin., 1992.*
The Use of immobilized yeast in the champagne making process. *Agro - Food - Industrie Hi - Tech* July / August 1992. P. 14 - 15
6. *L. V. Dubinchuk, N. P. Zhuravleva, E. N. Storchevoi and Pazyrev, 1983.*
New technology for champagnization of wine at Leningrad winery Vinodey Vinograd. *USSR* 5, 1983, p. 13
7. *M.D. Fumi, G. Trioli and O. Colagrande, 1987.*
Alternative wine making in batch-fermentation by immobilized yeast reactor. *Proc. 4th European Congress on Biotechnology* 1, p. 81 - 84. 1987.
8. *M. D. Fumi, G. Trioli and O. Colagrande, 1987*
Preliminary yeast cells in sodium-alginate for sparkling wine process. *Biotechnology Letters* Vol 9, N^o 5. 1987, 339 - 342.
9. *M. D. Fumi, G. Trioli, M. G. Colombi and Colagrande, 1988*
Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in Ca-alginate gel and its application to bottle fermented sparkling wine production. *Am. J. Vitic.* Vol. 39, N^o 4, 1988, 267 - 272
10. *M.D. Fumi, M. Bujo, G. Trioli and O. Colagrande. 1989.*
Bulk sparkling wine production by external encapsulated yeast bioreactor. *Biotechnology Letters* Vol 11, N^o 11. 1989, 821 - 824.
11. *F. Godia, C. Casas and Carles Sola. 1991.*
Application of immobilized yeast cells to sparkling wine fermentation. *Biotechnol Prog.* 7, 1991, 468 - 470.
12. *S. Kransny, F. Malik and E. Minárik, 1992.*
Einsatz immobilisierter Zellen in der Weinbereitung. II. Teil. Verwendung immobilisierter Hefen bei der sekundären Gärung. *Vitic. Enol Sci.* 47, 1992, 53 - 55
13. *L. Li, Q. Zouzhi and Zh. Li., 1982.*
Preliminary studies on application of immobilized living cells in white wine fermentation. *Food Ferment - Industries* 4, 1982, p.21
14. *K. D. Millies, 1991.*
Untersuchung unterschiedlicher Stämme Schaumweinherstellung nach der "Methode champagnoirs" mit Hilfe von immobilisierten Hefen. *Getranke industrie* 2/91 S. 78 - 83.
15. *K. Nakanishi and K. Yokotsuka, 1987.*
Production of white table wines from Korhu grapes Using immobilized yeast. *Nippon shokulin Koyo Gakkaishi* 34, 1987, 362 - 369.
16. *B. Pardonova, M. Polednikova and M. Sedova. 1986*
Application Immobilized yeast in the production of sparkling of wines. *Kvasny Promyslenos.* 32, 1986, p. 232.

17. A.M. Pisanelli, F. Favati, A. Crapisi, G. Borin, P. Spettoli, 1989.

The free amino acid content of bottle - fermented Mos-catobianco sparkling wine by immobilized yeasts. 17th - international symposium on yeasts. 1989p.113 - 116 by John Wiley Sons Ltd.

18. F. Que, 1993.

Using a thread bed of alginat gel particles as cell immobilized support and some concept of packed bed fermentation design. Biotechnology Techniques, Vol 7, 1993, 755 - 760.

19. G. Suzzi, P. Roman O, L. Vannini, L. Turbanti and P. Domizio, 1996.

Cell-recycle batch fermentation using immobilized cells of floeulent *Saccharomyces cerevisiae* wine strains World Journal of Microbiology & Biotechnology 12, 1996, 25 - 27.

20. K. Uematsu, D. Fong and D.D.Y. Ryn, 1988

Development of continuous fermentation using immobilized yeast, cells for wine cooler process development. Applied Biochem. and Biotechnol. 19, 1988, 177 - 188.

21. A.Zamorani, A-Crapisi, C.Borin, S. Spettoli, 1989

The use of immobilized yeasts in bottle-fermented moscatobiano sparkling wine. 7th international symposium on yeast, 1989 p.63-66by John Wiley & Sons.

22. Giang The Viet, 1998.

Lên men vang nhờ các tế bào nấm men cố định trong chất mang Ca-alginat. Luận văn tốt nghiệp Đại học Bách khoa Hà Nội, 1998.

STUDY ON THE USE OF IMMOBILIZED YEASTS IN THE WINE FERMENTATION

Giang The Binh, Giang The Viet,
Dang Hong Anh, Dang Kim Tuyen, Nguyen Thi Hien

SUMMARY

4 types of yeasts have been immobilized in Ca-alginate and used for the wine fermentation in 500 and 4000 ml flasks. The optimal conditions of fermentation are temperature 30 °C, cell concentration in the bead 10⁹ cells/ml bead, bead concentration in the fluid 5%. The immobilized bead could be reused 4 times without change of alcohol productivity of the yeasts. There are some differences in the contents of the organic and amino acids of the wine, but it is difficult for sensory analysis to distinguish two kinds of wine fermented by free and immobilized yeasts.

1.0.28

NGHIÊN CỨU VI KHUẨN QUANG HỢP ĐỂ SỬ DỤNG TRONG XỬ LÝ NƯỚC THẢI ĐẬM ĐẶC HỮU CƠ II

Trần Văn Nhi, Đỗ Thị Tố Uyên
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong các nguồn nước thải sinh hoạt và sản xuất, đặc biệt là nước thải chế biến nông lâm hải sản thực phẩm và chăn nuôi, các chất hữu cơ có hàm lượng cao và là thành phần cơ bản gây ô nhiễm môi trường sống.

Trên thế giới cũng như ở nước ta, đối với các nguồn thải như vậy, người ta đã và đang sử dụng các biện pháp sinh học để xử lý làm sạch theo quy trình từ xử lý kỵ khí đến xử lý hiếu khí.

Tuy nhiên nhiều công trình nghiên cứu đang được tiến hành để liên tục cải tiến công nghệ, tối ưu hoá các điều kiện hoạt động của vi sinh vật trong từng giai đoạn nhằm rút ngắn thời gian lưu nước thải trong các bể xử lý, do đó giảm chi phí xây dựng cơ bản cũng như chi phí vận hành [10]. Người ta đang đặc biệt chú trọng đến việc tìm kiếm chọn lọc từ tự nhiên cũng như cải biến và tạo mới những vi sinh vật bằng kỹ thuật di truyền để sử dụng trong xử lý những nguồn thải đặc biệt khó phân huỷ hay độc tính cao.

Theo phương hướng trên, những năm gần đây ở một số nước trên thế giới như Ấn Độ, Nhật Bản, Mỹ... [4] đã tiến hành đưa một đối tượng thuộc nhóm vi khuẩn - Vi khuẩn quang hợp (VKQH) vào ứng dụng xử lý các nguồn thải quá đậm đặc hữu cơ và chứa nhiều hợp chất khó phân huỷ. Bằng kỹ thuật xử lý nước thải loại này người ta đã tận dụng được năng lượng ánh sáng mặt trời để vừa làm sạch nước thải vừa thu sinh khối giàu protein, giàu hoạt chất sinh học có thể sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau [3].

Ở Việt Nam, VKQH đã được phân lập từ nhiều nguồn nước thải. Một số đặc điểm sinh học cũng như mục đích như vậy đã được nghiên cứu [7,8].

Trong công trình này chúng tôi sẽ trình bày kết quả nghiên cứu VKQH để sử dụng trong xử lý một số nguồn nước thải đậm đặc hữu cơ.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu đã sử dụng 10 chủng VKQH có ký hiệu là: 10I; T₁₅; T₁₇; Rv; SH; 4a; 40; T₃₂ và T₂₂ từ tập đoàn chủng giống VSV của Viện Công nghệ Sinh học - TT KHTN & CNQG.

Đối tượng cần xử lý làm sạch là các nguồn nước thải chế biến sắn (từ xã Minh Khai - Hoài Đức - Hà Tây), sản xuất giấy (từ xã Phú Lâm -Tiên Du - Bắc Ninh), chăn nuôi (từ thôn Phú Đô - xã Mỹ Trì - Từ Liêm- Hà Nội) và nước thải sản xuất bia (từ Xí nghiệp bia, nước giải khát Hoàng Giang - Ba Đình - Hà Nội).

2. Phương pháp nghiên cứu

VKQH được nuôi trong môi trường AT lỏng [1] ở điều kiện kỵ khí dưới khí quyển N_2 . Khả năng sinh trưởng (gia tăng sinh khối) của chúng được đánh giá theo mức gia tăng mật độ quang ở bước sóng $\lambda = 660nm$ [9] (ΔOD_{660}). Hàm lượng chất hữu cơ trong nước thải được đánh giá theo nhu cầu oxy sinh hoá (BOD_5). BOD_5 được xác định theo phương pháp tiêu chuẩn [5] nhưng ở $30^\circ C$ với thời gian 3 ngày. Nồng độ oxy hoà tan xác định bằng phương pháp điện hoá sử dụng cực Pb/Ag. Hàm lượng sulfua được xác định theo phương pháp Iodin [5]. Hàm lượng NH_4^+ được xác định theo phương pháp Nessler [5]. Mật độ quang trong các phép phân tích thuỷ hoá và xác định sinh khối được đo trên máy quang phổ Novaspec II (Anh). Cường độ ánh sáng đo bằng lux meter (IO -16 Nga). Mức độ độc sinh thái của nước thải được xác định theo phương pháp thử sinh học [2].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Khả năng sinh trưởng của các chủng VKQH trong một số nguồn nước thải

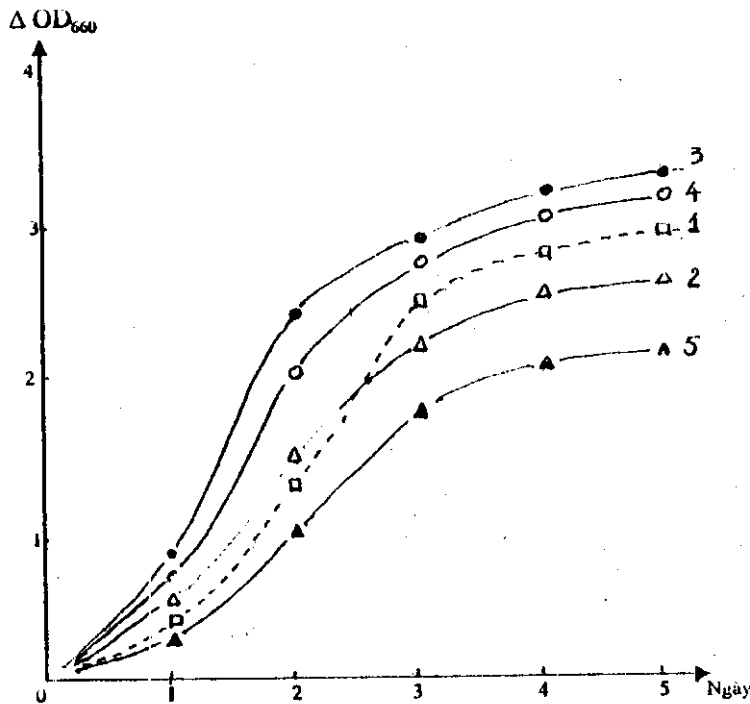
Nước thải đã được thu thập từ nhiều địa bàn khác nhau sau khi khử trùng được sử dụng để nuôi VKQH ngoài sáng trong điều kiện kỵ khí. Kết quả theo dõi động thái sinh trưởng cho thấy sau 4-5 ngày nuôi cấy, sinh khối của các chủng đạt cực đại. Pha sinh trưởng (log phase) đạt được ở ngày thứ hai. Vì vậy chúng tôi chọn thời điểm 2 ngày để so sánh khả năng sinh trưởng của các chủng nghiên cứu trong các nguồn thải khác nhau. Kết quả đánh giá được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Khả năng tích lũy sinh khối (theo gia tăng $OD_{660} - \Delta OD_{660}$) của các chủng VKQH trong các nguồn thải sau 2 ngày nuôi

Ký hiệu chủng Loại nguồn thải	PD	10I	T ₁₇	T ₁₅	SH	Rv	4a	40	T ₃₂	T ₂₂
Chế biến sắn đầu nguồn	1,32	0,60	1,42	0,36	1,31	1,34	1,04	0,36	0,64	0,90
Chế biến sắn cuối nguồn	1,21	1,04	1,30	1,12	0,91	0,87	1,34	0,93	0,93	0,67
Chăn nuôi	2,51	1,14	2,14	2,10	1,25	3,50	1,56	0,49	0,62	1,90
Sản xuất giấy	1,61	1,48	1,6	1,28	1,60	1,28	1,54	0,88	1,36	154
Sản xuất bia	0,97	0,69	0,82	1,18	1,16	1,02	1,32	0,74	0,56	1,04

Từ bảng 1 ta thấy trong cùng một nguồn nước thải sinh trưởng của các chủng rất khác nhau. Sau hai ngày trong nước thải sản xuất bia ΔOD_{660} của chủng T₁ chỉ đạt 0.56 trong khi đó ΔOD_{660} của chủng 4a lại đạt tới 1.32. Trong nước thải từ xưởng sản xuất giấy, đa số các chủng đều sinh trưởng khá tốt, ΔOD_{660} của chủng PD đạt tới giá trị 1.61. ở nước thải sản xuất tinh bột sắn, do có sự khác nhau giữa hai điểm lấy mẫu đầu nguồn và cuối nguồn nên sinh trưởng của từng chủng lại khác nhau. Trong nước thải đầu nguồn chủng T₁ sinh trưởng mạnh nhất ($\Delta OD_{660} = 1.42$) trong khi đó chủng 4a lại sinh trưởng tốt nhất trong nước thải lấy ở cuối nguồn. ở nước thải lấy từ chuồng trại chăn nuôi, sự tích lũy sinh khối của tất cả các chủng đều khá mạnh, đặc biệt ΔOD_{660} của Rv đạt tới 3.5.

Mặt khác, kết quả mà chúng tôi thu được còn cho thấy sinh trưởng của từng chủng trong các loại nước thải lại cũng rất khác nhau. Trên hình 1 trình bày đường cong sinh trưởng điển hình của chủng PD trong các nguồn nước thải.



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của chủng PD trong các nguồn thải chế biến sắn đầu nguồn (1); chế biến sắn cuối nguồn(2); chăn nuôi(3); sản xuất giấy (4) và sản xuất bia (5).

Từ đồ thị trên ta thấy ở nước thải chăn nuôi và ở nước thải sản xuất tinh bột sắn (đầu nguồn), sự tích lũy sinh khối của chủng PD vẫn gia tăng ở ngày thứ 5 trong khi đó sinh trưởng của chúng lại đạt tới pha dừng nhanh chóng ở ngày thứ 3 trong nguồn thải sản xuất giấy và chế biến cuối nguồn. Sự khác biệt này có thể do tính chất của các nguồn thải khác nhau về hàm lượng và thành phần các chất hữu cơ.

Từ các kết quả vừa trình bày trên có thể thấy các chủng VKQH nghiên cứu sinh trưởng khá tốt trong các nguồn thải giàu hữu cơ. Kết quả nghiên cứu so sánh vừa nêu có thể làm cơ sở để lựa chọn chủng có triển vọng nhất đối với từng nguồn nước thải. Mỗi cấp nước thải - chủng giống chọn lựa đã được đưa ra thử nghiệm khả năng xử lý hữu cơ.

2. Khả năng loại bỏ hữu cơ từ các nguồn nước thải của VKQH

Chúng tôi tiến hành thí nghiệm như sau: chủng 4a nuôi trong nguồn nước thải sản xuất bia và chế biến sản cuối nguồn; chủng Rv nuôi trong nguồn nước thải chăn nuôi; chủng PD nuôi trong nguồn nước thải sản xuất giấy; chủng T₁₇ nuôi trong nguồn thải chế biến sản đầu nguồn.

Sau 5 ngày nuôi cấy, tiến hành xác định BOD của nước thải đã sử dụng để nuôi (thí nghiệm) và nước thải chưa nuôi VKQH (đối chứng). Kết quả trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng loại bỏ BOD trong các nguồn thải của một số chủng VKQH

Công thức thí nghiệm		BOD (mg/l)		Hiệu suất loại bỏ BOD (%)
Chủng giống	Loại nguồn thải	Đối chứng	Thí nghiệm	
Rv	Chăn nuôi	1423	214,2	85
4a	Chế biến sản cuối nguồn	618	54,7	91
T ₁₇	Chế biến sản đầu nguồn	1420	198,8	86
PD	Sản xuất giấy	602,28	36,7	94
4a	Sản xuất bia	780	103,5	86,7

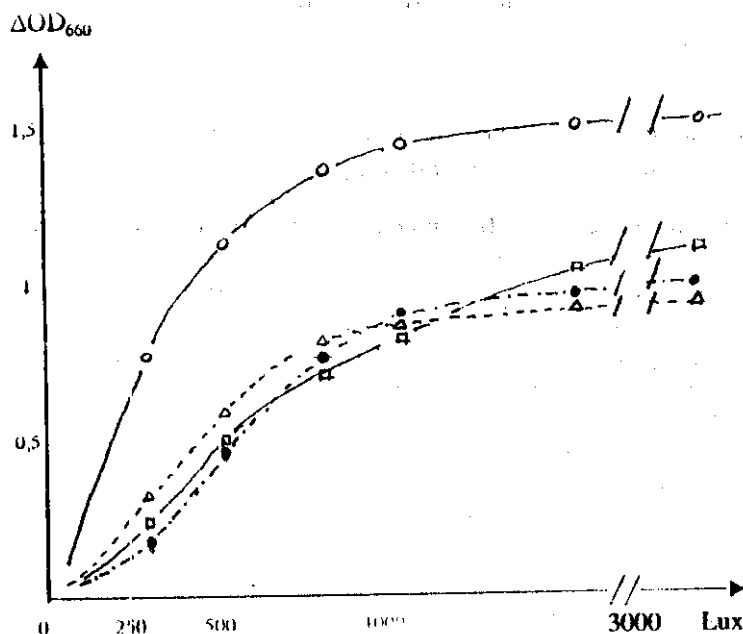
Từ kết quả thu được ta thấy rằng với các nguồn nước thải có hàm lượng BOD từ 600 - 1400 mg/l, sau 5 ngày nuôi cấy hiệu suất xử lý của VKQH có thể đạt tới 85- 95%.

Trong những thí nghiệm với nguồn nước thải chăn nuôi từ trại chăn nuôi Viện Công nghệ sinh học chứa BOD đến 3000mg/l và nước thải từ xí nghiệp sản xuất cồn với nguyên liệu rỉ đường chứa hàm lượng BOD đến 7000 - 10.000 mg/l một số chủng VKQH nghiên cứu vẫn phát triển bình thường. Như vậy sử dụng VKQH trong điều kiện thiếu oxy có thể xử lý nước thải đậm đặc hữu cơ - như xử lý kỵ khí thông thường nhưng với thời gian lưu nhỏ hơn vài chục lần.

Tuy nhiên, để có thể đưa VKQH vào các hệ xử lý ngoài tự nhiên như các phương pháp sinh học khác cũng còn cần phải quan tâm tới yêu cầu năng lượng để chiếu sáng và khả năng chịu oxy của đối tượng này vì giữ điều kiện kỵ khí tuyệt đối trong thực tế gặp khá nhiều khó khăn.

3. Nhu cầu tối thiểu về ánh sáng

Để xác định nhu cầu ánh sáng đã tiến hành nuôi cấy 4 chủng Rv, T₁₇, 4a và PD trong môi trường AT lỏng trong điều kiện kỵ khí dưới khí quyển N₂, ở nhiệt độ 28-30°C dưới ánh sáng với cường độ khác nhau từ đèn sợi đốt. Sinh trưởng của chúng được đánh giá bằng sự gia tăng sinh khối sau hai ngày nuôi. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Sự phụ thuộc khả năng sinh trưởng của một số chủng VKQH vào cường độ chiếu sáng.

—○— : Rv; —△—△— : T₁₇; —●— : 4a; —△—△— : PD

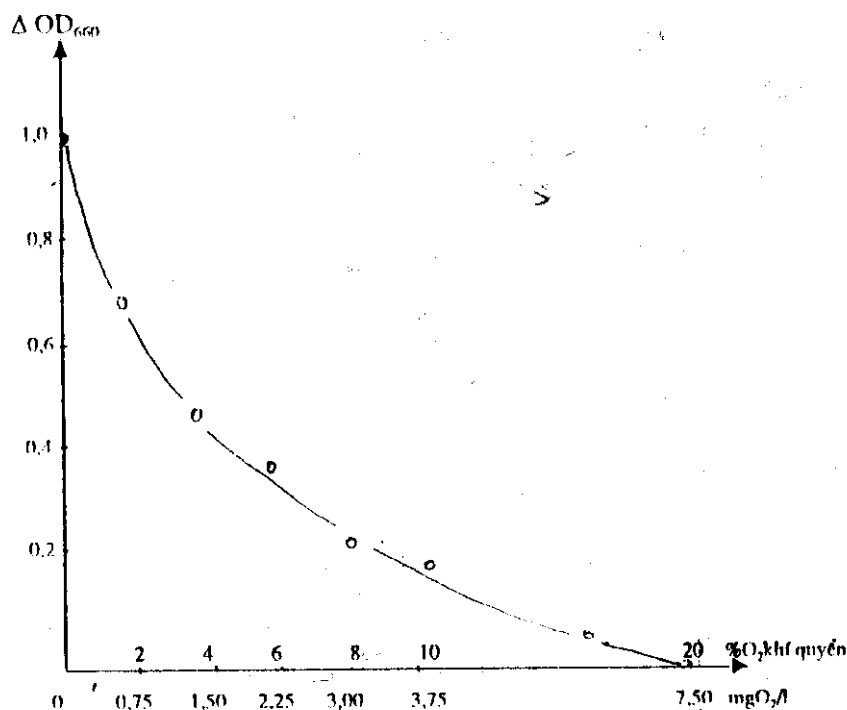
Từ hình 2, ta thấy cả 4 chủng nghiên cứu đều có nhu cầu ánh sáng để sinh trưởng khá thấp. Ở ánh sáng cường độ 1500 - 2000lux, sinh trưởng của cả 4 chủng đều đạt bão hoà. Ngưỡng ánh sáng bão hoà thấp như vậy đặc trưng cho những thực vật ưa bóng. Trong khi sinh trưởng của phần lớn thực vật bậc cao hay rong tảo đơn bào có yêu cầu ánh sáng cao hơn hàng chục lần[6]. Từ kết quả vừa trình bày có thể thấy, sử dụng VKQH trong xử lý nước thải có thể tận dụng ánh sáng tán xạ từ mặt trời (kể cả trong những ngày không nắng) và tiêu tốn ít điện năng (vào thời gian cần chiếu sáng bổ sung).

4. Ảnh hưởng của oxy phân tử đến sinh trưởng của VKQH

Bốn chủng VKQH lựa chọn được nuôi hiếu khí trong môi trường AT ở nhiệt độ 28-30°C, với chế độ lắc liên tục. Do bão hoà không khí (21% O₂) mà nồng độ oxy hoà tan

trong môi trường đạt 7,5mg/l. Sau 4 ngày nuôi cấy, sinh khối của cả 4 chủng hầu như không tăng lên, màu sắc dịch huyền phù tế bào của chủng Rv, 4a và T₁₇ bị chuyển sang màu vàng và bạc dần, riêng chủng PD vẫn giữ nguyên màu đỏ tía.

Kết quả xác định OD₅₅₀ (đặc trưng cho vùng hấp thụ của carotenoid), OD₈₆₀ (cực đại hấp thụ của bacteriochlorophyll) và tỷ số OD₅₅₀/OD₈₆₀ của dịch tế bào nguyên cũng như của dịch chiết từ chúng bằng hỗn hợp dung môi axeton: metanol: H₂O (7:2:1)[9], cho thấy hấp thụ của bacteriochlorophyll bị giảm xuống mạnh so với hấp thụ của carotenoid. Nếu lấy tỷ số này và màu sắc VKQH sau khi nuôi hiếu khí làm chỉ tiêu so sánh thì chủng PD tỏ ra chịu đựng với oxy hơn cả. Để xác định ngưỡng chịu đựng oxy của chủng này, chúng tôi tiến hành nuôi chúng dưới khí quyển với các hàm lượng oxy khác nhau (các nồng độ oxy khác nhau trong môi trường nước). Kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Sự phụ thuộc của khả năng tích lũy sinh khối chủng PD vào nồng độ oxy trong môi trường (và trong pha khí của bình nuôi).

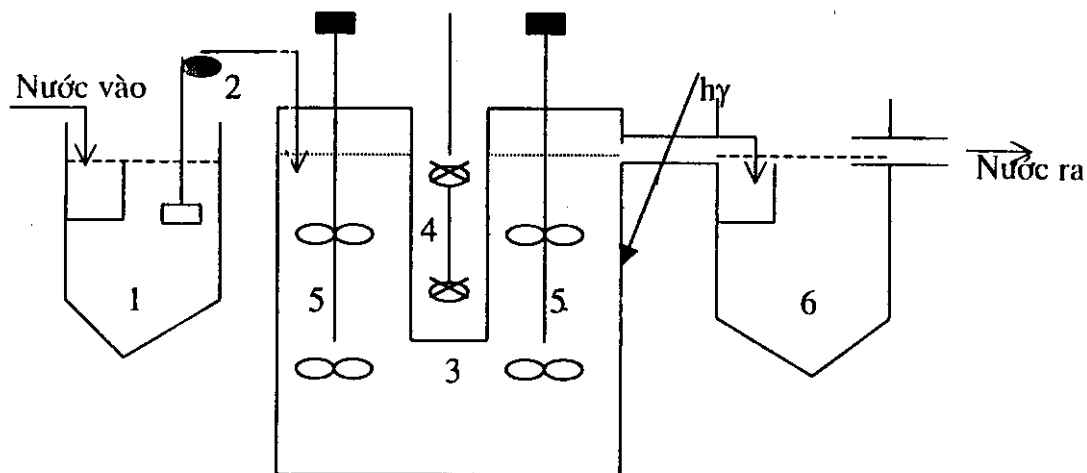
Từ hình 3 ta thấy ở nồng độ oxy 7-8mg/l (bão hoà hỗn hợp khí O₂: N₂= 21:79 như trong không khí) chủng PD không sinh trưởng được nhưng khi giảm nồng độ oxy xuống, khả năng tích lũy sinh khối tăng dần. ở khoảng nồng độ oxy trong khí quyển 2-4% (tương đương 0,75-1,50mgO₂/l môi trường nuôi), tích lũy sinh khối đạt đến 60% mức

sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí. Như vậy, trong các hệ thống xử lý nước thải tương đối kín ngoài tự nhiên hoàn toàn có thể đảm bảo điều kiện cho VKQH giảm thiểu tác hại của oxy.

Như vậy từ những kết quả nghiên cứu xác định nhu cầu ánh sáng và ngưỡng chịu oxy của VKQH, chúng tôi thấy rằng PD là chủng có triển vọng để áp dụng trong công nghệ xử lý nước thải.

5. Xử lý nước thải bằng VKQH trong điều kiện bán tự nhiên

Trên cơ sở kết quả xác định nhu cầu ánh sáng, yêu cầu mức độ kỵ khí và kết quả lựa chọn chủng giống thích hợp, đã xây dựng 1 quy trình xử lý nước thải sử dụng ánh sáng mặt trời (có chiếu sáng đèn sợi đốt bổ sung vào ban đêm). Trong thí nghiệm đã sử dụng chủng PD để làm sạch nguồn nước thải sản xuất bún và chăn nuôi kết hợp từ làng nghề làm bún Phú Đô (Từ Liêm - Hà Nội). Hệ thống xử lý được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Sơ đồ hệ thống xử lý nước thải bằng VKQH

Nước thải hỗn hợp lấy từ Phú Đô được đưa vào bể 1 (đóng vai trò bể thu gom, điều hoà và lắng sơ cấp). Từ bể 1, nước thải được bơm bằng bơm 2 sang bể 3 (có dung tích là 60l) với tốc độ trung bình 1.2l/h để thời gian lưu nước thải ở trong bể 3 là 48-50 h. Bể 3 tiếp nhận ánh sáng tự nhiên từ mặt ngoài và ánh sáng chiếu bổ sung vào ban đêm từ hệ đèn sợi đốt (4) trong bể. Nước thải đã nhiễm VKQH được khuấy động bằng hệ khuấy ngầm (5). Nước thải sau khi lưu lại 48h ở bể 3, tự chảy sang bể 6 để lắng sinh khối rồi chảy ra ngoài.

Sau khi hệ hoạt động ổn định, chúng tôi tiến hành xác định một số thành phần thủy hoá trong nước thải ở một số điểm của hệ. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Biến động hàm lượng một số thành phần thủy hoá trong nước thải khi đi qua hệ xử lý

Chỉ số Vị trí thu mẫu	BOD		NH ₄ ⁺		Sulfua	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Sau bể lắng (1)	879,5	100	143	100	5,75	100
Sau bể nuôi (3)	619	69	130	91	4,2	73
Sau bể lắng (6)	187,5	21,1	109	76	2,04	25,4

Từ bảng 3 ta thấy rằng khi qua hệ thống xử lý, một lượng lớn chất hữu cơ (theo BOD) và sulfua đã giảm xuống và chỉ còn lại 21,1% và 25,4% (tương ứng). Hàm lượng NH₄⁺ có giảm xuống nhưng ở mức độ không đáng kể.

Sau khi chảy qua hệ xử lý, độc tính của nước thải (đánh giá bằng phép thử sinh học sử dụng bèo tấm *Lemma* [2]) giảm xuống rất rõ rệt.

Như vậy, hệ thống xử lý nước thải bằng VKQH nhờ ánh sáng mặt trời tỏ ra có triển vọng ứng dụng.

Bên cạnh mục tiêu làm sạch môi trường, việc sử dụng sinh khối VKQH sau xử lý nước thải cũng đã được lưu ý. Kết quả thí nghiệm của chúng tôi cho thấy VKQH này rất giàu protein, có thể làm thức ăn cho thủy động vật nuôi (như trai ngọc nước ngọt), làm nguồn chất kích thích sinh trưởng (giàu auxin), làm nguồn thu một số dạng carotenoid và ubiquinon (vitamin Q). Một số kết quả nghiên cứu theo hướng này được thông báo ở một công trình khác trong cùng hội thảo này.

IV. KẾT LUẬN

1. Trong các vi khuẩn VKQH nghiên cứu, chọn được 4 chủng: T₁₁, Rv, 4a và PD sinh trưởng tốt trong các nguồn thải ô nhiễm hữu cơ nặng.
2. Ở điều kiện phòng thí nghiệm, sau 4-5 ngày nuôi cấy, các chủng VKQH lựa chọn có thể loại bỏ đến 85-94% thành phần hữu cơ (theo BOD) từ các nguồn thải.
3. Trên cơ sở xác định nhu cầu tối thiểu về ánh sáng, nồng độ oxy mà đối tượng có thể chịu được đã xây dựng được mô hình xử lý nước thải sử dụng ánh sáng mặt trời với thời gian lưu 48h. Hiệu quả xử lý của hệ khá cao (80% BOD được loại bỏ) cho thấy triển vọng áp dụng của VKQH trong công nghệ làm sạch nước thải đậm đặc hữu cơ trong điều kiện tự nhiên ở nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Biebl H; Pfennig N, 1981.

In: The prokaryotes - A handbook on habitats isolation and identification of bacteria. Springer Verlas. Berlin. 267-273.

2. Cowgill U.M; Milazza D.P., 1989.

The culturing and testing of tow spieces of Duckweed. Aquatic toxicology and hazard assessment. 12th volum. ASTM, SPT 1027. Eds. American Society for testing and materials. Philadenphia. 379-391.

3. Kobasyhi ; M. Joshida, 1984.

In: Solar enery bioconversion. Pushino. 227-294

4. Sasikala C ; Ramana C.V., 1995.

Advances in applied microbiology V41. 173-279.

5. Standard methods for examination of waste water. 1982.

Amer. Pub. Health Ass. Washington. 812p.

6. Tarsevsky I.A., 1977.

Quang hợp. Moscova. 255trang. (Russ)

7. Trần văn Nhị, Đỗ Thị Tố Uyên., 1997.

Nghiên cứu vi khuẩn quang hợp để sử dụng trong xử lý nước thải ô nhiễm hữu cơ nặng I. Kỳ yếu annual report 1996. Viện Công nghệ sinh học. NXB KHKT. 394-399.

8. Đỗ Thị Tố Uyên, Trần Văn Nhị., 1999.

Nghiên cứu đặc điểm sinh học của vi khuẩn quang hợp phân lập từ một số thủy vực ô nhiễm hữu cơ ở Việt Nam. Đã gửi đăng tạp chí Công nghệ Sinh học năm 1999.

9. Xubing et al., 1996.

Selected paper on Marin biotechnology. Chinesses center of Marin biotechnology / BAC/ UNESCO. April 1996. 360-364.

10. Wastewater engineering: treatment, diposal and reuse. Third Edition. Metcaf and Eddy. 1334p.

STUDY ON PHOTOSYNTHETIC BACTERIA FOR THE USE IN TREATMENT OF ORGANIC WASTE WATER WITH HIGH CONCENTRATIONS

Tran Van Nhi, Do Thi To Uyen

SUMMARY

Ten strains of purple photosynthetic bacteria were shown to grow well in waste water from various food and agriculture product prosessing and piglary.

At retain time of 4-5 days, 4 fast growing choosen strains could remove 84-94% BOD from waste water

It was also shown that it was not necessary to provide with high light and strictly anaerobic condition for the grow of some phtosythetic bacteria.

Base on experiment results, a pilot of waste water treament system was conducted and experiment.

1.0.29

ỨNG DỤNG CÁC KỸ THUẬT PHÂN TỬ TRONG PHÁT HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH BỆNH HẠI THỰC VẬT Ở VIỆT NAM (*Tại sao và như thế nào*)

*Lê Thị Ánh Hồng⁽¹⁾, Phan Tố Phương⁽¹⁾, Trần Duy Quý⁽¹⁾,
Nguyễn Mai Chí⁽¹⁾, Nguyễn Thuý An⁽¹⁾, Nguyễn Hằng Phương⁽¹⁾,
Mai Thu Hà⁽¹⁾, Lương Thị Hải⁽²⁾, Đàm Quốc Trụ⁽²⁾, Nguyễn Văn Đồng⁽²⁾*

(1) : VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP

(2) : CỤC BẢO VỆ THỰC VẬT

A. MỞ ĐẦU

Việc tấn công các loại cây trồng từ vi sinh vật và côn trùng gây hại thể hiện những thách thức to lớn trong sản xuất nông nghiệp. Lượng phần trăm to lớn của tiềm năng năng suất hàng năm bị mất mát do cây trồng bị nhiễm với nhiều loại bệnh hại khác nhau như: *virus*, *vi khuẩn viroid*, *nấm* và *tuyến trùng* trên toàn thế giới đã và đang là một trong những nguyên nhân gây nên sự đói kém và sự đe dọa trầm trọng nền kinh tế của người nông dân nói riêng và cộng đồng xã hội nói chung.

B. VÌ SAO ?

I. Quan niệm về bệnh hại thực vật

Khi mà người ta chưa biết liệu cây trồng có cảm thấy rằng chúng bị tổn thương hoặc không bình thường hay không và trong mọi trường hợp, cây trồng cũng không tự thông báo cho chúng ta biết nên rất khó xác định một cách chính xác khi một cây bị bệnh. Người ta thừa nhận rằng một cây được coi là khoẻ mạnh hoặc bình thường khi nó biểu hiện các chức năng sinh lý ở mức tối đa tiềm năng di truyền của nó.

Những tổn hại ban đầu chỉ xảy ra ở một vài tế bào và không nhận thấy được, sau đó một sự phản ứng sẽ rộng hơn thì các bộ phận của cây trồng bị ảnh hưởng sẽ phát triển từ có thể nhìn thấy được đến nhìn rõ bằng mắt thường. *Sự thay đổi có thể quan sát này chính là triệu chứng của bệnh.*

Hàng chục nghìn loại bệnh có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của các loại cây trồng. Trung bình, mỗi loại cây trồng có thể bị ảnh hưởng bởi một trăm loại bệnh thực vật hoặc nhiều hơn ví dụ loài *phong lan* chỉ tính riêng *virus* đã phát hiện ít nhất có 25 loại tấn công cây chủ này. Một vài tác nhân gây bệnh chỉ ảnh hưởng đến một

loại cây trồng. Các tác nhân gây bệnh khác ảnh hưởng đến vài yếu tố hoặc thậm chí đến hàng trăm loài cây trồng. Các bệnh hại cây trồng đôi khi được phân loại theo các bộ phận của cây mà chúng tác động đến hoặc theo các loại cây trồng bị ảnh hưởng hoặc theo các triệu chứng mà chúng gây ra nhưng *trong thực tế thì một triệu chứng có thể do nhiều tác nhân bệnh gây ra, hoặc nhiều khi một tác nhân bệnh lại gây nên nhiều triệu chứng. Tuy nhiên, các tiêu chuẩn hữu hiệu nhất để phân loại bệnh là các dạng tác nhân gây bệnh. ích lợi của việc phân loại như thế chính là việc chỉ ra nguyên nhân của bệnh, gợi ý nhanh sự phát triển của bệnh có thể có và sự lan rộng của bệnh và của những biện pháp phòng trừ có thể.* Trên cơ sở này, các bệnh hại cây trồng được phân loại (theo plant Pathology tái bản lần thứ 4, 1997.):

A. Các bệnh lây nhiễm hoặc là các bệnh sinh học ở cây trồng:

1. Các bệnh do nấm gây ra.
2. Các bệnh do các vi sinh vật tiến nhân (vi khuẩn và các mollicute).
3. Các bệnh do các thực vật ký sinh gây ra.
4. Các bệnh do các virus và viroid gây ra.
5. Các bệnh do tuyến trùng gây ra.
6. Các bệnh do động vật nguyên sinh gây ra.

B. Các bệnh không lây nhiễm hoặc các bệnh không sinh học ở cây trồng:

1. Các bệnh do nhiệt độ quá cao, quá thấp gây ra
2. Các bệnh do việc thiếu, thừa độ ẩm đất gây ra
3. Các bệnh do thiếu hoặc thừa ánh sáng
4. Các bệnh do thiếu oxy
5. Các bệnh do ô nhiễm không khí
6. Các bệnh do thiếu hụt dinh dưỡng.
7. Các bệnh do các độc tố khoáng
8. Các bệnh do đất bị kiềm hoặc axit (PH)
9. Các bệnh do độc tố của thuốc trừ sâu.
10. Các bệnh do việc canh tác không hợp lý.

II. Những đòi hỏi cấp bách ngoài thực tế sản xuất

Sự phát triển về sản phẩm nông nghiệp sạch và bền vững của các loại cây lương thực, thực phẩm và cây cảnh đang là vấn đề hết sức được quan tâm bởi các ngành trong lĩnh vực phát triển kinh tế nhằm đáp ứng các nhu cầu tiêu thụ trong nước và phát triển trao đổi kinh tế với các nước trên thị trường quốc tế. Nhưng hiện nay ở Việt Nam cũng như trên thế giới một số bệnh thực vật như *vi khuẩn, virus, nấm, tuyến trùng...* gây nên những thiệt hại vô cùng to lớn và chúng đang làm giảm đi một cách đáng kể chất lượng sản phẩm cũng như năng suất cây trồng. Chỉ nói riêng về cây lúa ở nước ta tính trong 5 năm từ 1990 đến 1994, diện tích lúa gieo cấy bình quân mỗi năm từ 6 đến 6,6 triệu ha, trong đó mỗi năm diện tích bị nhiễm dịch hại từ 2,5 đến 3,3 triệu ha và có từ 150.000 ha đến 900.000 ha bị nhiễm nặng, năng suất giảm trên 70%, diện tích mất trắng từ 16.000 đến 46.000 ha, tức là mất khoảng từ hơn 50.000 đến 150.000 tấn thóc. Riêng các nấm hại lúa quan trọng và phổ biến như *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* hoặc các vi khuẩn như *Xanthomonas oryzae*, *Burkholderia glumae* vv..., mỗi năm vẫn lây nhiễm trên hàng triệu ha, trong đó hàng chục ngàn ha bị mất trắng. (theo báo cáo của Gs Vũ Khắc Nhượng, 1999).

Đối với các cây lâu năm khác như cao su, cà phê, cây ăn quả... bệnh hại đã gây những tổn thất đáng kể. Từ nhiều năm nay, cam quýt của ta không thể đạt năng suất bình quân trên 10 tấn quả vì bệnh Greening. Nấm *Oidium heveae*, *Phytophthora palmivora*, *Cortisium salmonicolor* làm sản lượng mủ cao su hàng năm mất bình quân 6-8%. Cà phê trong 3-4 năm vừa qua có những dịch hại tàn phá nặng nề song vẫn chưa phát hiện chính xác được bệnh nguyên... Trong lĩnh vực cây hoa cây cảnh thì vấn đề bệnh tỏ ra càng trầm trọng hơn, phần lớn chúng đều là những loại nhân giống bằng con đường vô tính. Vì vậy, việc nhiễm bệnh và lan truyền bệnh càng dễ dàng và nhanh chóng.

III. Những khó khăn trong công tác kiểm dịch thực vật tại cửa khẩu

Trong những năm gần đây, quan hệ thương mại giữa Việt Nam với các nước trên thế giới được mở rộng, đặc biệt là với các nước trong khối ASEAN. Hàng hoá thực vật xuất, nhập khẩu tăng cả về khối lượng và chủng loại đặc biệt là giống cây trồng (riêng Dưa là 26.424.375 chổi) dẫn đến việc tổ chức KDTV rất phức tạp. Tại cửa khẩu, hiện nay để giải phóng hàng nhập, thủ tục Hải quan chỉ cho phép trong 2 giờ mà yêu cầu về mặt kiểm dịch thực vật được thể hiện trong các hợp đồng thương mại ngày càng cao. Đặc biệt đối với các bệnh tiềm ẩn..... Chính vì vậy, công tác giải Phóng hàng nhanh, chính xác, tránh ách tắc tại cửa khẩu là vấn đề được đặt ra cấp bách đối với ngành KDTV (theo Báo cáo của Phòng Kiểm dịch Thực vật - Cục Bảo vệ Thực vật).

IV. Vấn đề nền nông nghiệp sạch - bền vững - an ninh lương thực

Đề đảm bảo an ninh lương thực Quốc gia đồng thời đáp ứng với sự phát triển của nền kinh tế nước nhà trong những năm gần đây Việt Nam đã nhập nhiều loại giống cây trồng kể cả cây hoa và cây cảnh, từ nhiều Quốc gia khác nhau. Điều này luôn luôn kèm theo các nguy cơ nhập theo các vi sinh vật gây hại ngoài ý muốn, đặc biệt là các bệnh hại thuộc diện đối tượng KDTV của Việt Nam. Theo báo cáo của Trung tâm KDTV sau nhập khẩu I chỉ riêng từ năm 1997 đến tháng 6 năm 1999, đã điều tra, theo dõi và thông kê được trên tổng số 719 mẫu giống nhập nội có 42 loài ký sinh gây bệnh trên hạt, 14 loài gây hại trong nhà kiểm dịch và 92 loài gây hại ngoài sản xuất. Trong đó có 5 loài sinh vật hại thuộc diện đối tượng KDTV của Việt Nam. Vấn đề đặt ra là làm sao để có thể ngăn chặn được nguy cơ bùng phát những dịch hại mới mà vẫn đảm bảo thông thoáng trong việc nhập khẩu giống cây trồng tiến bộ về năng suất và sản lượng "mất giống, sống như chết".

Vấn đề cho ta thấy những tính chất nghiêm trọng của bệnh hại đối với sự an ninh lương thực Quốc gia (đặc biệt nước ta là nước nông nghiệp chiếm 80%, giá trị GDP do nông nghiệp 40%) và tính cấp bách trong việc quản lý chúng.

Do vậy đòi hỏi phải làm chủ được sự hiểu biết về bệnh và các kỹ thuật chẩn đoán đặc hiệu, nhanh, nhạy, sớm, để vận hành và giá thành rẻ... , để kịp thời phát hiện ngăn chặn và phát hiện thanh toán bệnh.

V. Sự đáp ứng các đòi hỏi cấp bách của các công nghệ cao trong chẩn đoán

Trong lĩnh vực bệnh hại thực vật cũng như trong Y tế và Thú y khâu chẩn đoán bệnh vô cùng quan trọng vì nhận biết một tác nhân gây bệnh là cơ sở để dự kiến một chiến lược phòng chống có hiệu quả nhất. *Chẩn đoán thực vật* bao gồm hai vấn đề khác nhau theo các yêu cầu kỹ thuật và sự tổ chức mà nó liên quan:

1. Vấn đề phát hiện một tác nhân gây bệnh trong khuôn khổ của một quá trình cấp chứng chỉ hay kiểm dịch, đòi hỏi độ nhạy của kỹ thuật được dùng rất cao để cho phép làm sáng tỏ những sự nhiễm chậm ở các cây không biểu hiện triệu chứng.
2. Nhận dạng một tác nhân gây bệnh đòi hỏi vận dụng một kỹ thuật ít nhạy hơn so với kỹ thuật cần cho một thủ tục cấp chứng chỉ- kiểm dịch, nhưng nó thể hiện những mức độ đặc hiệu. Chúng cho phép phân loại tác nhân đó với một sự chính xác áp dụng ở những vấn đề cần xem xét kỹ (loài, pathovar, biotype...). Các tiến bộ về sinh học phân tử và di truyền đã giúp cho sự xuất hiện rất nhiều kỹ thuật sử dụng trong việc phân loại đặc điểm các phân tử miễn dịch (đặc biệt các protein) hay trình tự các axit nucleic. Axit nucleic là những phân tử lớn mang thông tin di truyền của bất cứ cơ thể sống nào, Không những thế, nó còn mang tính duy nhất của một cá thể nào đấy. Vậy, xác định được sự khác nhau của hai cơ thể ở mức độ ADN sẽ dẫn đến kết quả chính xác tuyệt đối cho kết quả chẩn đoán bệnh hoặc theo dõi các tác nhân bệnh tiềm ẩn trong các nghiên cứu dịch tễ học kể cả trong lĩnh vực nông nghiệp. Các kỹ thuật này chúng ta đã biết hoặc sẽ biết trong thời gian rất gần. Những phát triển này tiến triển sự thương mại các phép thử trong chẩn đoán các tác nhân gây bệnh thực vật. Điều quan trọng là các nhà sử dụng những kỹ thuật khác nhau này (các nhà bệnh học thực vật, các nhà cải tạo giống, các nhà sản xuất giống và cây trồng, các nhà lâm luật) được thông báo đúng đắn về những sự tiến tiến của kỹ thuật sinh học phân tử, về những tiềm năng và những hạn chế của chúng.

C. NHƯ THẾ NÀO ?

Các phương pháp huyết thanh và các kỹ thuật phân tử (PCR, AFLP, RFLP, Lai ADN...) cho phép phát hiện sớm những căn bệnh thực vật. Các bộ sinh phẩm chẩn đoán trong phòng thí nghiệm cũng như ngoài sản xuất rất nhạy, có một gam khá rộng cho các phương tiện chẩn đoán.

VI. Phương pháp huyết thanh-Kỹ thuật ELISA

Những phương pháp huyết thanh được dựa trên một đặc điểm của động vật là cơ thể của chúng có khả năng nhận biết một cơ thể lạ (gọi là kháng nguyên) và sinh ra những phân tử lớn đặc hiệu với kháng nguyên này. Đó là những kháng thể. Những phương pháp chẩn đoán bao hàm việc sử dụng kháng huyết thanh hoặc kháng thể được nhân rộng lên rất nhiều và được biết đến ở khắp mọi nơi, về sự đơn giản của phương pháp. Kỹ thuật được dùng nhiều nhất hiện nay là phương pháp ELISA có rất nhiều

biến dạng ELISA mà đặc điểm chung là sự có mặt của tập hợp kháng nguyên, kháng thể được nhìn thấy bằng mắt qua một phản ứng *enzyme* sinh ra một hợp chất nhuộm màu có thể định lượng được. Các kỹ thuật huyết thanh này tương đối dễ dàng vận dụng và dễ vận hành. Cho đến nay chúng là các phương pháp cần thiết trong chẩn đoán hàng loạt thuần thực. Chúng đã được cải tiến độ nhạy lên đến 80 lần so với ELISA ban đầu.

Tuy nhiên, mỗi một kỹ thuật đều có yêu cầu riêng của nó. Vì vậy cần thiết phải nhờ đến các kỹ thuật chẩn đoán dựa trên cơ sở sinh học phân tử.

VII. Phản ứng chuỗi polimerase (PCR)

PCR là một phương tiện để nhân một đoạn ADN nằm giữa hai vùng đã xác định trình tự lên một số lượng lớn. Hai *olionucleotide* được sử dụng như là các đoạn môi (primer) cho một chuỗi các phản ứng tổng hợp được xúc tác bởi một ADN *polimerase*. Quá trình nhân đôi tiêu thụ một số lượng lớn 4 loại deoxyribonucleotit triphosphate dNTPs.

PCR được sử dụng để nhân các chuỗi ADN với số lượng lớn từ ADN hoặc từ ARN. Bằng sự thay đổi tỷ lệ các đoạn môi, việc tạo các sản phẩm mạch đơn chiếm ưu thế về số lượng tạo thuận lợi cho việc xác định trình tự ADN. Những thay đổi trong quan điểm PCR cơ bản đã làm cho nó trở thành một kỹ thuật đa năng kỳ diệu trong lĩnh vực sinh học phân tử, nó cũng góp phần vào công tác chẩn đoán bệnh, chọn tạo giống cây trồng với giá thành thấp qua việc chọn lọc có sự trợ giúp của kỹ thuật phân lập gen và xác định bản đồ gen đánh dấu, đặc biệt là trong chọn giống chống chịu bệnh và côn trùng.

VIII. Ứng dụng ELISA trong nghiên cứu bệnh virus hại Lan tại Việt Nam

Họ Lan (*Orchidaceae*) là một trong những họ thực vật lớn nhất, bao gồm khoảng 800- 900 chi và hơn 25.000 loài (Zeetler và cs., 1990; Sheehan và cs., 1983a), chúng gần như phân bố ở tất cả các vĩ độ trong tất cả các vùng khí hậu. Nó là một loại hoa không đối thủ, mang lại nguồn lợi kinh tế cao cho nhiều Quốc gia trên thế giới. Tuy nhiên nó là loại cây chủ "*thích hợp*" đối với nhiều loại bệnh đặc biệt là các bệnh *virus*. Hiện nay đã phát hiện được ít nhất 25 loại *virus* gây bệnh trên lan nhưng hai loại *virus* CYMV và ORSV là *gây thiệt hại nặng nề nhất* trong tất cả các vùng trồng lan trên thế giới, thậm chí gây mất hoàn toàn 100% sản phẩm. Hiện nay ở nước ta lan đang được nhập ồ ạt từ nhiều nguồn khác nhau như Thái Lan, Trung Quốc (Đài Loan), Singapo, Pháp, Lào v.v.; không qua các khâu kiểm dịch chặt chẽ đã ngày càng làm tăng thêm sự nguy hại của chúng trong điều kiện cụ thể ở các vùng trồng lan của ta. Đứng trước thực tế này, Viện Di truyền Nông nghiệp đã phối hợp với các nhà sản xuất lan thực hiện đề tài: "Điều tra xác định bệnh virus đốm vòng *Odontoglossum* và khảm *cymbidium* trên lan bằng kỹ thuật ELISA tại một số vùng sản xuất lan chính và cải tiến tăng độ nhạy của kỹ thuật".

A. MỤC ĐÍCH CỦA ĐỀ TÀI

1. Khẳng định sự có mặt của hai loại *virus* khảm *Cymbidium* (CyMV) và đốm vòng nhân *Odontoglossum* (ORSV) trên hoa lan Việt Nam.
2. Tìm hiểu về mức độ phổ biến và khả năng gây hại trên đối với các loại lan có khả năng thương mại ở Việt Nam.
3. Bước đầu nghiên cứu hai thông số liên quan đến dịch hại của hai loại *virus* trên
4. Phát triển nghiên cứu cho chương trình cấp chứng chỉ sạch bệnh và kiểm dịch thực vật cho lan.

Vật liệu thực vật gồm:

- Các giống lan lai được thu thập từ các nhà trồng lan tại các vùng khác nhau: *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Odontoglossum*, *Vanda*, *Phalaenopsis*... và một số loại lan rừng nguyên chủng tại Sapa, Lào Cai, Ba Vì và Đà Lạt: *Tai châu*, *Quế hương*, *Hạ đình*, *Phi điệp*, *Mạc lan*, *Hồng hoàng*
- Cây con mọc từ chồi và từ hạt trong bình nuôi cấy mô tại Phòng Bệnh học Phân tử Thực vật: Viện Di truyền Nông nghiệp.
- Hai loại *virus* được nghiên cứu là:

1. *Odontoglossum Ringspot Virus*

2. *Cymbidium Mosaic virus* (CyMV)

(ORSV) là virus gây đốm vòng thuộc

virus gây khảm trên lan, gây chết hoại

nhóm Tobamovirus, virus hình gây.

tử hoặc đốm mất màu trên lá, hoa.

Sử dụng phương pháp DAS-ELISA (theo Clark và Adam; 1977).

B. KẾT QUẢ CHO THẤY

1. Trên tất cả các giống lan lai được kiểm tra đều có nhiễm hai virus CyMV và ORSV đặc biệt tỷ lệ bệnh khá cao tại các vùng có tiềm năng sản xuất hoa lan tại nước ta như thành phố Hồ Chí Minh và Đà Lạt. Triệu chứng của chúng gây ra cho lan trong điều kiện Việt Nam rất đa dạng và có nhiều sự khác biệt giữa các giống khác nhau.
2. Không tìm thấy hai loại *virus* này trên các giống lan rừng nguyên chủng và chúng không được truyền qua hạt. (bảng 1.)

Bảng 1. Mức độ xâm nhiễm của CyMV và ORSV tại một số vùng sinh thái khác nhau
(Thực hiện tháng 5/1998)

STT	Địa điểm	Phân trăm cây (%)				Tổng số mẫu kiểm tra
		CyMV- ORSV-	CyMV+ ORSV-	ORSV+ CyMV-	ORSV+ CyMV+	
1	Sapa	100,00	00,00	00,00	00,00	18
2	Hà Nội	46,67	26,67	08,33	18,33	54
3	Qui Nhơn	62,22	08,89	13,33	15,56	19
4	TP. Hồ Chí Minh	29,34	37,33	20,00	13,33	60
5	Đà Lạt	10,0	37,14	32,86	20,00	56
Tổng số		46,95	23,79	15,76	13,50	207

3. Chúng tôi nhận thấy sự phát hiện bằng mắt thường chỉ mang tính tương đối. Dạng gây cản cố, sinh trưởng kém bị nhiễm *virus* cao nhất trong các triệu chứng đã thu thập được, đặc biệt tỷ lệ nhiễm của cả hai loại *virus* lên tới 43,24%. Những cây nhiễm CyMV nhưng không biểu hiện triệu chứng chính là nguyên nhân làm tăng sự lây lan của bệnh qua các biện pháp chăm sóc. (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả kiểm tra CyMV và ORSV qua mô tả triệu chứng (tháng 8/1998).

STT	Dạng triệu chứng	Tổng số mẫu kiểm tra (cây)	Tỷ lệ cây nhiễm virus (%)			
			Tổng số	CyMV+	ORSV+	C CyMV+, ORSV+
1	Khảm lá	38	65,79	23,68	10,53	31,58
2	Mất màu hoa	30	73,33	6,67	43,33	23,33
3	Đốm vòng	22	63,62	13,63	40,90	9,09
4	Lá chuyển vàng	35	62,86	22,86	14,29	25,71
5	Lá biến dạng	26	57,69	26,92	11,54	19,23
6	Hoại tử trên lá	23	49,41	31,82	4,55	13,01
7	Cây sinh trưởng kém, khó ra hoa	37	81,07	24,32	13,51	43,24
8	Không triệu chứng	49	36,73	22,45	10,20	04,08
Tổng		32,5	6131	27,35	13,50	21,16

4. Khi kiểm tra mẫu của các vật liệu nuôi cấy *in vitro* còn tỏ ra có nhược điểm. Nếu lượng mẫu quá ít, kết quả sẽ không cho một ngưỡng chắc chắn. Vì vậy, trong thực tế sản xuất và phân tích mẫu hàng loạt đòi hỏi phải cải tiến độ nhạy của kỹ thuật ELISA cổ điển (bảng 3).

C. KỸ THUẬT ELISA CÓ GẮN HỆ THỐNG AVIDINE-BIOTINE:

Việc nhân giống *in vitro* đòi hỏi một sự kiểm tra tình trạng bệnh hết sức nghiêm khắc vì:

- Cây con và thân giả cây nuôi cấy trong ống nghiệm có lượng *virus* rất ít, nên phương pháp kiểm tra phải có độ nhạy cao.
- Việc kiểm tra và phát hiện *virus* chính xác ở cây mẹ có ý nghĩa cho phép nhân bản nguồn cây con sạch bệnh về sau.

Vì vậy, chúng tôi đã cải tiến phương pháp chẩn đoán ELISA bằng cách đưa thêm hệ thống *Avidine-Biotine* nhằm tăng độ nhạy của phản ứng để đáp ứng yêu cầu thực tế nhân giống lan nói riêng và các loại cây nhân hoặc giữ giống bằng phương pháp *in vitro* nói chung.

Bảng 3. Kiểm tra phát hiện CyMV và ORSV trên cụm chồi, cây con trong in vitro

Vật liệu thử	Mẫu	ORSV	CyMV
Cụm chồi từ cây mẹ bị nhiễm	1	+	-
	2	+++	-
	3	++	+
	4	++	$\frac{+}{-}$
Cây con	Cụm chồi	+	-
	Lá	++	++
	Cụm chồi	+	-
	Lá	+++	++
	Cụm chồi	+	+
	Lá	+	+
	Cụm chồi	+	$\frac{+}{-}$
	Lá	+	+

Chú thích:

- D.O: đo ở bước sóng 405 nm. (+): lớn gấp hai lần so với mẫu sạch
 (-): nhỏ hơn hoặc bằng mẫu sạch (++) : lớn gấp ba lần so với mẫu sạch
 (+): không khác nhiều so với mẫu sạch (+++): lớn gấp bốn lần so với mẫu sạch

Tóm lại, ELISA có gắn Avidine-Biotine có độ nhạy lớn hơn phương pháp ELISA thông thường từ 5-75 lần tùy theo từng trường hợp cụ thể. Mặt khác, thời gian thực hiện ELISA có gắn Avidine-Biotine ngắn hơn mặc dù quá trình thực hiện dài hơn (5 bước). *Kết quả này khẳng định một lần nữa ELISA có gắn Avidine-Biotine là một kỹ thuật rất phù hợp cho chẩn đoán bệnh ở nồng độ virus thấp trong khoảng thời gian ngắn.*

IX. Ứng dụng PCR trong nghiên cứu đa dạng của vi khuẩn *Xanthomonas*

Các bệnh *vi khuẩn* cũng gây ra những thiệt hại khổng lồ không lường trước được trên đối tượng cây trồng. Đặc biệt đối với nhóm *Xanthomonas* được Warker tách ra lần đầu vào 1883. Trên đối tượng cây lâu năm đặc biệt trong vùng nhiệt đới, sự thiệt hại về kinh tế nghiêm trọng do bệnh này gây nên đều đã được biết đã được biết

Mục đích:

Xác định sự có mặt của một số tác nhân gây bệnh trong nhóm *Xanthomonas*. *Campetrie* có ở Việt Nam bằng kỹ thuật PCR

1. Vật liệu thí nghiệm.

Các chủng được phân loại như *Xanthomonas* (bảng 4). Tách từ các vùng khác nhau.

Vì khuẩn được nuôi giữ trên môi trường GYCA.

enzyme restriction là Alu I

Marquer là 100 bp

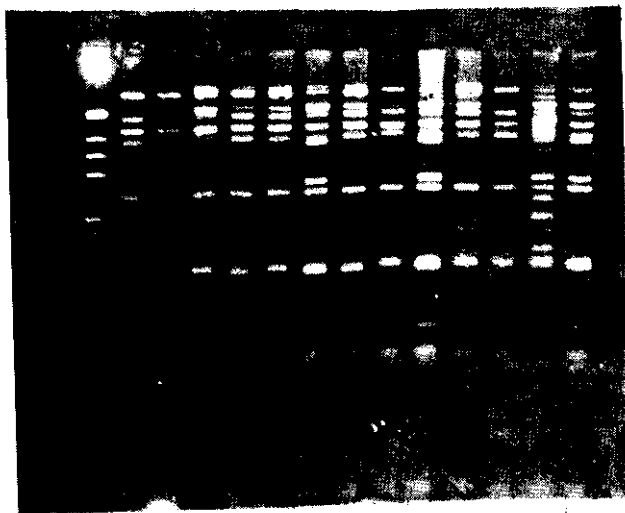
Gel Metaphor

Đoạn mồi AS 17 và L 20

Bảng 4. *Xanthomonas. C.* được sử dụng trong nghiên cứu

Species và pathovar	Cây chủ	Nơi lấy mẫu	Năm tách	Ghi chú
<i>X. C. vasculorum</i>	Mía	Thanh Hoá	1998	
<i>X.C maniotid</i>	Sắn	Vĩnh Phú	1997	
<i>X.C. pelargonii</i>	Cây mỗ hạc	Việt Nam	1998	
<i>X.C.diefferenbachie</i>	Tiểu hồng môn	Đà Lạt	1998	
<i>X.C.diefferenbachie</i>	Tiểu hồng môn	Hà Nội	1998	
<i>X.C. citri</i>	Cam-Hải Hưng	Vĩnh Phúc	1997	
<i>X.C. citri</i>	Cam-Hà Nội	Hà Nội	1997	
<i>X.C. phaseoli</i>	Cây đậu	Hà Nội	1997	
<i>X.C. phaseoli</i>	Cây đậu	Vĩnh Phúc	1997	
<i>X.C. mangiferae</i>	Cây xoài	Hà Nội	1998	

Kết quả thể hiện ở hình 1.

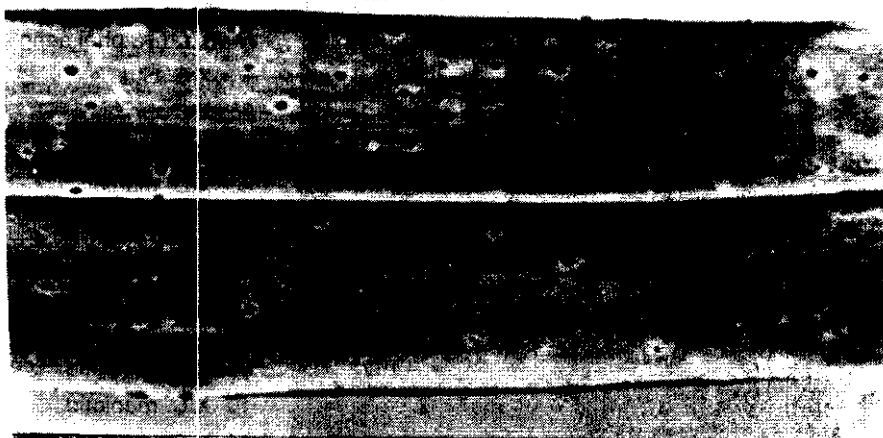


Hình 1. (Từ phải sang trái)

1. *X.C. citri*
2. *X.C. "*
3. *X.C. phaseoli*
4. *X.C. maniotid*
5. *X.C. pelargonii*
6. *X.C. diefferenbachie*
7. *X.C. maniotid*
8. *X.C. mangiferae*
9. *X.C. maniotid*
10. *X.C. maniotid*
11. *X.C. vasculorum*
12. *X.C. pelargonii*
13. *X.C. phaseoli*



Cymbidium Mosaic virus (CyMV)
Virus gây khảm trên hoa



Cymbidium Mosaic virus (CyMV)
Virus gây đốm vòng trên lá



X.C. diefferenbachie
Tiểu hồng môn Đà Lạt



X.C. diefferenbachie
Tiểu hồng môn Hà Nội



X.C. citi
Trên cam chanh

Qua các kết quả thu được ở hình 1, cho thấy rằng kỹ thuật PCR rất nhạy, đặc hiệu và tiện lợi cho việc phân loại tác nhân gây bệnh, tất nhiên mỗi kỹ thuật đòi hỏi những yêu cầu khác nhau của từng điều kiện cụ thể. Việc sử dụng các kỹ thuật này trong các qui trình cấp chứng chỉ hoặc Kiểm dịch Thực vật hết sức phù hợp và hiệu quả. Một điều tất yếu là chúng ta phải hoàn thiện chúng trong từng điều kiện cụ thể của mỗi phòng thí nghiệm và yêu cầu của kỹ thuật.

D. KẾT LUẬN

Với sự phát triển của nền nông nghiệp hiện đại, các yêu cầu bức xúc của thực tế sản xuất và xã hội như đã nêu trên việc ứng dụng các công nghệ phân tử trong chẩn đoán bệnh là cần thiết và hoàn toàn đáp ứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. C. Manceau và cs, 1997.

Assessment of Genetic Diversity among Strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment Length Polymorphism Analysis of rRNA Operons with Special Emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. Applied and Environment Microbiology, Feb. 1997, p. 498-505.

2. Y. Berthier và cs, 1989.

DAS-ELISA test to detect *Xanthomonas*. C. *ampestris*. PV. *Dieffenbachiae* in *Anthurium* propagative material: 7 th Int. Conf. Plant Path. Bact., Budapest, Hungary, 1989.

3. F. W. Zettler, et al., 1999

Viruses of orchids and their control. Plant diseases, 9/1999, P. 621-626.

MOLECULAR TECHNIQUE FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF PLANT PATHOGENS IN VIETNAM (WHY AND WHAT)

Le Thi Anh Hong, Phan To Phuong, Tran Duy Quy,
Nguyen Mai Chi, Nguyen Thuy An, Nguyen Hang Phuong,
Mai Thu Ha, Luong Thi Hai, Dam Quoc Tru, Nguyen Van Dong

SUMMARY

Current developments in agricultural and horticultural production systems in Vietnam require simple, rapid and sensitive techniques for the diagnosis of plant pathogens.

Progress in molecular biology and medical diagnosis generated a number of biochemical techniques that have been successfully applied to crop protection and plant pathogen detection.

Among serological methods, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is the most commonly used technique nowadays for viral and bacterial detection and identification. It meets the desired requirements for generalized use and can be easily automated.

A significant advance in molecular biology was the advent of the Polymerase Chain Reaction (PCR), which involves the enzymatic amplification of a specific target DNA sequence. Once the DNA is amplified, it can be detected by electrophoresis or nucleic acid hybridization. The potential increase in sensitivity provided by the PCR products. For practical use, any method of diagnosis should be evaluated in terms of sensitivity, reliability and cost, according to the problem encountered.

The PCR procedure using a battery of group-specific primers allows all members of a viral group to be detected by a relatively rapid and simple, yet sensitive, assay. This polyvalent approach does not require any preliminary work of separating or purifying the components of viral complexes, and is therefore particularly useful for quarantine or certification purposes where the primary objective is to identify pathogen-infected samples, whatever the identity of the pathogen involved.

On the five orchids association's initiative the IGA has analysed more than 500 orchids with ELISA tests to look for Cymbidium Mosaic Virus and Odontoglossum Ring Spot Virus in orchid collection's. Both found in four collections: about 53,05%.

A collection of 26 strains of Xanthomonas Campestris pv. isolated from six different host species in four provinces was assessed by analysis of the PCR.

1.P.1**ĐẶC TÍNH HOÁ PHÂN LOẠI CHỦNG VI KHUẨN LACTIC SINH BACTERIOXIN CÓ PHỔ TÁC DỤNG RỘNG***

Phạm Thị Ngọc Lan, Trần Thị Thuý, Lê Thanh Bình
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bacterioxin là protein có phân tử lượng nhỏ, có khả năng ức chế và tiêu diệt các vi sinh vật có nguồn gốc phân loại gần với chủng sinh ra chúng(1). Những nghiên cứu về bacterioxin do vi khuẩn lactic tổng hợp đặc biệt phát triển mạnh trong 10 năm gần đây không chỉ vì khả năng áp dụng rộng lớn của chúng mà còn do nhận rõ hậu quả mà nhân loại phải trả giá về tình trạng ô nhiễm môi trường, ngộ độc thực phẩm do việc dùng hoá chất trong bảo quản thực phẩm (2,3). Hơn thế nữa, do những thành tựu của kỹ thuật protein, kỹ thuật di truyền mà những hạn chế của bacterioxin ngày càng được khắc phục. Mặt khác những nghiên cứu cơ bản về quan hệ cấu trúc và chức năng qua mô hình bacterioxin sẽ là một lĩnh vực rất quan trọng cung cấp cho chúng ta nhận thức về cơ chế mà bacterioxin nhận biết và tiêu diệt tế bào nhạy cảm (3).

Tìm kiếm các chủng lactic sinh bacterioxin có phổ tác dụng rộng, với cả vi khuẩn Gram +, vi khuẩn Gram -, và đặc biệt với các loại gây bệnh như *Salmonella*, *Clostridium*, *E. coli*, *Listeria*... đang thu hút sự quan tâm lớn của các nhà nghiên cứu. Dưới đây là những kết quả nghiên cứu về đặc điểm phân loại của chủng Tn143, một chủng sinh bacterioxin có phổ tác dụng rộng rất đáng được chú ý.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**1. Vật liệu**

693 chủng vi khuẩn lactic phân lập được từ các nguồn thực phẩm lên men như nem chua, tôm chua, xúch xích, sữa chua... dùng làm nguồn vật liệu cho việc chọn lọc định hướng các chủng sinh bacterioxin có phổ tác dụng rộng. Chủng Tn 143 là một trong số những chủng trên, nó không chỉ có tác dụng tiêu diệt các chủng kiểm định Gram dương như *Bacillus subtilis*, *Bac. cereus*, *Sarcina luteria* mà còn đối với cả *Salmonella typhimurium* thuộc Gram âm và là loại gây bệnh nguy hiểm.

(*) Công trình có sự hỗ trợ kinh phí của chương trình nghiên cứu cơ bản và Mạng lưới nghiên cứu vi sinh vật học châu Á (ANMR)

Môi trường để phân lập và chọn lọc là MRS và GYP-CaCO₃(4). Các thiết bị dùng cho nghiên cứu hình thái tế bào gồm kính hiển vi quang học Olympus CH-2 (Nhật bản), kính hiển vi điện tử JEM-T8.

Sử dụng 22 nguồn các bon khác nhau cho nghiên cứu đặc điểm sinh lý và sinh hóa (trình bày trong phần kết quả)

2. Phương pháp

Phân lập các chủng vi khuẩn lactic sinh bacterioxin theo phương pháp (4)

Xác định khả năng sinh bacterioxin theo (4, 5).

• Đặc điểm hình thái

Quan sát hiển vi các tiêu bản nhuộm Gram. Cho quan sát hiển vi điện tử các tiêu bản được cố định bằng phương pháp hoá học và phủ lớp kim loại mỏng, đặc biệt lên trên mẫu bốc hơi trong chân không, sau đó tạo màng bóng replica trên bề mặt.

• Đặc tính sinh lý sinh hoá

Nghiên cứu sự chuyển hoá, lên men các nguồn cacbon khác nhau. Chúng tôi sử dụng 22 nguồn các bon gồm các loại đường khác nhau cho nghiên cứu lên men sinh axit lactic, một đặc điểm rất đặc trưng cho vi khuẩn lactic. Ngoài ra còn xác định khả năng sinh khí trong môi trường chứa glucoza cũng như xác định hoạt tính catalaza (6).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



Ảnh 1



Ảnh 2

Hình 1. Hình thái tế bào chủng Tn 143

Các quan sát hình dạng và sự sắp xếp tế bào (hình 1) của chủng Tn143 qua hiển vi quang học (Ảnh 1) và hiển vi điện tử (Ảnh 2) cho thấy, tế bào của chủng Tn143 có hình oval, xếp thành từng chuỗi, thường là 2, 4 tế bào. Chủng Tn143 thuộc loại không di động, không sinh bào tử. Trên môi trường đặc khuẩn lạc có hình tròn nhỏ, lồi ở giữa, mép mỏng và trơn, khuẩn lạc có màu vàng kem.

Tại bảng 1 không chỉ trình bày tóm tắt các đặc điểm hình thái mà còn cho chúng ta thấy kết quả nghiên cứu các đặc điểm sinh lý, sinh hoá của chủng Tn143.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá

Các chỉ tiêu	Đặc điểm
1. Khuẩn lạc: Hình dạng Màu sắc	Tròn, lồi, mép mỏng và trơn Vàng kem, vàng nhạt
2. Tế bào: Hình dạng Cách sắp xếp Nhuộm Gram	Oval Chuỗi G+
3. Sinh bào tử	-
4. Hoạt tính catalaza	-
5. Khả năng di động	-
6. Sinh khí từ lên men glucoza	-
7. Kỵ khí bắt buộc	-
8. Sinh trưởng ở : 10° 15° 45° pH=4,5 pH=5 pH=9.5 pH=10 6% NaCL 10% NaCL	+ + + - + + - + -
9. Phổ kháng khuẩn : <i>Bacillus cereus</i> ATCC21118 <i>Bac. subtilis</i> ATCC 3558 <i>E. coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Sarcina lutea</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1149	+ + - + + +

2. Khả năng lên men các nguồn các bon

Chúng tôi nghiên cứu khả năng lên men của chủng trên với 22 nguồn các bon dưới đây. Kết quả sau 7 ngày nuôi cấy cho thấy chủng có khả năng lên men hầu hết các nguồn các bon chỉ trừ có tinh bột, melizitose, sorbitol và rhamnose (bảng 2).

Bảng 2. Khả năng lên men các nguồn các bon

Thay đổi pH do lên men các nguồn các bon																					
L-ar	D-Xy	Rh	Ri	Gl	Ma	Fr	Ga	Sa	Ml	Cl	Lc	Tr	Mb	Ra	Mi	St	Mt	Sr	Es	Sl	Am
3.7	4.0	6.3	4.0	3.4	3.1	3.1	3.1	2.9	3.4	3.4	3.5	2.7	4.6	4.9	7.0	7.0	3.2	6.8	4.9	3.6	4.1

(chú thích: pH control = 7

L-ar : L-arabinose , D-xy: D-xylose, Rh: Rhamnose, Ri: Ribose, Gl: Glucose, Ma: Mannose, Fr: Fructose, Ga: Galactose, Sa: Sacrose, Ml: Maltose, Cl: Cellobiose, Lc: Lactose, Tr: Trehalose, Mb: Melibiose, Ra: Rafinose, Mi: Melizitose, St: Starch, Mt: Manitol, Sr: Sorbitol, Es: Esculin, Sl: Salicin, Am: Amigladin.

Trên cơ sở các kết quả đạt được trình bày ở trên, đối chiếu với khoá phân loại Bergey (7) nhận thấy chủng có nhiều đặc điểm gần với các loài thuộc giống (*Genera*) *Enterococcus*. Tuy nhiên để có những kết quả tin cậy hơn, có thể phân loại đến loài đòi hỏi những nghiên cứu chi tiết hơn bao gồm những nghiên cứu đối chiếu với các chủng chuẩn (type strain), và đặc biệt là sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử mới rất hiệu quả như phương pháp lai ADN -photobiotin (8).

IV. KẾT LUẬN

Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, tính chất sinh lý, sinh hoá chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp bacterioxin có phổ tác dụng rộng cho thấy chủng trên có nhiều đặc điểm và tính chất của chủng thuộc giống *Enterococci*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vandenberg A. P., 1993

Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol. Rev., 12(1993): 221-238

2. Lê Thanh Bình, 1997

Vi khuẩn lactic và kỹ thuật gen, những vấn đề và triển vọng trong sản xuất thực phẩm. UNESCO Workshop, Oct., 20-26, Hanoi.

3. Klaenhammer T. R., 1993.

Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12(1993): 38-86

4. Pot B. , W. Ludwig, K. Kerster and K.H Schleifer, 1994.
Taxonomy of lactic acid bacteria, p.13-89. In L.de Vuyst and E.J. Vandamme (ed), bacteriocins of lactic acid bacteria. Backie Academic & Professional. new York, N.Y.
5. Gonzalez B., P. Arca, B. Mayo and J. E. Suarez. 1994
Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. Appl. Environ. Microbiol. Vol.60, No. 6(1994): 2158-2163
6. Atlas M.R., A.E. Brown, K.W. Dobra, L. Miller., 1996
Experimental microbiology fundamental and application. Macmillan Publishing Company, New York, Collier Macmillan Publisher- London.
7. Sneath H. A. S. P , N.S. Mair, E.E. Shreve, J.G.Holt (ed). 1996.
Bergey Manual of systematic bacteriology. William &Wilkins, Vol.2, 1986
8. Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thanh Bình. 1998
Phương pháp lai ADN không dùng đồng vị phóng xạ một thành tựu mới được sử dụng để xác định mối liên quan về gen trong phân loại vi khuẩn. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, tập 36, số 5(1998), trang 19-23.

TAXONOMIC CHARACTERIZATION OF THE LACTIC ACID BACTERIA STRAIN PRODUCING A BROAD SPECTRUM BACTERIOCIN

Phạm Thị Ngọc Lan, Trần Thị Thủy, Lê Thanh Bình

SUMMARY

The observation on morphological characteristics and studies on physiological, biochemical properties of the lactic acid bacteria strain Tn143 producing a broad spectrum bacteriocin indicate the strain belongs to the genera Enterococci.

1.P.2

CHẤT KHÁNG SINH CHỐNG NẤM CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN TC 5-4 PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

Lê Gia Hy¹⁾, Phạm Kim Dung¹⁾, Bùi Thị Việt Hà²⁾,
Nguyễn Xuân Quế²⁾, Phạm Văn Ty³⁾, Phan Anh Toàn¹⁾

(1): VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC,

(2) : TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN HÀ NỘI.

(3) : VIỆN DA LIỄU HÀ NỘI

I. MỞ ĐẦU

Chủng xạ khuẩn TC 5-4 được phân lập từ mẫu đất lấy ở vùng rễ cây hồ tiêu huyện Xuyên Mộc, tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu, có khả năng cao chống nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ ở cây trồng [5]. Chủng xạ khuẩn này đã được nghiên cứu lựa chọn môi trường dựa trên các môi trường cơ sở lên men xạ khuẩn sinh các chất kháng sinh của Betina, 1975 và điều kiện lên men cho các chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp các chất kháng sinh thích hợp [3,5].

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm phân loại theo Chương trình Xạ khuẩn quốc tế [1, 6, 7, 8, 9].
2. Hoạt tính kháng sinh được xác định theo phương pháp khuếch tán trên thạch và phương pháp pha loãng tới hạn [2, 4].
3. Tối ưu hoá môi trường lên men theo phương pháp của Box-Willson.
4. Sinh khối được xác định theo phương pháp cân trọng lượng (sấy ở 105°C).
5. Lên men theo mẻ được tiến hành trong nồi lên men 80lit Bioflo 5000, hãng New Brunswick (Viện Công nghệ Sinh học).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Các đặc điểm sinh học và phân loại chủng xạ khuẩn TC 5-4

- **Đặc điểm hình thái:** Bề mặt bào tử dạng xù xì (Wa), chuỗi bào tử hình xoắn kép và xit (S), số lượng bào tử 10 - 50/ chuỗi và typ thành tế bào dạng LL-DAP thuộc nhóm I.
- **Đặc điểm nuôi cấy:** Màu khuẩn ty khí sinh từ màu xám đến xám đen, khuẩn ty cơ chất màu vàng nhạt và không có sắc tố tan.

- **Đặc điểm sinh lý - sinh hoá:** Chủng này có khả năng phân giải CMC-Na, casein, tinh bột, khử nitrat và không hình thành melanin; có đồng hoá: D-glucosa, mannito, Maltoza, Rafinoza, L-inositol, D-fructoza, lactoza, saccaroza, xyloza và natrixitrat; không đồng hoá: Rafinoza và mannoza.

Chủng có khả năng sinh trưởng, phát triển ở 20 đến 40°C, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu 28 - 30°C. pH tối ưu 7,0-7,5 và chịu được muối NaCl tới 5%.

- **Hoạt tính kháng sinh:** Chủng xạ khuẩn có hoạt phổ kháng khuẩn rộng và mạnh, có khả năng ức chế được 11 trong số 14 chủng vi sinh vật kiểm định (bảng 1).

Chủng xạ khuẩn TC 5-4 có nhiều đặc điểm phân loại giống loài *Streptomyces hygroscopicus* Waksman và Henrici, 1948 và giống chủng ISP 5578 của Chương trình Xạ khuẩn quốc tế.

Bảng 1. Hoạt phổ kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn TC 5-4

Vi sinh vật kiểm định	Hoạt tính kháng sinh (D-d, mm)	Vi sinh vật kiểm định	Hoạt tính kháng sinh (D-d, mm)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	30	<i>Torula utilis</i> BC 5-y-2524	28
<i>S. lutea</i> ATCC 12222	28	<i>Candida albicans</i>	19
<i>Proteus vulgaris</i>	23	<i>Fusarium oxysporum</i>	35
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	28	<i>Tricophyton entagrophytes</i>	44
<i>Salmonella typhi</i> DT	±	<i>Aspergillus niger</i>	25
<i>E. coli</i> ATCC 15224	10	<i>Shigella sp.</i>	±
<i>Klebsiella pneumonia</i>	19	<i>Candida tropicalis</i>	23

2. Khả năng sinh tổng hợp kháng sinh của chủng TC 5-4

Lựa chọn môi trường lên men:

Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon lên khả năng tổng hợp chất kháng sinh của chủng TC 5-4 (vi sinh vật kiểm định: *B. subtilis* 6633)

Nguồn cacbon	%	pH sau lên men	Sinh khối (mg/ml)	Hoạt tính kháng sinh (D-d,mm)	
				Dịch lọc	Sinh khối
Tinh bột tan	1	7,5	23	10	15
Tinh bột tan	2	7,1	20	9	12
Glucosa	1,5	7,5	20	15	30
Lactoza	1,5	7,8	13	16	28
Maltoza	1,5	7,9	23	9	14
Dextrin	1,5	7,2	18	10	15
Saccaroza	1,5	7,8	10	15	16
Rỉ đường	1,5	7,9	12	18	25

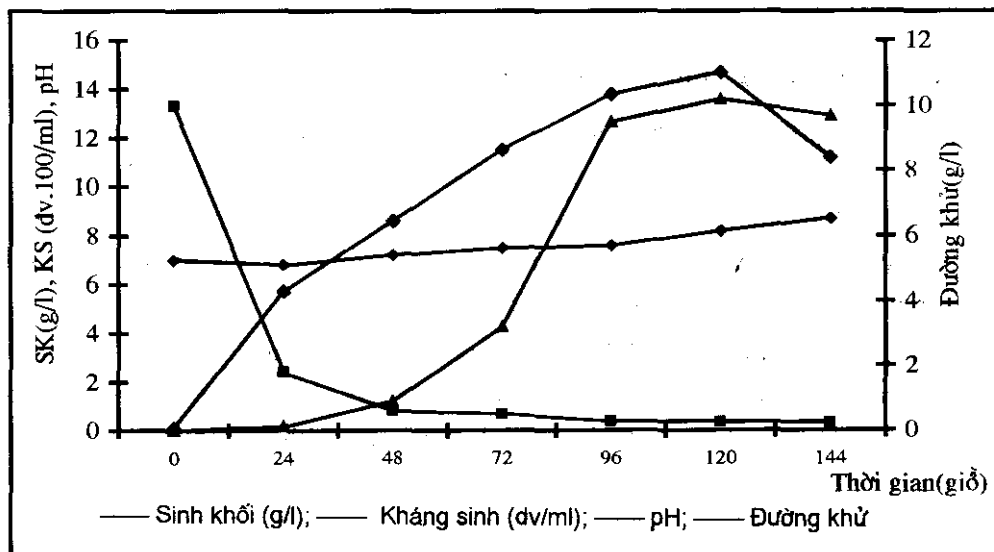
Dựa trên 5 loại môi trường cơ sở lên men các chất kháng sinh từ xạ khuẩn: A-4, A-4H, A-9, A-12 và Gauze 1 đã chọn môi trường A-4 thích hợp nhất cho chủng TC 5-4 [5]. Từ đó nghiên cứu ảnh hưởng nguồn cacbon (bảng 2) và nitơ (bảng 3) lên khả năng sinh tổng hợp kháng sinh của chủng này.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên khả năng tổng hợp chất kháng sinh của chủng TC 5-4 (vi sinh vật kiểm định: *B. subtilis* 6633)

Nguồn nitơ	%	pH sau lên men	Sinh khối (mg/ml)	Hoạt tính kháng sinh (D-d,mm)	
				Dịch lọc	Sinh khối
Bột đậu tương	1	7,2	10,7	13	18
Bột đậu tương	2	7,6	9,85	8	15
Cao ngô	1	8,3	8,04	7	9
Cao nấm men	1	8,1	12,04	10	15
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	6,5	7,6	12	15
NH_4Cl	0,2	6,9	6,8	8	10
NH_4NO_3	0,2	6,5	4,5	0	8

Qua các số liệu trình ở bảng 2 cho thấy nguồn cacbon tốt nhất để chủng TC 5-4 cho hoạt tính kháng sinh nhất trong môi trường lên men dịch thể A-4 là glucoza 1,5%. Nguồn nitơ thích hợp nhất (theo bảng 3) là bột đậu tương 1%.

Từ kết quả nghiên cứu trên đã tiến hành tối ưu hoá môi trường lên men theo phương pháp Box-Willson. Thí nghiệm lựa chọn môi trường tối ưu được tiến hành theo phương pháp lên dốc với glucoza và giữ nồng độ bột đậu ở mức 10g/l. Kết quả đã lựa chọn được môi trường tối ưu lên men kháng sinh của chủng TC 5-4 như sau (g/l): Glucoza - 22; bột đậu tương - 10; NaCl - 5; CaCO_3 - 1; và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ - 2.



Hình 1. Động thái quá trình lên men kháng sinh chủng TC 5-4 trong nồi lên men 80lit

- Nhiệt độ lên men 30°C, pH môi trường lên men ban đầu 7 là thích hợp nhất cho khả năng tổng hợp chất kháng sinh của chủng TC 5-4.
- Động thái quá trình lên men sinh tổng hợp chất kháng sinh của chủng TC 5-4 trong nồi lên men 80 lit được trình bày ở hình 1.

Lượng sinh khối tích lũy lớn nhất ở 120 giờ lên men (14,7g/l) và đồng thời cũng là giờ mà lượng chất kháng sinh tích lũy trong sinh khối xạ khuẩn cao nhất (1020 đv/ml).

3. Tính chất hoá lý của chất kháng sinh TC 5-4

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH dịch chiết lên hoạt tính kháng khuẩn của chất kháng sinh TC 5-4 cho thấy pH 3; 9 và 10 không ảnh hưởng đến quá trình tách chiết chất kháng sinh này. Chất kháng sinh này tương đối bền với nhiệt. Nếu giữ chất kháng sinh này ở nhiệt độ dưới 60°C trong 1 giờ hoạt tính kháng sinh hầu như không giảm.

Chất kháng sinh chống nấm của chủng xạ khuẩn TC 5-4 tích lũy phần lớn trong sinh khối (trên 90%). Dung môi tốt nhất để tách chiết chất kháng sinh của chủng TC 5-4 là metanol, ngoài ra cũng có thể dùng izo-propanol và etanol. Tuy nhiên, chất kháng sinh TC 5-4 trong dịch nuôi cấy hấp phụ tốt trên than hoạt tính và có thể dùng axeton để giải hấp phụ ở pH 10.

- Nồng độ ức chế tối thiểu của chất kháng sinh TC 5-4 hoà tan trong cồn đối với *F. oxysporum* là 6,4 mcg/ ml, còn hoà trong nước - 1,5 mcg/ ml.
- Giá trị Rf của chất kháng sinh chạy trong hệ dung môi n-butanol bão hoà nước là 0,77. Chất kháng sinh TC 5-4 có phổ tử ngoại chỉ có một đỉnh cực đại ở $\lambda = 332$ nm. Như vậy, theo khóa phân loại nhóm chất kháng sinh chống nấm của J.M.T. Hamilton-Miller thì chất kháng sinh này không thuộc nhóm polien, mà thuộc nhóm aminoglucozit.

4. Khả năng ứng dụng chất kháng sinh TC 5-4

- Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất kháng sinh TC 5-4 tới khả năng nảy mầm của hạt: thóc, cải thìa, cải củ, dưa chuột và đậu cô ve thì với lượng 50% dịch nuôi ức chế nhẹ khả năng nảy mầm của hạt, nhưng với lượng thấp hơn không những không ức chế mà còn kích thích khả năng nảy mầm của chúng và không ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của cây.
- Chế phẩm kháng sinh TC 5-4 không những có hoạt tính tốt chống nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ mà qua thử nghiệm tại Bệnh viện Da liễu Hà Nội cho thấy chất kháng sinh này còn có khả năng chống một số loài *Tricophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*... nấm gây bệnh ngoài da, vẩy rồng, nấm tóc; *Candida albicans*, *C. tropicalis*... gây bệnh niêm mạc miệng, âm đạo... (lấy từ bệnh phẩm). Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Khả năng ức chế nấm gây bệnh ngoài da của chất kháng sinh TC 5-4 (đường kính vòng vô khuẩn, D-d,mm)

Loại nấm	TC 5-4 (5% trong etanol)
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	44
<i>Tricophyton rubrum</i>	25
<i>Candida albicans</i>	19
<i>Candida tropicalis</i>	23
Dung môi	0

Nghiên cứu xác định nồng độ ức chế tối thiểu của chất kháng sinh TC 5-4 đối với nấm theo phương pháp pha loãng liên tục trong môi trường thạch đã cấy nấm gây bệnh, kết quả như sau: 1) *Tricophyton mentagrophytes*-1%; 2) *Tricophyton rubrum*- 0,2%; 3) *Candida albicans*- 0,2%; và 4) *Candida tropicalis* - 0,1%.

VI. KẾT LUẬN

- Đã nghiên cứu các đặc điểm sinh học và đặc điểm phân loại chủng xạ khuẩn TC 5-4; chủng này thuộc loài *Streptomyces hygroscopicus* Waksman và Henrici, 1948.
- Đã nghiên cứu tối ưu hoá môi trường và điều kiện lên men sinh tổng hợp kháng sinh của chủng TC 5-4.
- Chất kháng sinh TC 5-4 ở nồng độ cao có ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt và sinh trưởng phát triển của cây; nhưng ở nồng độ thấp (0,001mg/ ml) lại kích thích cả khả năng nảy mầm của hạt và sinh trưởng của cây. Có thể sử dụng chất kháng sinh TC 5-4 phòng chống bệnh thối cổ rễ do nấm *F. oxysporum* gây ra đối với thực vật; chống một số nấm gây bệnh da và niêm mạc ở người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, Williams Wilkins, 1989.*
2. *Betina V., 1975.*
Methods in Enzymology, VXLIII: 100-123.
3. *Bùi Thị Việt Hà, Lê Gia Hy, Kiều Hữu Ảnh, 1998.*
Tạp chí Khoa học và Công nghệ, tập XXXVI, No 6B, 155-159.
4. *Gusterov G. K., 1970.*
Praktikum po Microbiologia. Izd. Nauka i Izkustvo, Sofia.
5. *Lê Gia Hy, Phạm Kim Dung, Bùi Việt Hà, 1977.*
Tạp chí Sinh học, 19(2): 21-27.

6. Nonomura H. J., 1974.
Ferment. Technol., 52(2) : 78-92.
7. Shirling E.B. and D. Gottlieb, 1966.
Intern. J., Syst. Bacteriol., 16(3) : 313-340.
8. Shirling E. B. and D. Gottlieb, 1966.
Intern. J. Syst. Bacteriol., 18 (2) : 62-189.
9. Shirling E. B. and D. Gottlieb, 1966.
Intern. J. Syst. Bacteriol., 22 (4) : 265-391.

THE ANTIFUNGAL ANTIBIOTICS OF STREPTOMYCETE STRAIN TC 5-4 ISOLATED IN VIETNAM

Le Gia Hy, Pham Kim Dung, Bui Thi Viet Ha
Nguyen Xuan Qui, Pham Van Ty, Phan Anh Toan

SUMMARY

The obtained results of study on cultural, morphological and physio-biochemical properties of Streptomyces strain TC 5-4 were shown that this strain is belong to *Streptomyces hygroscopicus* Waksman and Henrici, similar to strain ISP 5578. The optimal antibiotic fermentation media and conditions such as the physical and chemical properties of antibiotic of this strain were studied. Strain TC 5-4 antibiotic is non-toxic to plant and can be used to protest against *Fusarium oxysporum* causing root blight and *Tricophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Candida albicans* and *C. tropicalis* causing venereal diseases.

1.P.3

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ KHẢ NĂNG PHÂN HUỖ PHENANTHREN CỦA HAI CHỦNG VI KHUẨN SỬ DỤNG CACBUAHYDRO THƠM ĐA NHÂN PHÂN LẬP TỪ CẶN THẢI XĂNG DẦU

Nguyễn Thanh Phương, Lại Thanh Tùng, Đặng Thị Cẩm Hà
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Các hợp chất cacbuahydro thơm đa nhân (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon - PAH) là các chất có từ hai nhân benzen trở lên trong cấu trúc phân tử. Nhiều chất trong nhóm này có đặc tính độc hại, có khả năng gây ung thư và đột biến đối với động vật cũng như con người [11,14]. Chúng được thải vào môi trường với lượng lớn từ các quá trình đốt cháy nhiên liệu và sản xuất công nghiệp, đặc biệt là công nghiệp hoá dầu [15].

Trong tự nhiên có nhiều nhóm vi sinh vật có khả năng sử dụng và chuyển hoá cacbuahydro thơm đa nhân và đây là con đường chủ yếu để loại bỏ cacbuahydro thơm đa nhân trong các môi trường [1,11]. Chính vì vậy, công nghệ phân huỷ sinh học (bioremediation) dựa trên nguyên tắc "nuôi" vi sinh vật có sẵn trong tự nhiên để xử lý ô nhiễm hữu cơ nói chung và cacbuahydro thơm đa nhân nói riêng đang được quan tâm và có hiệu quả làm sạch môi trường cao ở nhiều nước trên thế giới.

Ở Việt Nam, công nghệ phân huỷ sinh học đã bắt đầu được nghiên cứu và áp dụng trong những năm gần đây và cho thấy những kết quả ban đầu đầy triển vọng, đặc biệt là trong việc xử lý ô nhiễm dầu và các sản phẩm của dầu [7]. Để có thể áp dụng hiệu quả công nghệ này, các nghiên cứu cơ bản về các tập đoàn vi sinh vật tham gia vào quá trình phân huỷ sinh học là hết sức cần thiết [1,3].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đối với sự phát triển và khả năng phân huỷ phenanthren của hai chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng cacbuahydro thơm đa nhân phân lập từ cặn đáy của các bể chứa xăng dầu của kho K130 Quảng Ninh.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Hoá chất

Các hoá chất sử dụng trong nghiên cứu này là các hợp chất cacbuahydro thơm đa nhân như: anthracen, flouranthen, phenanthren và đều là các hoá chất chuẩn của hãng Sigma.

2. Đặc điểm nơi lấy mẫu

Nơi lấy mẫu là bể chứa cặn thải xăng dầu của xí nghiệp xăng dầu Quảng Ninh. Cặn thải được phơi ngoài trời trong một thời gian dài trước khi được xử lý bằng công nghệ phân huỷ sinh học (03/1999). Cặn thải chứa bùn, cát và gần 15% dầu đặc biệt là cặn dầu sánh, có màu nâu xám và quánh.

3. Các môi trường nuôi cấy

- + Môi trường khoáng cơ sở - BH (Brussnel- Haas medium) [2].
- + Môi trường BH thanh: môi trường BH được bổ sung 1,5% thạch (Difco).
- + Môi trường dinh dưỡng, với thành phần: 5,0g pepton; 3,0g cao thịt; 1,0g gluco; 5,0g NaCl; 18-20g thạch, pH môi trường: 6,8 – 7,2.

- *Phương pháp phân lập, làm sạch vi khuẩn sử dụng cacbuahydro thơm đa nhân và nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường:*

Vi khuẩn sử dụng cacbuahydro thơm đa nhân được phân lập và làm sạch theo phương pháp đã được mô tả bởi Kastner và cộng sự [8].

Vi sinh vật được nuôi lắc trên môi trường BH bổ sung phenanthren như nguồn cacbon và năng lượng duy nhất với giá trị pH, nồng độ NaCl và nhiệt độ khác nhau ở tốc độ 200 vòng/phút trong 7-10 ngày.

- *Khả năng phân huỷ phenanthren*

Vi sinh vật được nuôi trên môi trường BH bổ sung phenanthren với nồng độ 50 mg/L như nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Vi sinh vật được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và lắc với tốc độ 200 vòng/phút.

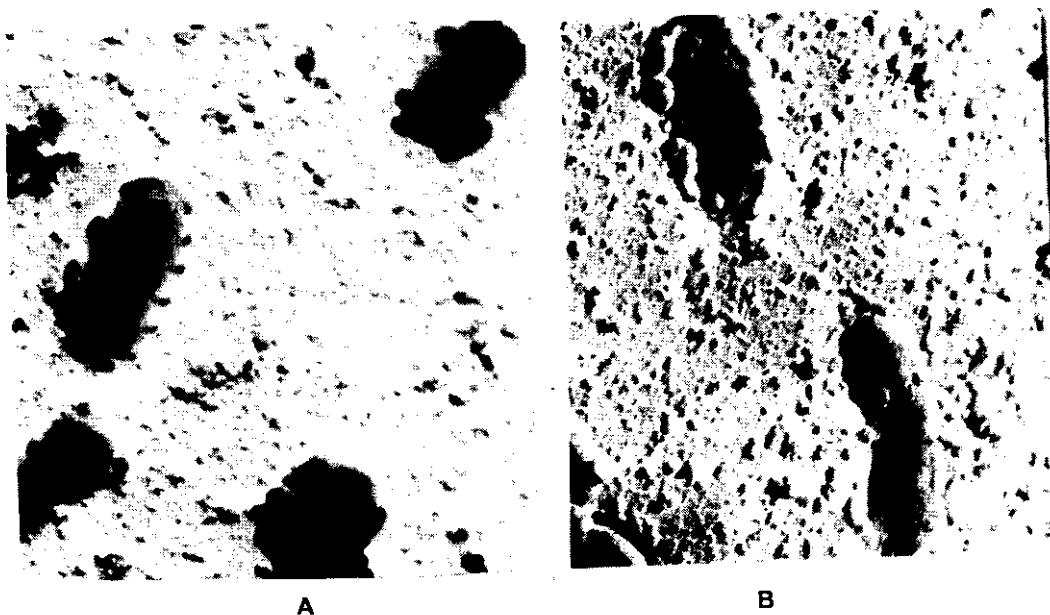
Sự thay đổi của phenanthren trong quá trình nuôi cấy được xác định bằng phương pháp sắc ký khí (GC) với sự giúp đỡ của Phòng phân tích- Viện hoá học hợp chất thiên nhiên.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ cặn đáy của bồn chứa xăng dầu tại kho K130 Quảng Ninh, chúng tôi đã phân lập được 7 chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng cacbuahydro thơm đa nhân. Trong số đó hai chủng vi khuẩn được ký hiệu là A6 và B4 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo bởi hai chủng này có khả năng sử dụng phenanthren tốt hơn các chủng khác.

1. Hình thái tế bào của hai chủng A6 và B4

Hai chủng vi khuẩn A6 và B4 đều là vi khuẩn Gram âm. ảnh kính hiển vi điện tử cho thấy chủng A6 có dạng que ngắn, có màng nhầy, chiều dài từ 1-2 μm rộng khoảng 0,8-1,0 μm ; trong khi đó chủng B4 có dạng que dài, chiều dài 1,9-2,2 μm và chiều rộng khoảng 0,6-0,75 μm . Cả hai đều không có tiên mao (ảnh 1).



Ảnh 1. Ảnh kính hiển vi điện tử của hai chủng vi khuẩn (X 12000)

A: Chủng A6; B: Chủng B4

2. Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đối với sự phát triển

1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Tất cả các quá trình chuyển hoá sinh học đều bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ. Mặc dù các vi sinh vật phân huỷ cacbohydrat đã được phân lập từ môi trường với nhiệt độ thấp là -1°C đến nhiệt độ cao lên tới 70°C [4], nhưng theo các nghiên cứu thì nhiệt độ tối ưu cho quá trình phân huỷ sinh học dao động trong khoảng $18-30^{\circ}\text{C}$, và đối với các sản phẩm dầu mỏ là khoảng 27°C [13]. Tuy nhiên, theo một số tác giả khác thì cho rằng nhiệt độ này nằm trong khoảng $30-40^{\circ}\text{C}$ [11].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, hai chủng vi khuẩn A6 và B4 phát triển tốt ở nhiệt độ trong khoảng $28-37^{\circ}\text{C}$, không phát triển ở nhiệt độ 4°C cũng như trên 45°C (bảng 1). Kết quả này chứng tỏ hai chủng vi khuẩn A6 và B4 thuộc nhóm vi khuẩn ưa nhiệt trung bình và nhiệt độ tối ưu của chúng nằm trong khoảng $28-37^{\circ}\text{C}$.

2. Ảnh hưởng của pH

Nồng độ ion hydro (H^+) hay pH của môi trường là yếu tố đóng vai trò quan trọng đối với sự phát triển của vi sinh vật. Mỗi nhóm vi sinh vật chỉ phát triển tối ưu trong một khoảng pH nhất định và việc điều chỉnh pH môi trường về khoảng pH tối ưu có tác dụng làm gia tăng rõ rệt tốc độ quá trình phân huỷ sinh học [1,11].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hai chủng vi sinh vật A6 và B4 có khả năng phát triển tốt ở pH nằm trong khoảng 6-10 và tối ưu ở pH 8 với số lượng vi sinh vật đạt 10^7 đối với chủng A6 và 4.46×10^6 đối với chủng B4 sau 7 ngày nuôi cấy (bảng 1). Kết quả này phù hợp với đa số các nghiên cứu cho rằng pH lý tưởng đối với quá trình phân huỷ dầu và các sản phẩm của dầu là trung tính đến hơi kiềm [11]. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy cả hai chủng đều phát triển ở pH 10, số lượng vi khuẩn đạt 8.6×10^5 cfu/ml đối với chủng A6 và $4,6 \times 10^5$ đối với chủng B4. Theo một số tác giả thì quá trình phân huỷ sinh học bị ức chế ở pH > 9,5 [11], trong nghiên cứu này chúng tôi cũng chưa khẳng định được chắc chắn ở pH 10 thì tốc độ phân huỷ phenanthren đạt được ở mức độ nào.

Bảng 1. Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đối với sự phát triển của hai chủng A6 và B4

°C	Khả năng phát triển		pH	Số lượng vi sinh vật (cfu/ml)		NaCl (%)	Số lượng vi sinh vật (cfu/ml)	
	A6	B4		A6	B4		A6	B4
4	-	-	2	0	0	0	$4,6 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
28	+	+	4	0	40	0.5	$2,8 \times 10^7$	$1,06 \times 10^7$
37	++	++	6	$7,6 \times 10^8$	$1,82 \times 10^8$	1.0	$2,3 \times 10^7$	$5,2 \times 10^8$
45	-	-	8	10^7	$4,46 \times 10^8$	5	0	0
55	-	-	10	8.6×10^5	$4,6 \times 10^5$	10	0	0

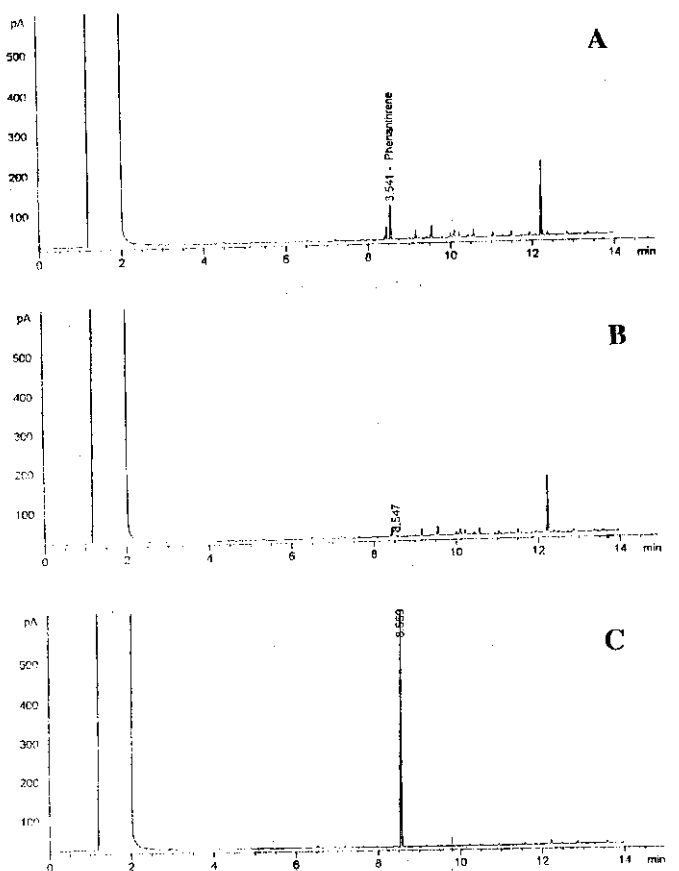
Chú thích: Không phát triển - ; Phát triển bình thường + ; Phát triển tốt ++

3. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl

Trong khi các chủng vi sinh vật ở biển luôn đòi hỏi sự có mặt của ion Na^+ trong môi trường thì trái lại đối với các vi sinh vật ở môi trường nước ngọt sự hiện diện của Na^+ đóng vai trò không phải là quan trọng đối với sự phát triển của chúng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hai chủng vi khuẩn A6 và B4 phát triển tốt với nồng độ NaCl trong khoảng 0-1% mà tốt nhất ở nồng độ NaCl bằng 0. Số lượng vi khuẩn đạt cao nhất sau 7 ngày nuôi cấy: $4,6 \times 10^7$ cfu/ml đối với chủng A6 và $1,8 \times 10^7$ đối với chủng B4 (bảng 1) khi không có NaCl. Hai chủng A6 và B4 hoàn toàn không phát triển ở nồng độ NaCl lớn hơn 5%.

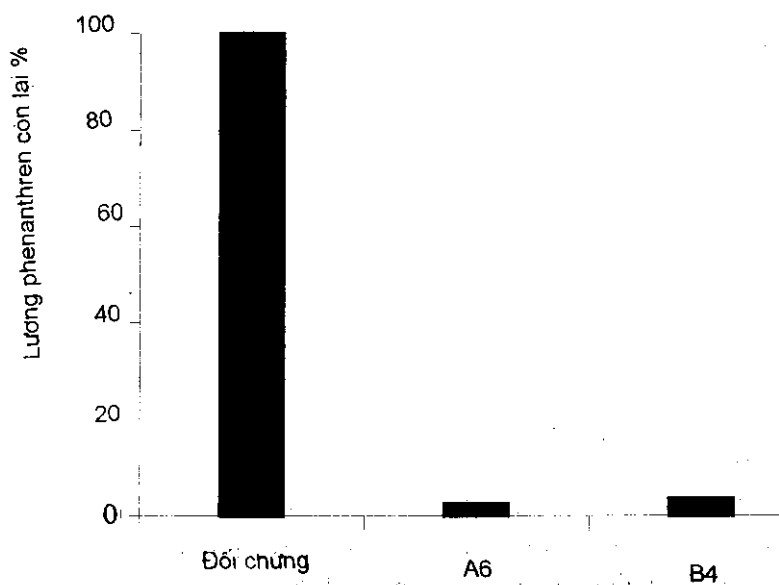
3. Khả năng phân huỷ phenanthren

Kết quả sắc ký cho thấy hai chủng A6 và B4 đều làm giảm rõ rệt hàm lượng phenanthren trong môi trường (hình 1). Sau 30 ngày nuôi cấy, chủng A6 làm giảm 97,7%, chủng B4 làm giảm 96,5% lượng phenanthren bổ sung vào môi trường (hình 2).



Hình 1. Phổ sắc ký phenanthren thu hồi sau 30 ngày nuôi cấy:

A. Chủng A6; B. Chủng B4; C. Đối chứng không có vi sinh vật



Hình 2. Lượng phenanthren còn lại sau 30 ngày

Nếu so sánh khả năng phân huỷ phenanthren của hai chủng vi khuẩn A6 và B4 với một số chủng vi sinh vật khác mà các tác giả khác đã công bố thì hai chủng này thuộc loại có khả năng sử dụng phenanthren không cao. Theo Nguyễn Quang Huy và cộng sự nghiên cứu khả năng phân huỷ phenanthren của 3 chủng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* cho thấy chúng có khả năng phân huỷ phenanthren tương đối mạnh, đặc biệt chủng XCK-II phân huỷ hơn 98% lượng phenanthren bổ sung vào môi trường với nồng độ 50 ppm trong thời gian 7 ngày [12]. Gần đây khi nghiên cứu khả năng phân huỷ cacbua hydro thơm đa nhân và đặc biệt là phenanthren đối với các chủng vi khuẩn phân lập được từ tích tụ đáy Biển Đông cho thấy có một số chủng có khả năng sử dụng phenanthren khá cao (số liệu sẽ được công bố sau). Theo nghiên cứu của Dagher và cộng sự, chủng PL1 phân lập từ đất ô nhiễm có khả năng phân huỷ phenanthren rất mạnh. Sau 8 ngày nuôi cấy, chủng PL1 phân huỷ 100% phenanthren với nồng độ 200 ppm trong môi trường tối thiểu BH [6]. Các nghiên cứu cũng cho thấy rằng quá trình phân huỷ cacbua hydro thơm đa nhân đạt hiệu quả cao hơn nhiều bởi tập đoàn vi sinh vật so với từng chủng đơn. Theo Kastner và cộng sự, trong cùng điều kiện thì tập đoàn vi sinh vật bản địa phân huỷ gần 100% lượng phenanthren bổ sung vào môi trường, trong khi chủng BP9 chỉ phân huỷ được khoảng 31,7% [9]. Tadros và Hughes cũng cho thấy sau 8 ngày nuôi cấy trong môi trường khoáng cơ sở, chủng *Ochrobactetrum sp.* phân huỷ fluoren và naphthalen bổ sung vào môi trường với lượng tương ứng 85% và 77,2%, chủng *Pseudomonas sp.* là 74,7% và 87,4%, trong khi đó nếu sử dụng hỗn hợp cả hai chủng này thì hiệu quả phân huỷ tương ứng là 90,4% và 98,7% [10]. Bell và cộng sự cho biết các vi sinh vật phân lập được từ môi trường ô nhiễm các sản phẩm dầu mỏ và các chất dùng để xử lý gỗ có khả năng sử dụng cacbua hydro thơm thuộc chi *Pseudomonas*, *Xanthomonas* và *Sphingomonas*. Khi sử dụng cacbua hydro (có 2-4 vòng benzen) đánh dấu bởi ^{14}C là nguồn các bon và năng lượng duy nhất để nghiên cứu khả năng phân huỷ bởi vi khuẩn đã chỉ ra rằng trong vòng 11-29 ngày trong điều kiện hiếu khí thì 6-76% lượng cacbua hydro thơm đa nhân đã được khoáng hoá. Ngược lại, chỉ có 0,28% cacbua hydro thơm đa nhân được khoáng hoá trong điều kiện kỵ khí [11].

Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu bước đầu về các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến quá trình phát triển và khả năng sử dụng phenanthren của hai chủng vi sinh vật A6 và B4 chứng minh rằng sự giảm hàm lượng cacbua hydro thơm đa nhân trong đó có phenanthren là do hoạt động phân huỷ của các vi sinh vật khác nhau có sẵn trong cặn thải. Nếu được cung cấp thêm các nguồn dinh dưỡng và duy trì các yếu tố môi trường thích hợp như đã trình bày thì quá trình loại bỏ các chất ô nhiễm sẽ nhanh lên rất nhiều so với quá trình tự làm sạch. Ngoài các thành phần để phân huỷ thì các hợp chất khó phân huỷ như cacbua hydro thơm đa nhân cũng sẽ bị loại bỏ do quá trình phân huỷ sinh học đảm nhận bởi cả tập đoàn vi sinh vật có sẵn trong cặn thải từ các bể xăng dầu chứ không thể chỉ là một vài đơn chủng.

Sự có mặt chủng A6 và B4 và các chủng vi sinh vật khác trong cặn thải xăng dầu và khả năng phân huỷ phenanthren, cũng như các điều kiện tối ưu để cho các vi khuẩn này phát triển sẽ là cơ sở để nghiên cứu công nghệ sinh học hữu hiệu làm sạch dầu ô nhiễm cặn thải tại các kho chứa xăng dầu của Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Ann-Sofie Alard and Alasdair H. Neilson, 1997.*
International Biodeterioration and Biodegradation 39, 253-285
2. *Atlas R.M., 1995.*
Handbook of Media for Environmental Microbiology. CRC Press, Inc. p. 81.
3. *Atlas R.M., 1995.*
International Biodeterioration and Biodegradation 35, 317-327.
4. *Bartha R. and Atlas R.M., 1977.*
Applied and Environmental Microbiology 22: 226-266.
5. *Dang Thị Cam Ha et al, 1998.*
Use of bioremediation to clean-up oil contamination in wastewater. Workshop on waste management and remediation of polluted sites for sustainable development, 11-16 May, 1998, Hanoi, Vietnam
6. *Kastner M., Breuner-Jammali M., Mahro B., 1994.*
Applied Microbiology and Biotechnology 41: 267-273.
7. *Mohamed N., Rharid I. Allayla, Girgis F. Nakhla, Shaikat F., and Tahir H., 1996.*
Journal of Environmental Science and Heath. A31 (7): 1547-1574.
8. *Nguyễn Quang Huy, Lưu Thị Bích Thảo và Đặng Thị Cẩm Hà.*
Khả năng phân huỷ phenanthren của ba chủng nấm sợi phân lập tại Việt Nam. In press.
9. *Song H.G., Wang X.P. and Bartha R., 1990.*
Applied and Environmental Microbiology 56: 652-656.
10. *Sutherland J.B., Rafii F., Khan A.A., and Cerniglia C.E., 1995.*
Mechanism of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In Microbial transformation and degradation of toxic chemicals. Edited by L.Y. Young and C.E. Cerniglia. Wiley-Liss. New York. pp. 269-306.
11. *Swoboda N. G. Colberg., 1995.*
Chemical contamination of the environment: Source, types and Fate of synthetic organic chemical. In Microbial transformation and degradation of toxic chemicals. Edited by L.Y. Young and C.E. Cerniglia. Wiley-Liss, New York. pp. 27-74.
12. *Dagher F., Ericb D., Patricia L., Jean-Guy B., and Richard V., 1997.*
Canadian Journal of Microbiology 43: 368-377.
13. *Kastner M., Breuner-Jammali M., Mahro B., 1998.*
Applied Environmetal and Microbiology 64: 359-362.

14. Mahasin G. Tadros and Joseph B. Hughes., 1997.
Applied Biochemistry and Biotechnology 63-65: 865-870.
15. Bell G., Fredrickson H., Ringleberg D., and Hwang H., 1997.
Abstracts of ASM 97th, Florida, May 4-8, p: 489.

**SOME BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND PHENANTHRENE
DEGRADING CAPACITY OF TWO BACTERIAL STRAINS ISOLATED
FROM PETROLEUM SLUDGES**

Nguyen Thanh Phuong, Lai Thanh Tung, Dang Thi Cam Ha

SUMMARY

Two bacterial strains designed as A6 and B4 that were capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbon, were isolated from petroleum sludges, in Quang Ninh Petroleum Company. Both A6 and B4 are gram negative bacteria and have sizes of 1.0-2.0 x 0.8-1.0 μm and 1.9-2.2 x 0.6-0.75 μm , respectively. Two strains grew well at temperature of 28-37°C, NaCl concentration of 0 - 1.0%, and pH in the range of 6-10, and optimum at 37°C, pH 8 and NaCl concentration of 0%. In 30 day shaking culture, 97.7% and 96.5% of added phenanthrene were degraded by strains A6 and B4, respectively.

I.P.4

NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP XENLULOZA CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT ĐỂ XỬ LÝ RÁC

*Đặng Minh Hằng*VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ THỰC PHẨM-
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

I. MỞ ĐẦU

Sự ô nhiễm môi trường dẫn đến mất cân bằng sinh thái, phá huỷ môi trường sống tự nhiên, đe dọa sức khỏe, cuộc sống của con người cũng như các loài động thực vật [1]. Rác thải là một nguồn ô nhiễm chính. Thành phần hữu cơ trong rác chủ yếu là xenluloza. Trong bài này chúng tôi nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp enzym xenluloza của một số chủng nấm sợi phân lập được nhằm ứng dụng cho quá trình xử lý rác hữu cơ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

- **Vi sinh vật:** Các chủng nấm sợi có khả năng sinh tổng hợp xenluloza cao được phân lập từ các đồng rác ủ.
- **Môi trường:** [2]
 - **Môi trường 1:** Môi trường Hutchinson-Clayton dùng để phân lập nấm phân giải xenluloza
 - **Môi trường 2:** Để giữ giống nấm sử dụng môi trường Czapek
 - **Môi trường 3:** Để xác định khả năng sinh tổng hợp xenluloza của nấm sợi, đã tiến hành nuôi cấy trên môi trường như sau:

Cám trấu : 10g; Dịch khoáng: 10ml

Thành phần dịch khoáng [Toyama-ogawa.1978] gồm có: (g/l)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 10; KH_2PO_4 : 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.5

Trộn đều dịch khoáng với cơ chất, khử trùng ở 1at trong 30 phút.

2. Phương pháp [3],[4],[5]

- **Phân lập chủng vi sinh vật:** từ các mẫu rác được pha loãng ở các nồng độ khác nhau cấy dàn đều trên các hộp Petri có chứa môi trường 1 vô trùng, trên bề mặt thạch đặt một khoanh giấy lọc vô trùng. Nuôi ở tủ ấm 30°C, đợi mọc khuẩn lạc, tách riêng và cấy giữ giống trên ống thạch nghiêng.

- Tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng phân giải xenluloza cao: Các chủng nấm thu được đem cấy vào bình tam giác có chứa môi trường 3. Sau 3 ngày lấy ra chiết enzym và thử hoạt lực bằng phương pháp khuếch tán trên thạch với cơ chất là CMC, hiện màu bằng đồ Congo. Chọn chủng có vòng phân giải lớn nhất.
- Xác định đường khử theo phương pháp Nelson- Somogyi (Hargendal, 1978) với cơ chất là CMC

Tổng số tế bào vi sinh vật trên 1g mẫu nuôi được xác định bằng cách pha loãng đến nồng độ thích hợp, cấy dàn đều trên hộp Petri chứa môi trường 2, đếm số khuẩn lạc mọc lên.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tuyển chọn chủng nấm sợi có khả năng phân giải xenluloza cao

Từ các chủng phân lập đã chọn được 2 chủng có khả năng phân giải cao nhất là N1 và N2

2. Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển và tổng hợp xenlulaza của nấm

1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sự phát triển và hoạt tính CMC-aza của các chủng nấm sợi N1 và N2

Thời gian (ngày)	Chủng vi sinh vật	Đường khử (glucoza, mg/ml)	Hoạt tính CMC-aza (D-d, mm)	Tổng số tế bào/1g
2	N1	0,079	9	$13,21.10^{12}$
	N2	0,061	7	$3,96.10^{13}$
3	N1	0,149	17	$16,1.10^{12}$
	N2	0,133	15	$6,2.10^{13}$
4	N1	0,200	23	$17,11.10^{12}$
	N2	0,184	21	$9,07.10^{13}$
5	N1	0,237	27	$18,9.10^{12}$
	N2	0,215	24	$12,2.10^{13}$
6	N1	0,242	27	$20,2.10^{12}$
	N2	0,228	26	$14,92.10^{13}$
7	N1	0,23	26	$19,4.10^{12}$
	N2	0,219	25	16.10^{13}
8	N1	0,212	24	$17,3.10^{12}$
	N2	0,213	24	$15,4.10^{13}$
9	N1	0,211	24	$17,2.10^{12}$
	N2	0,22	25	$14,5.10^{13}$
10	N1	0,21	23	$16,1.10^{12}$
	N2	0,17	21	$14,2.10^{13}$

Qua bảng 1 cho thấy khả năng phát triển và tổng hợp enzym của N1 và N2 đều đạt cao nhất là vào ngày nuôi thứ 6. Khi đó N1 có hoạt tính CMC-aza = 27mm, tổng số tế bào là $20,2 \cdot 10^{12}$, hoạt tính đường hoá CMC là 0,242 mg/ml. Còn N2 có hoạt tính CMC-aza là 26mm, hoạt tính đường hóa CMC là 0,228 mg/ml, tổng số tế bào/g là $14,92 \cdot 10^{13}$. Khoảng thời gian thích hợp để N1 phát triển từ 5- 7 ngày và N2 là từ 5- 9 ngày.

2. Ảnh hưởng của pH ban đầu

pH là một trong các yếu tố có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển và tổng hợp enzym của nấm sợi. Để xét ảnh hưởng của yếu tố này, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy N1 và N2 trên môi trường 3 được điều chỉnh bằng HCl và NaOH để có được các mức pH khác nhau từ 3 - 8.

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu tới sự phát triển và tổng hợp enzym của các chủng nấm sợi N1 và N2

pH	Chủng vi sinh vật	Tổng tế bào/g mẫu	Đường khử (glucoza,mg/ml)	Hoạt tính CMC-aza (D-d,mm)
3	N1	$12,2 \cdot 10^{12}$	0,195	22
	N2	$9,5 \cdot 10^{13}$	0,180	21
3,5	N1	$14,4 \cdot 10^{12}$	0,190	22
	N2	$13,2 \cdot 10^{13}$	0,202	23
4	N1	$20 \cdot 10^{12}$	0,22	25
	N2	$12,1 \cdot 10^{13}$	0,21	23
4,5	N1	$23,1 \cdot 10^{12}$	0,237	27
	N2	$16,2 \cdot 10^{13}$	0,216	25
5	N1	$23,5 \cdot 10^{12}$	0,228	26
	N2	$16,5 \cdot 10^{13}$	0,21	25
5,5	N1	$21 \cdot 10^{12}$	0,20	24
	N2	$16,80 \cdot 10^{13}$	0,23	26
6	N1	$21,1 \cdot 10^{12}$	0,22	25
	N2	$16,5 \cdot 10^{13}$	0,216	25
6,5	N1	$15,3 \cdot 10^{12}$	0,20	23
	N2	$16,1 \cdot 10^{13}$	0,21	24
7	N1	$15,02 \cdot 10^{12}$	0,19	22
	N2	$13,5 \cdot 10^{13}$	0,19	23
7,5	N1	$9,1 \cdot 10^{12}$	0,17	20
	N2	$13,9 \cdot 10^{12}$	0,2	23
8	N1	$8,2 \cdot 10^{12}$	0,18	20
	N2	$11,2 \cdot 10^{12}$	0,19	22

Qua bảng 2 cho thấy pH ban đầu thích hợp nhất cho N1 là 4,5 và cho N2 là 5,5.

3. Ảnh hưởng của nhiệt độ (Xem bảng 3)

Kết quả cho thấy khả năng phát triển và tổng hợp enzym của cả hai chủng nấm sợi N1 và N2 đều ở khoảng 28- 34°C là thích hợp nhất, có nghĩa hai chủng này thuộc vào nhóm ưa ấm. Nhiệt độ tối ưu cho N2 là ở 31°C, khi đó giá trị CMC-aza là 27 mm, hoạt tính đường hoá CMC là 0,235 mg/ml, tổng số tế bào/g là $20,02.10^{13}$. Đối với N1, các giá trị đạt cao nhất khi được nuôi ở 34°C. Khi đó CMC-aza=28 mm, hoạt tính đường hoá CMC= 0,25 mg/ml và tổng số tế bào/g là $25,2.10^{12}$.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển và hoạt tính xenlulaza của các chủng nấm sợi N1 và N2.

Nhiệt độ (°C)	Chủng vi sinh vật	Đường khử (glucoza, mg/ml)	Hoạt tính CMC-aza (D-d, mm)	Tổng số tế bào/g
25	N1	0,176	20	9.10^{12}
	N2	0,2	22	10.10^{13}
28	N1	0,23	26	$21,8.10^{12}$
	N2	0,22	25	$15,9.10^{13}$
31	N1	0,24	26	$23,1.10^{12}$
	N2	0,238	27	$20,02.10^{13}$
34	N1	0,25	28	$25,2.10^{12}$
	N2	0,217	25	$15,5.10^{13}$
37	N1	0,216	25	$19,3.10^{12}$
	N2	0,18	20	$8,1.10^{13}$
40	N1	0,16	18	$6,2.10^{12}$
	N2	0,12	14	$3,3.10^{13}$

4. Ảnh hưởng của tỉ lệ cám : trấu

Hàm lượng xenluloza ban đầu có ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo sinh khối và enzym của nấm sợi. Nó có vai trò như là một chất cảm ứng để kích thích nấm sinh tổng hợp xenlulaza.

Để nghiên cứu sự ảnh hưởng của hàm lượng xenluloza ban đầu tới sự phát triển của N1 và N2, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy trên môi trường 3 với các tỉ lệ cám : trấu khác nhau.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỉ lệ cám : trấu tới sự phát triển và sinh tổng hợp enzym của các chủng nấm sợi N1 và N2

Tỉ lệ cám : trấu	Chủng vi sinh vật	CMC-aza (D-d), mm	Đường khử glucoza(mg/ml)
2 : 8	N1	16	0,14
	N2	11	0,098
3 : 7	N1	21	0,18
	N2	18	0,157
4 : 6	N1	25	0,223
	N2	25	0,219
5 : 5	N1	28	0,253
	N2	26	0,23
6 : 4	N1	26	0,228
	N2	28	0,249
7 : 3	N1	27	0,237
	N2	28	0,246
8 : 2	N1	23	0,206
	N2	25	0,21

Kết quả ở bảng 4 cho thấy tỉ lệ cám : trấu thích hợp nhất cho N1 là 5 : 5, cho N2 là 6 : 4.

5. Ảnh hưởng của độ ẩm

Nước là một trong những thành phần cơ bản cấu tạo nên cơ thể nấm. Nước cũng tham gia vào các phản ứng và là môi trường diễn ra các phản ứng đó. Trong môi trường nuôi cấy xốp, nước ảnh hưởng tới độ thoáng của cơ chất do đó cũng làm ảnh hưởng tới hoạt động sống của nấm sợi. Để xét yếu tố này chúng tôi đã nuôi cấy nấm ở các tỉ lệ cơ chất : nước khác nhau nhằm tìm ra một tỉ lệ thích hợp nhất cho sự phát triển của N1 và N2.

Bảng 5. Ảnh hưởng của độ ẩm tới khả năng phát triển và sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng nấm sợi N1 và N2

Tỉ lệ dịch (ml) : cám trấu (g)	Chủng vi sinh vật	CMC-aza (D-d, mm)	Đường khử (glucoza, mg/ml)
2 : 8	N1	16	0,15
	N2	18	0,16
3 : 7	N1	19	0,165
	N2	22	0,195
4 : 6	N1	28	0,25
	N2	28	0,245
5 : 5	N1	28	0,25
	N2	28	0,247
6 : 4	N1	28	0,24
	N2	27	0,235
7 : 3	N1	20	0,171
	N2	18	0,162
8 : 2	N1	11	0,096
	N2	7	0,063

Tỉ lệ nước : cám trấu thích hợp nhất cho N1 là 4 : 6 (w~57%), cho N2 là 5 : 5 (w~60%).

6. Khả năng phát triển trên các nguồn xenluloza tự nhiên

Bảng 6. Khả năng phát triển ở các nguồn xenluloza tự nhiên của các chủng nấm sợi N1 và N2.

Nguồn xenluloza	Chủng vi sinh vật	Đường khử (mg/ml)	Hoạt tính CMC-aza (D-d)	Tổng số tế bào/g
Bã mía	N1	0,15	17	$19,2 \cdot 10^9$
	N2	0,122	13	$21,3 \cdot 10^8$
Rơm lúa	N1	0,135	15	$10,9 \cdot 10^9$
	N2	0,12	12	$7,1 \cdot 10^8$
Giấy lọc	N1	0,148	16	$17,8 \cdot 10^9$
	N2	0,098	11	$14,2 \cdot 10^8$
Lõi bắp	N1	0,251	28	$25,92 \cdot 10^{12}$
	N2	0,263	29	$24,8 \cdot 10^{13}$
Xơ dừa	N1	0,127	15	$22,1 \cdot 10^9$
	N2	0,12	12	$22,3 \cdot 10^9$
Trấu	N1	0,075	8	$16,01 \cdot 10^6$
	N2	0,11	12	$11,21 \cdot 10^8$

Nguồn xenluloza tự nhiên tốt nhất cho sự phát triển và sinh tổng hợp enzyme ở cả N1 và N2 là lõi bắp ngô.

IV. KẾT LUẬN

Hai chủng nấm có khả năng phân giải xenluloza cao đã được phân lập. Một số điều kiện nuôi cấy tối ưu cho hai chủng nấm đã được xác định nhằm nâng cao khả năng sinh tổng hợp xenlulaza của chúng:

- Thời gian thích hợp nhất cho sinh trưởng và tổng hợp enzym khi nuôi cấy trên môi trường bán rắn đối với cả hai chủng nấm sợi N1 và N2 là 6 ngày.
- Nhiệt độ thích hợp nhất cho chủng nấm sợi N1 là 34°C, và N2 là 31°C.
- pH ban đầu thích hợp nhất cho chủng nấm sợi N1 là 4,5 và N2 là 5,5.
- Tỷ lệ cám : trấu thích hợp nhất cho chủng nấm sợi N1 là 5 : 5, còn cho N2 là 6:4.
- Tỷ lệ nước : cám trấu thích hợp nhất cho chủng nấm sợi N1 là 4 : 6 (w~57%), cho N2 là 5 : 5 (w~60%)
- Nguồn xenluloza tự nhiên tốt nhất cho sự phát triển và sinh tổng hợp enzym ở cả hai chủng nấm sợi N1 và N2 là lõi bắp ngô.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Cẩm Vân, 1995.
Công nghệ vi sinh và bảo vệ môi trường. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. N.X. Egorov, 1982.
Thực tập vi sinh vật học. Nhà xuất bản Mir- Moscow.
3. Sanjoy Silva, 1995
App. Biochem.&Biotech., Vol.51&52, Complete, Spring, 145-152
4. Swarooba Rani, 1996
Enzyme and microbial technology, Vol.18, No 1, Jan 1996, 1-80
5. Ayda S.- App. 1997.
Biochem.&Biotech., Vol.62, No1, Jan 1997, 71-76

STUDY ON SOME CELLULOLYTIC FUNGIES FOR MUNICIPAL WASTE DECOMPOSTING

Dang Minh Hang

SUMMARY

2 strains of fungi expressing high cellulolytic activities were isolated. Some optimalis incubating parameters were determinated for increase their enzyme activities.

1.P.5**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VÀ SỬ DỤNG CHẾ PHẨM
VI SINH VẬT PHÂN HỦY CHẤT THẢI SINH HOẠT***Nguyễn Mạnh Dũng*

VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xử lý chất thải của cộng đồng trong sinh hoạt hàng ngày là một trong những vấn đề quan trọng trong việc bảo vệ môi trường sống và sức khỏe con người. Trên đà phát triển của xã hội, vấn đề xử lý chất thải đang đặt ra những áp lực ngày càng tăng, không chỉ ở những nơi có điều kiện sống khó khăn như các vùng đảo xa đất liền, thiếu đất, thiếu nước ngọt mà ngay cả ở những khu dân cư đông đúc, khu công nghiệp và các thành phố lớn. Tìm ra những biện pháp hữu hiệu, tiện lợi và được cộng đồng chấp nhận trong các điều kiện sống cụ thể là một việc làm thiết thực và rất có ý nghĩa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**1. Vật liệu**

Sử dụng tập hợp 1.0 chủng vi sinh vật thuộc các chi *Actinomices*, *Bacillus* có trong Bộ sưu tập giống vi sinh vật của Bộ môn Vi sinh vật, Viện KHKT nông nghiệp Việt Nam. Đây là những chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy chất hữu cơ cao, chịu được những biến động bất lợi của môi trường. Những tổ hợp khác nhau từ các chủng vi sinh vật đã được lựa chọn dùng để sản xuất các chế phẩm DW 03, DW 04 và DW 06 nhằm phục vụ cho những yêu cầu khác nhau của quá trình phân hủy.

2. Phương pháp

Đối chứng: ủ chất thải hữu cơ trong điều kiện yếm khí thông thường (công thức A).

Thực nghiệm: ủ chất thải hữu cơ trong điều kiện yếm khí có bổ sung chế phẩm DW 03, DW 04 và DW 06 (công thức B).

Mẫu phân tích được lấy 10 ngày một lần, xác định các chỉ tiêu như độ pH, mật độ vi sinh vật tổng số, hàm lượng chất hữu cơ bị phân hủy theo các phương pháp thông dụng đã được áp dụng trong các phòng thí nghiệm.

III. KẾT QUẢ

1. Sự phát triển của khu hệ vi sinh vật

Kết quả nghiên cứu về sự phát triển của khu hệ vi sinh vật trong quá trình phân hủy được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Mật độ vi sinh vật trong quá trình phân hủy chất hữu cơ (CFU/g)

Thời gian phân hủy (ngày)	1	10	20	30	40	50
Công thức						
Đối chứng (công thức A)	$1,5 \cdot 10^2$	$4,7 \cdot 10^2$	$6,9 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^6$
Bổ xung DW 03, DW 04 và DW 06 (công thức B)	$3,7 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^8$	$6,8 \cdot 10^8$

Rõ ràng là khi có bổ sung thêm chế phẩm, khu hệ vi sinh vật trong quá trình phân hủy đã phát triển nhanh hơn đối chứng không bổ sung thêm chế phẩm rất nhiều lần. Sau 20 ngày ở công thức có bổ sung thêm chế phẩm mật độ vi sinh vật đã đạt $8,6 \cdot 10^6$ CFU/g. Trong khi ở đối chứng mật độ này là $6,9 \cdot 10^3$ CFU/g. Điều này chứng tỏ nguồn vi sinh vật bổ sung vào đã thích ứng tốt với điều kiện phân hủy của môi trường. Đây sẽ là động lực to lớn của quá trình phân hủy chất thải diễn ra sau này.

2. Sự biến đổi các chất hữu cơ trong quá trình phân hủy

Kết quả nghiên cứu về sự biến đổi của chất hữu cơ trong quá trình phân hủy được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Nồng độ chất hữu cơ tan ở các địa điểm phân hủy khác nhau

Thời gian phân hủy (ngày)	1			20			40			50		
Mẫu												
Công thức	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
A	0,05	0,07	6,0	3,0	4,2	5,8	5,3	9,2	4,1	10,0	14,0	2,3
B	0,05	0,07	6,0	3,8	5,3	5,7	6,5	11,0	3,9	13,5	17,0	1,8

I: Nồng độ chất hữu cơ tan ở điểm cách bề mặt 1,3 chiều cao mẫu (g/l).

II: Nồng độ chất hữu cơ tan ở điểm cách bề mặt 1,3 chiều cao mẫu (g/l).

III: Chiều cao lớp cặn (cm)

Kết quả bảng 2 cho thấy trong khoảng 20 ngày đầu, nồng độ chất hữu cơ tan trong nước thấp và không có sự khác nhau nhiều giữa các công thức. Có thể trong khoảng thời gian này quần thể vi sinh vật phát triển chưa mạnh ($6,9 \cdot 10^3$ tb/g trong đối chứng

và $8,6.10^6$ tb/g khi có bổ xung chế phẩm) nên sự phân hủy các chất hữu cơ chưa cao. Sau 50 ngày ủ yếm khí, đối chứng chỉ có 45% lượng chất hữu cơ bị phân hủy tan trong nước. Trong khi đó nếu bổ xung thêm chế phẩm DW 03, DW 04 và DW 06 thì lượng chất hữu cơ bị phân hủy đã lên đến 76%. Rõ ràng việc bổ xung thêm các chế phẩm vi sinh vật đã làm cho quá trình phân hủy chất thải hữu cơ diễn ra nhanh hơn, triệt để hơn.

3. Kết quả thử nghiệm chế phẩm DW 03, DW 04 và DW 06

Theo yêu cầu của Bộ quốc phòng, trước khi triển khai áp dụng chế phẩm phân hủy chất thải tại quần đảo Trường Sa, một thử nghiệm đã được tiến hành ở căn cứ của Bộ tư lệnh Hải quân vùng 4: (Cam Ranh, Khánh Hòa) từ tháng 10/1996. Các chỉ tiêu theo dõi của quá trình thử nghiệm được cán bộ của Viện Vệ sinh, phòng dịch quân đội tiến hành độc lập và trực tiếp ngay tại hiện trường. Kết quả thử nghiệm được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích nước thải trong thử nghiệm tại Cam Ranh

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Đối chứng (Không xử lý)	Xử lý bằng DW 03, DW 04 và DW 06
1	Hàm lượng N	mg/l	36,75	27,84
2	NO_3^-	mg/l	14,92	11,42
3	NO_2^-	mg/l	< 0,01	< 0,01
4	NH_4^+	mg/l	35,67	20,15
5	P_2O_5	mg/l	15,14	13,61
6	H_2S	mg/l	16,10	8,43
7	COD	mg/l	416	274
8	BOD_5 (20°C)	mg/l	58,20	42,60
9	VSV hiếu khí	tb/ml	2,4.10 ⁴	1,8.10 ⁶
10	VSV kỵ khí	tb/ml	0,5.10 ⁵	2,1.10 ⁷
11	<i>Feraciform</i>	tb/ml	2063	1175
12	VSV gây bệnh	tb/ml	Không có	Không có

Kết quả phân tích cho thấy xử lý DW 03, DW 04 và DW 06 đã cải thiện được chất lượng nước thải. So với các chỉ tiêu về nước thải của quốc gia (TCVN 5945-95) thì nước thải sau khi đã xử lý bằng DW 03, DW 04 và DW 06 có thể chấp nhận được trong sinh

hoạt hàng ngày của cộng đồng. Trên thực tế việc sử dụng chế phẩm họ DW đã đáp ứng được yêu cầu của cuộc sống bộ đội, hạn chế được những tác động xấu đến môi trường vốn đã rất khắc nghiệt của vùng đảo xa. Căn cứ vào kết quả thực nghiệm này, Bộ Quốc phòng đã quyết định áp dụng rộng rãi chế phẩm họ DW cho bộ đội ở tất cả các quần đảo Trường Sa từ năm 1997.

IV. KẾT LUẬN

Việc bổ sung chế phẩm vi sinh vật phân hủy chất thải sinh hoạt DW 03, DW 04 và DW 06 đã thúc đẩy sự phát triển của khu hệ vi sinh vật phân hủy chất thải trong môi trường yếm khí. Nhờ vậy quá trình này đã diễn ra nhanh chóng và triệt để hơn. Sản phẩm của quá trình phân hủy có sử dụng DW 03, DW 04 và DW 06 phù hợp với yêu cầu của TCVN 5945-95 về vệ sinh môi trường. Các chế phẩm họ DW có khả năng áp dụng và cho hiệu quả cao ở những nơi có điều kiện sống khắc nghiệt như quần đảo Trường Sa. Chính vì vậy Bộ Quốc phòng đã chính thức áp dụng các loại chế phẩm này để đảm bảo vệ sinh môi trường cho bộ đội ở những vùng khó khăn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Lê, Hà Duy Ngo, Nguyễn Thị Minh, Đặng Tất Thế, 1993.

Nghiên cứu hiện trạng môi trường vùng Hà Nội. Tạp chí Vệ sinh phòng dịch Tập IV, số 1 (14), tr. 46-48.

2. Nguyễn Đức Mậu, 1996

Dùng nước mặn thay nước ngọt trong sử dụng hố xí bán tự hoại cải tiến. Báo cáo tại hội thảo dùng nước mặn thay nước ngọt trong sử dụng hố xí tự hoại cho Trường Sa. Bộ Quốc phòng 23/8/1996.

3. Hà Duy Ngo, 1994.

Kết quả bước đầu hiện trạng môi trường các đảo thuộc quần đảo Trường Sa. Báo cáo khoa học tại hội nghị khoa học vệ sinh phòng dịch 1994 tại TP. Hồ Chí Minh.

4. Hà Duy Ngo, 1995

Báo cáo tổng kết 3 năm (1993-1995) đề tài nghiên cứu khoa học các vấn đề môi sinh ở quần đảo Trường Sa, tr 79-83.

5. Mabiala J., Philip H., Rambaud A., Drakides C., 1990

Relations entre microfauna, Microflore et parametres abiotiques dans les filtres glories alments par des effluents septiques en conditions experimentales. Tribune de l'eau. Vol. 43, No 545, P. 47-54.

6. Pell M., Nybera A., Ljunggren H., 1990

Microbial numbers and activity during infiltration of septic-tank effluent in a subsurface and filter. Water research vol. 24, No 11, Nov. 1990, P. 134-135.

7. Switzenbaum M.S., 1995

Obstacles in the implementation of anaerobic treatment technology.
Biopresource-technology 53, 3, P.255-262.

8. Activator for anaerobic digestion system. Patent number EP - 349441, 03.01.90.

9. Bacterial activity maintained at maximum level in septic-tank. Patent number
FP - 2492802 30.04.82.

**STUDY ON PRODUCTION AND UTILIZATION MICROBIOLOGICAL
PREPARATIONS OF DECOMPOSING WASTES**

Nguyen Manh Dung

SUMMARY

The results showed that using DW 03, DW 04 and DW 06 preparations the deterioration of waste is stimulated. The time of deterioration is shorter than that of without preparations of DW. There are 76% of waste are deteriorated after 50 of days using preparations of DW. The products of deterioration process meet TCVN 5945-95. The preparations of DW are appropriate to difficulty areas such as Truong Sa archipelago. It was used officially for hygienically aims of soldiers by Ministry of national defense.

1.P.6

NGHIÊN CỨU THU NHẬN CHẾ PHẨM GLUCOAMYLaza (GLA) TỪ NẤM MỐC VÀ NẤM MEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY BỀ MẶT

Lương Đức Phẩm, Nguyễn Thế Trang,
Nguyễn Phương Huệ, Nguyễn Nhật Quang, Nguyễn Văn Hiếu
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Glucoamylaza (α -1,4 glucanglucohydrolaza 3.2.1.3) hay còn gọi γ -amylaza là enzym thủy phân tinh bột tới glucoza. Các chế phẩm enzym này được dùng nhiều trong công nghiệp rượu cồn, bia và sản xuất đường glucoza, xiro glucoza - fructoza từ bột ngô dùng cho chế biến kẹo, nước giải khát và dinh dưỡng cho trẻ em, người già...[2,3,4,6,7]

Glucoamylaza (GLA) có trong cơ thể động vật, thực vật. Nhiều loài vi sinh vật đặc biệt là nấm mốc và nấm men, có khả năng sinh tổng hợp enzym này rất cao [4,6,7]. Mục đích của công trình này là nghiên cứu thu chế phẩm GLA thô bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt nấm mốc *Aspergillus awamori* 99A1 và nấm men *Endomycopsis* sp. 9933 trên môi trường bán rắn- xốp.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng nghiên cứu

- Nấm mốc *Aspergillus awamori*: chọn từ 5 chủng trong bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ Lên men được 1 chủng có khả năng sinh enzym cao nhất kí hiệu 99A1.
- Nấm men *Endomycopsis* được phân lập và tuyển chọn từ bánh men rượu cô truyền của làng Đại Lâm, Tam Đa, Yên Phong, Bắc Ninh, được kí hiệu *Endomycopsis* sp. 9933.

2. Vật liệu

Gồm có cám gạo CR 203, bột ngô và trấu được mua ở chợ phải đảm bảo có chất lượng như: không mốc, có mùi thơm, bột ngô được nghiền nhỏ ở dạng bột mịn, trấu được rửa sạch đem đi phơi khô hoặc sấy khô.

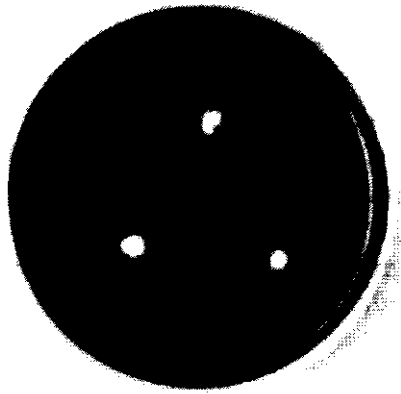
3. Các phương pháp nghiên cứu

Thử sơ bộ hoạt tính amylaza bằng cách đo vòng thủy phân của môi trường thạch- tinh bột. Tối ưu hoá môi trường bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm theo Box-

Willson [1]. Phương pháp nuôi cấy: Nhân giống để có lượng sinh khối lớn (với nấm mốc nhân giống để thu bào tử) [3]. Xác định hoạt lực enzym GLA theo phương pháp của V. Y. Rodzevich, O. P. Korenbiakina [5]. Với chế phẩm từ nấm mốc dùng đệm pH = 4,7; nấm men dùng đệm phot phát pH = 5,6 [8, 9].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các chủng *A. awamori* và *Endomycopsis* sp. được nuôi cấy chấm điểm trên môi trường thạch tinh bột đều có hoạt tính amylaza (biểu hiện ở vòng phân giải tinh bột). Các hình 1 và 2 cho thấy khả năng phân giải tinh bột và hình thái của nấm men *Endomycopsis* sp. 9933.



Hình 1. Vòng phân giải của chủng nấm men *Endomycopsis* sp. 9933

Từ hình 2 ta thấy *Endomycopsis* sp. 9933 có sinh hệ sợi. Thực ra đây là một giống giả nấm men: Có hình thái tế bào giống *Saccharomyces*, nhưng lại mọc khuẩn ty giả khó nhận bằng mắt thường. Với chủng nấm mốc *A. awamori* 99A1 thử cấy chấm điểm trên môi trường Czapek-Dox thấy có vòng phân giải tinh bột với đường kính $D = 19$ hiệu số $D-d = 9$. Cả hai chủng nấm men và nấm mốc được chọn đều tiến hành nghiên cứu trên môi trường bán - xốp với vật liệu là cám gạo, bột ngô và trấu.

Cám gạo và bột ngô trước khi dùng để chuẩn bị môi trường nuôi cấy được xác định độ ẩm và hàm lượng tinh bột. Kết quả là (%):

Bột ngô có hàm lượng tinh bột 61,74 và độ ẩm 12,52

Cám gạo có hàm lượng tinh bột 20,97 và độ ẩm 12,27.



Hình 2. Hệ sợi chủng nấm men *Endomycopsis* sp. 9933

Với chủng *Endomycopsis* sp. 9933 trong quá trình tối ưu hoá thành phần môi trường chúng tôi chọn 3 biến số cám gạo/bột ngô, trấu và bổ sung thêm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kết quả qua tối ưu hoá theo phương pháp Box-Willson kết hợp với thực nghiệm. Môi trường được chọn có thành phần như sau (%): Cám gạo: 80,0, bột ngô: 4,5, trấu: 14,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1,5.

Đối với chủng *A. awamori* 99A1 tiến hành tối ưu hoá thành phần môi trường tương tự như trên, nhưng thay $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bằng NaNO_3 . Kết quả thu được môi trường có thành phần (%): Cám gạo: 75,0, bột ngô: 15,0, trấu: 8,0, NaNO_3 : 2,0.

Qua thực nghiệm chúng tôi thấy nguồn nitơ khoáng thích hợp nhất cho phát triển tạo thành enzym của *A. awamori* 99A1 là NaNO_3 , còn đối *Endomycopsis* sp. 9933 là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nuôi vi sinh vật trên môi trường đặc xộp yếu tố quan trọng bậc nhất ảnh hưởng đến sự phát triển của chúng là độ ẩm môi trường. Trong quá trình chuẩn bị môi trường được xác định độ ẩm của nguyên liệu, dự kiến nước ngưng trong quá trình thanh trùng có thể làm ẩm cơ chất, số lượng nước dùng trong nhân giống với tất cả các hàm ẩm ấy sẽ được dự tính để có thể cho thêm nước vào môi trường để môi trường có những độ ẩm khác nhau từ 45-65%. ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến khả năng sinh GLA của chủng nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Qua kết quả ở bảng 1 chúng ta nhận thấy độ ẩm môi trường thích hợp cho nuôi cấy nấm mốc và giả nấm men là 55%, ở độ ẩm này khi nuôi ở 28-32°C trong khoảng thời gian là 45-48 giờ thấy hoạt lực GLA đạt được là 806 đv/g đối với *a. awamori* 99A1 và 246,84 đv/g đối với *Endomycopsis* sp. 9933. ở độ ẩm này rất thích hợp cho phát triển của các vi sinh vật sinh hệ sợi trên môi trường xộp. Để có được một lượng enzym tối đa được

sinh ra trong quá trình nuôi cấy ngoài các thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy (độ ẩm, nhiệt độ, độ thoáng khí, ...) vấn đề chọn môi trường và các điều kiện nhân giống cũng rất quan trọng. Với số lượng giống thích hợp (tỉ lệ nhân giống) và tuổi sinh lý của giống có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng sản.

Bảng 1. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến khả năng sinh GLA

Độ ẩm môi trường (%)	Enzim tạo thành (GLA-đv/g)	
	<i>A. awamori</i> 99A1	<i>Endomycopsis</i> sp 9933
45	568	174,24
50	685	239,58
55	806	246,84
60	784	174,24
65	713	145,20

Nhân giống *A. awamori* 99A1 trên môi trường tương tự như môi trường nuôi lên men chính và trong khoảng thời gian 45-65 giờ đến khi sinh bào tử đồng đều có thể sấy khô ở 45°C ta được giống bào tử, giữ trong lọ sạch và kín dùng dần. Số lượng bào tử trong 1 gam có thể có không ít hơn $0,7 \cdot 10^9$.

Nhân giống *Endomycopsis* sp. 9933 trên môi trường Hansen-cao nấm men ở 30°C trong 24 giờ trên máy lắc 150 lượt/phút. Qua theo dõi quá trình nhân giống ta thấy *Endomycopsis* sp. 9933 sinh trưởng và phát triển trên môi trường Hansen đạt được ổn định ở 28-30 giờ. Do vậy nhân giống được kết kết thúc ở 24 giờ. Vào thời điểm này dịch giống có OD = 2,2 (trên máy so màu 620 nm) tương đương với $6-8 \cdot 10^6$ tế bào/ml, tỉ lệ nảy chồi khoảng 40-45%, pH = 4,5.

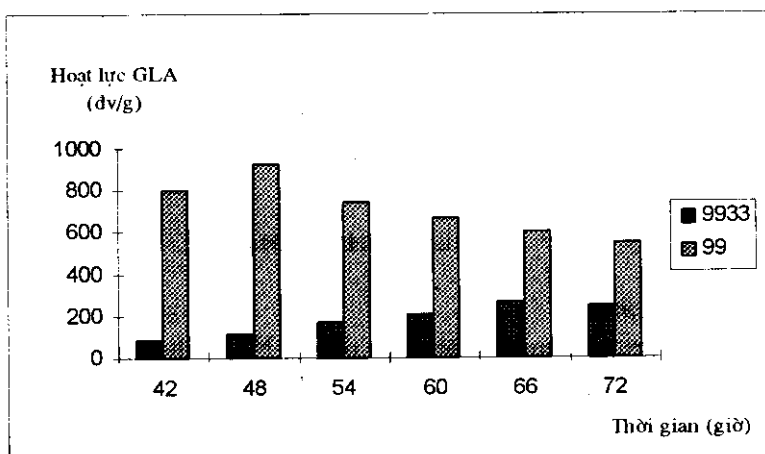
Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ giống tới sinh tổng hợp enzym được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng tỉ lệ nhân giống tới sinh tổng hợp GLA

Tỉ lệ giống (%)	Hoạt lực GLA (đv/g)	
	<i>A. awamori</i> 99A1	<i>Endomycopsis</i> sp 9933
0,5	732	145,20
1,0	782	188,76
1,5	835	261,36
2,0	815	246,84
2,5	784	217,28
3,0	750	215,00

Qua số liệu ở bảng 2 chúng ta thấy tỉ lệ giống tiếp vào môi trường nuôi cấy nấm mốc và giả nấm men để thu enzym có hoạt lực cao nhất là 1,5-2%. Với kết quả này cùng với thành phần môi trường tối ưu sẽ tiến hành nghiên cứu quá trình nuôi cấy thu chế phẩm enzym thô theo phương pháp nghiên cứu bề mặt trên khay.

Môi trường đã thanh trùng được làm nguội tới nhiệt độ 30°C trộn đều với giống theo tỉ lệ 1,5-2%, vun đóng để 3-4 giờ, rồi tãi mỏng trên khay nhôm (có khe hở đáy) hoặc khay lưới thép không rỉ. Chiều dày lớp môi trường khoảng 2-3 cm. Đặt các khay này vào các giá trong buồng nuôi cấy có nhiệt độ 28-30°C và độ ẩm không khí tới 90-95%. Sau 6-7 giờ nhiệt độ ở khay và trong buồng dần dần lên cao, tới 32°C thì cho quạt hút và phun mù bằng nước vô trùng để giữ nhiệt độ không tăng quá cao và giữ độ ẩm môi trường không quá khô. Trường hợp môi trường khô mặt ta có thể phun nước thành những tia rất nhỏ lên môi trường. Sau 18 - 24 giờ môi trường kết bánh sẽ được lật hoặc bẻ nhỏ sao cho chủng cấy mọc đều ở khắp các phần của môi trường. Từ giờ nuôi thứ 42 trở đi cứ sau 6 giờ lấy mẫu phân tích hoạt lực GLA. Kết quả thu được trên hình 3.



Hình 3. Sinh tổng hợp GLA do *A. awamori* 99A1 và *Endomycopsis* sp. 9933 ở một số thời điểm nuôi cấy

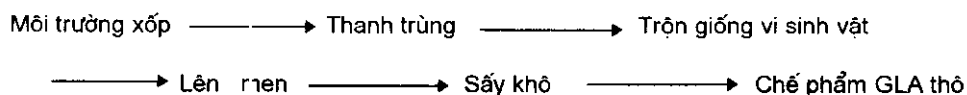
Qua hình 3 ta thấy hoạt lực của *A. awamori* 99A1 cao hơn của *Endomycopsis* sp. 9933, và chủng này đạt được điểm tối đa cho sinh GLA là ở 48 giờ (*A. awamori*) và ở 66 giờ (*Endomycopsis*). Tiến hành chiết tách và nghiên cứu hai enzym GLA này thấy chúng có các đặc điểm hoạt động tối thích như sau:

GLA (*A. awamori* 99A1) pH = 4,6. t^o 55°C

GLA (*Endomycopsis* sp. 9933) pH = 5,0, t^o 50°C

Môi trường nuôi mốc hoặc men kết thúc vào các thời điểm có hoạt lực enzym cao nhất, sấy khô ở 42-45°C có quạt gió thổi tới độ ẩm 11-12%. Chế phẩm thô được nghiền nhỏ đựng vào các bao PE hàn kín hoặc các lọ thủy tinh nút mài. Sản phẩm thu được là chế phẩm GLA thô.

Từ kết quả thu được trên đây hình thành qui trình công nghệ thu nhận chế phẩm GLA thô từ nấm mốc hoặc giả nấm men theo phương pháp nuôi cấy bề mặt (sơ đồ 1).



Sơ đồ 1. Sơ đồ công nghệ thu nhận chế phẩm GLA thô từ *A. awamori* 99A1 và *Endomycopsis* sp. 9933 bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt.

IV. KẾT LUẬN

1. Từ chủng 5 chủng nấm mốc *A. awamori* và chủng nấm men *Endomycopsis* sp. 9933 sơ bộ chọn *A. awamori* 99A1 và *Endomycopsis* sp. 9933 có hoạt tính phân huỷ tinh bột cao.
2. Bằng phương pháp qui hoạch toán học kết hợp với nghiên cứu thực nghiệm đã tối ưu hoá thành phần môi trường nuôi cấy. Xác định được độ ẩm thích hợp là 55%, tỉ lệ giống là 1,5% và nhiệt độ nuôi ở 30°C cho cả *A. awamori* 99A1 và *Endomycopsis* sp. 9933, thời gian 48 giờ GLA của *A. awamori* 99A1 đạt 835 đv/g và 66 giờ của *Endomycopsis* sp. 9933 đạt 261 đv/g chế phẩm thô.
3. Xây dựng qui trình công nghệ thu nhận chế phẩm GLA thô từ *Endomycopsis* sp. 9933 và *A. awamori* 99A1 theo phương pháp nuôi cấy bề mặt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Đình Hoà, 1999.
Tối ưu hoá trong công nghiệp thực phẩm, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Lương Đức Phẩm và Hồ Sương, 1978.
Vi sinh tổng hợp, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội
3. Lương Đức Phẩm, 1998.
Công nghệ vi sinh vật. NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.
4. Đặng Thị Thu, 1989
Nghiên cứu glucoamylaza của *Endomycopsis fibuliger* và một vài ứng dụng.
Luận án PTS khoa học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
5. Đặng Thị Thu và những người khác, 1990
Thí nghiệm Hoá sinh công nghiệp, Trung tâm Công nghệ Sinh học - Bộ môn Hoá sinh, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
6. Lê Ngọc Tú và những người khác, 1982.
Enzim vi sinh vật, tập 1, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội
7. Hattori, Y. 1965.
Studies on production and utilization of *Endomyces* - species, Agric. Biolchem.

THE PRODUCTION OF CRUDE GLUCOAMYLASE (GLA) PREPARATION BY STRAINS FUNGI AND YEAST

*Luong Duc Pham, Nguyen The Trang,
Nguyen Phuong Nhue, Nguyen Nhat Quang, Nguyen Van Hieu*

SUMMARY

*Two glucoamylase producing strains (fungi strain *Aspergillus awamori* 99A1 and yeast strain *Endomycopsis* sp. 9933) was used for production of crude enzyme glucoamylase on solid medium. Optimum media for cultivation of these strain were determined. Their content (% w/w):*

	<i>A. awamori</i> 99A1	<i>Endomycopsis</i> sp. 9933
Bran rice	75	80
Corn starch powder	15	4,5
Seed scale	8,0	14
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	1,5
NaNO ₃	2,0	-

*The moisture content of the borth media was 55%. The strain *Aspergillus awamori* 99A1 was cultivated at 30°C for 48 h. The glucoamylase activity was 835 (Eu/g). Strain *Endomycopsis* sp. 9933 was cultivated at 30°C for 66 h. The glucoamylase activity was 261 Eu/g. The seed (inoculum sife) for borth was 1,5-2%. The glucoamylase production technology of these strains by solid state fermentation was disigned.*

1.P.7

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CHỦNG NẤM MỐC *Aspergillus oryzae* CÓ HOẠT TÍNH PROTEASE CAO PHÂN LẬP Ở HUẾ TRONG CHẾ BIẾN NƯỚC CHẤM LÊN MEN

Ngô Thị Tường Châu

TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC, ĐẠI HỌC HUẾ

I. MỞ ĐẦU

Trong bữa ăn hằng ngày của nhân dân ta, nhu cầu tiêu dùng nước chấm lên men là rất lớn và rất cần thiết. Riêng đối với tỉnh Thừa Thiên-Huế, nơi có một số lượng lớn đồng bào theo đạo Phật thì nước chấm lên men quả là một thực phẩm không thể thiếu được, đồng thời đòi hỏi một nhu cầu lớn hơn.

Đối với người dân ở đây, nước chấm lên men không những là món ăn quen thuộc, góp phần làm tăng nguồn dinh dưỡng đậm cho bữa ăn, có tác dụng như những gia vị gây ngon miệng và kích thích tiêu hóa mà còn là nguồn cung cấp đạm chủ yếu cho những người có thói quen ăn chay.

Thời gian qua, nhiều cơ sở sản xuất nước chấm lên men ở Thừa Thiên-Huế tiến hành điều chế chủ yếu theo phương pháp lên men tự nhiên và phương pháp hóa học nên hiệu quả kinh tế không cao và không đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm cho người tiêu dùng. Để góp phần khắc phục hạn chế đó, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ứng dụng chủng *Asp. cryzae* có hoạt tính protease cao phân lập ở Huế cho chế biến nước chấm lên men. Hy vọng sẽ cải tiến kỹ thuật chế biến, tiến tới công nghiệp hóa, đáp ứng nhu cầu tiêu dùng cao về thực phẩm lên men truyền thống có nguồn gốc từ đạm thực vật ở Thừa Thiên-Huế nói riêng và nước ta nói chung.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

Chủng *Aspergillus oryzae* có hoạt tính protease cao phân lập từ tương Bồ Đề-Huế.

2. Phương pháp

- Chế biến nước chấm lên men theo phương pháp lên men ẩm - trích ly [3].
- Xác định đạm toàn phần theo phương pháp Kjeldahl [3].
- Xác định N - formol [3].
- Xác định N - acid amin bằng phương pháp Pope - Steven [3].

- Xác định N - ammoniac theo phương pháp định lượng bằng cách cất hơi nước [3].
- Xác định hàm lượng acid acetic theo phương pháp xác định độ acid toàn phần [3].
- Xác định hàm lượng NaCl theo phương pháp định lượng trực tiếp (phương pháp Mohr) [1].
- Xác định màu của nước chấm lên men bằng cách so sánh với màu của dung dịch Iodine [1].
- Xác định hiệu suất trích ly (hiệu suất thu hồi), hiệu suất thủy phân và độ thủy phân của phương pháp lên men ươm - trích ly trong quá trình sản xuất nước chấm theo định nghĩa:
 - + Hiệu suất trích ly và tỷ lệ % lượng đạm toàn phần có trong nước chấm trên lượng đạm toàn phần có trong nguyên liệu.
 - + Hiệu suất thủy phân là số lít nước chấm tạo thành từ 1kg nguyên liệu đã lên mốc.
 - + Độ thủy phân protid trong sản phẩm được biểu thị gần đúng bằng tỷ lệ % N - acid amin trên đạm toàn phần của nước chấm [1].
- Phát hiện sự có mặt của aflatoxin bằng phương pháp trên hệ thống máy quang phổ [4].
- Xử lý số liệu bằng phương pháp thống kê sinh học [7].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của lượng nước trộn vào khối mốc đến sự thay đổi hàm lượng N toàn phần, N - acid amin được thủy phân khi lên men ươm - trích ly

Xác định ảnh hưởng của lượng nước trộn vào khối mốc đến sự thay đổi hàm lượng N toàn phần, N - acid amin được thủy phân khi lên men ươm - trích ly. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của lượng nước trộn vào khối mốc đến sự thay đổi hàm lượng N toàn phần, N - acid amin được thủy phân khi lên men ươm - trích ly.

Lượng nước thêm vào	N - acid amin (g/l)	N toàn phần (g/l)
10%	$0,67 \pm 0,03$	$7,00 \pm 0,35$
20%	$3,02 \pm 0,23$	$14,00 \pm 1,05$
30%	$10,68 \pm 0,38$	$19,67 \pm 0,70$
40%	$2,64 \pm 0,35$	$10,50 \pm 1,40$
50%	$2,35 \pm 0,09$	$8,75 \pm 0,35$

Qua kết quả thu được, chúng tôi rút ra một số nhận xét sau :

- Lượng nước trộn vào khối mốc có ảnh hưởng rất lớn đến hàm lượng N toàn phần và N - acid amin được thực hiện khi lên men ươm - trích ly.
- Lượng nước trộn vào khối mốc trước khi lên men thích hợp nhất là 30% so với trọng lượng mốc. Sự tăng hay giảm hàm lượng nước thêm vào đều làm giảm độ đậm trong nước chầm lên men. Nếu lượng nước trộn vào ít hơn, khối lên men bị khô quá, thủy phân kém. Ngược lại, khi lượng nước nhiều hơn, thì khối lên men thường bị chua thối, nồng độ các chất lên men giảm, lượng muối cho vào nhiều ức chế hoạt động enzyme, vì vậy quá trình thủy phân sẽ bị ảnh hưởng xấu rõ rệt.

Các nghiên cứu thực nghiệm cho biết nguyên liệu đã mọc mốc thường có độ ẩm khoảng 28 - 30%, vì thế lượng nước trộn thêm vào 25 - 30% so với nguyên liệu (khi đó độ ẩm khối lên men sẽ vào khoảng 50%) là thích hợp nhất [1]. Trong trường hợp này, kết quả nghiên cứu của chúng tôi không mâu thuẫn với kết quả nghiên cứu trên. Đồng thời kết quả này là tương đương với kết quả nghiên cứu của Quân Văn Thịnh [5] cho rằng lượng nước trộn vào khối mốc trước khi lên men ươm - trích ly của chủng *Asp. oryzae* VNI là 20 - 40% và thích hợp nhất là 30% so với trọng lượng mốc.

2. Sự biến động hàm lượng N - formol, N - amoniac, acid acetic trong thời gian lên men ươm - trích ly

1. Sự biến động hàm lượng N - formol và N - ammoniac

Nghiên cứu sự biến động hàm lượng N - formol và N - ammoniac trong thời gian lên men ươm trích ly. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Sự biến động hàm lượng N - formol và N - ammoniac trong thời gian lên men ươm - trích ly

Thời gian (giờ)	24	48	60	72	96
N - formol (g/l)	9,04 ± 0,34	10,05 ± 0,36	11,40 ± 0,54	13,20 ± 0,14	13,05 ± 0,03
N-ammoniac (g/l)	0,50 ± 0,03	0,70 ± 0,06	1,20 ± 0,03	2,50 ± 0,11	3,95 ± 0,08

Qua kết quả, chúng tôi nhận thấy: Độ hoạt động protease và hàm lượng N - formol tăng dần theo thời gian và đạt cực đại ở 72 giờ sau khi lên men (đạt 13,20 g/l) sau đó hàm lượng N - formol gần như không tăng thêm. Nhưng điều đáng nói là hàm lượng N - ammoniac tăng dần theo thời gian lên men một cách đáng kể. Đây là dạng đậm thối do nước chầm bị phân hủy, gây độc và không có lợi cho cơ thể. Vì thế, không nên kéo dài thời gian lên men ươm quá 72 giờ. Điều này không mâu thuẫn với kết quả nghiên cứu của Lê Văn Nhương [1] và Quân Văn Thịnh [5] khi xác định thời gian lên men ươm thích hợp.

2. Sự biến động hàm lượng acid acetic trong thời gian lên men ươm - trích ly

Xác định sự biến động hàm lượng acid acetic trong thời gian lên men ươm - trích ly. Kết quả biểu diễn ở bảng 3.

Bảng 3. Sự biến động hàm lượng acid acetic trong thời gian lên men ươm - trích ly

Thời gian (giờ)	24	48	60	72	96
Acid acetic (g/l)	$2,87 \pm 0,60$	$4,32 \pm 0,25$	$5,76 \pm 0,10$	$6,00 \pm 0,10$	$7,19 \pm 0,27$

Qua kết quả, chúng tôi nhận thấy: hàm lượng acid acetic tăng dần theo chiều tăng của thời gian lên men ươm. Điều này có thể là do quá trình thủy phân protein của protease nấm mốc tạo thành các acid amin tự do, oác nhóm vi khuẩn phân giải acid amin hiệu khí (hoặc cả nhóm vi khuẩn phân giải acid amin kỵ khí) hoạt động ngày càng mạnh và các acid amin tự do liên tục bị chúng phân hủy thành các hợp chất amin các acid hữu cơ (đặc biệt là acid acetic) và CO_2 . Vì thế, kéo dài thời gian ủ thường làm sản phẩm bị chua.

3. Xác định hàm lượng muối sodium chloride và màu của nước chấm lên men

Xác định hàm lượng muối NaCl và màu của nước chấm lên men. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Hàm lượng muối NaCl và màu của nước chấm lên men

Hàm lượng muối NaCl (g/l)	Màu sắc
$240,50 \pm 5,85$	Có màu tương đương với 20 g iodine trong một lít nước cất

Qua kết quả, chúng tôi nhận thấy rằng: theo tiêu chuẩn của bộ Y tế, với hàm lượng muối ăn NaCl 240,50 g/l, bảo đảm cho nước chấm lên men không bị chua và kéo dài thời gian bảo quản. Nguyên nhân của tác dụng này là do NaCl có tính chất sát trùng nhẹ, hạn chế sự hòa tan O_2 vào môi trường, do vậy kìm hãm hoạt động của vi khuẩn hiếu khí. Riêng ion Cl^- còn có khả năng ức chế enzyme protease của nhóm vi khuẩn phân giải acid amin thành hợp chất amin và acid hữu cơ. Đây chính là phương thức bảo quản thực phẩm nhờ khả năng tạo áp suất thẩm thấu cao để gây co nguyên sinh của muối NaCl.

Với loại nước chấm có lượng đậm toàn phần 20g/l thì có màu tương tự với dung dịch 20g iod trong một lít nước cất. Điều này lại xác định sự phù hợp trong kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi về hàm lượng đậm toàn phần trong nước chấm lên men.

4. Đánh giá một số chỉ tiêu về trạng thái cảm quan của nước chấm lên men

Tiến hành đánh giá một số chỉ tiêu cảm quan của nước chấm lên men, chúng tôi rút ra một số nhận xét được trình bày ở bảng sau:

Bảng 5. Một số chỉ tiêu về trạng thái cảm quan của nước chấm lên men

Độ trong	Không vẩn đục, không tạo váng
Mùi	Mùi thơm ngon, không có mùi khét hoặc các mùi lạ khác.
Vị	Vị ngọt dịu, không thế cổ, không chua đắng, không có các vị lạ khác.

Qua bảng 5, chúng ta nhận thấy: trạng thái cảm quan về sản phẩm nước chấm lên men này là tốt và không mâu thuẫn với yêu cầu kiểm nghiệm nước chấm lên men của Bộ Y tế [6].

5. Hiệu suất trích ly, hiệu suất thủy phân và độ thủy phân của phương pháp lên men ươm - trích ly

Chúng tôi tiến hành xác định hiệu suất trích ly, hiệu suất thủy phân và độ thủy phân của phương pháp lên men ươm - trích ly trong quá trình sản xuất nước chấm. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Hiệu suất trích ly, hiệu suất thủy phân và độ thủy phân của phương pháp lên men ươm - trích ly trong quá trình sản xuất nước chấm lên men

Hiệu suất Trích ly (%)	Hiệu suất thủy phân (l/kg nguyên liệu đã lên mốc)	Độ thủy phân $N_{\text{acid amin}}/N_{\text{toàn phần}}$ (theo%)
85,00	1,81	54,00

Qua bảng 6, chúng tôi nhận thấy rằng: hiệu suất thủy phân bằng phương pháp lên men ươm để sản xuất nước chấm lên men của chúng mà chúng tôi nghiên cứu là thấp hơn so với chủng *Asp. oryzae* VNI mà Quân Văn Thịnh đã sử dụng (1,88). Tuy nhiên, điều này có thể chấp nhận vì độ thủy phân của nước chấm lên men của chúng tôi lại cao hơn (54%) so với kết quả độ thủy phân (50%) mà Quân Văn Thịnh đã đạt được [6].

6. Đánh giá kết quả kiểm nghiệm của mẫu nước chấm lên men

Kết quả kiểm nghiệm mẫu nước chấm lên men có thể khái quát ở bảng sau:

Bảng 7. Đánh giá kết quả kiểm nghiệm mẫu nước lên men

1	Trạng thái cảm quan	Tốt
2	Hàm lượng đạm toàn phần	19,67±0,70 (g/l)
3	Tỷ lệ $N_{\text{formol}}/N_{\text{toàn phần}}$	66%
4	Tỷ lệ $N_{\text{ammoniac}}/N_{\text{formol}}$	18%
5	Độ chua	6,00 (g/l)
6	Hàm lượng muối NaCl	240,50 (g/l)
7	Chỉ tiêu vi sinh vật	Không có Aflatoxin
8	Độ pH	6,0

Từ sự khái quát này, đối chiếu với chỉ tiêu phân loại mẫu nước chấm lên men chúng tôi có thể xếp mẫu nước chấm lên men này vào loại đặc biệt với hiệu suất thủy phân 1,811/1 kg nguyên liệu đã lên mốc.

IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được, chúng tôi rút ra những kết luận sau :

1. Lượng nước trộn vào khối mốc trước khi lên men ẩm thích hợp nhất là 30% so với trọng lượng mốc. Lúc đó hàm lượng đạm toàn phần đạt $19,67 \pm 0,70$ g/l, hàm lượng N - acid amin đạt $10,68 \pm 0,38$ (g/l).
2. Trong quá trình lên men ẩm, lượng N - formol, N - ammoniac và acetic tăng dần theo thời gian. Hàm lượng N - formol đạt giá trị cực đại sau 72 giờ lên men ẩm và hàm lượng N - ammoniac, acid acetic sẽ vượt quá tiêu chuẩn quy định của Bộ Y tế nếu lên men ẩm quá 96 giờ.
3. Thời gian lên men ẩm tốt nhất là 72 giờ.
4. Có thể xếp mẫu nước chấm lên men này vào loại đặc biệt với hiệu suất thủy phân 1,81/kg nguyên liệu đã lên mốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Văn Nhương, Quán Văn Thịnh, 1968.
Kỹ thuật sản xuất tương và nước chấm. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Lê Văn Nhương, Nguyễn Văn Chúc và cộng sự, 1978.
Thu nhận và ứng dụng các chất hoạt động sinh học từ vi sinh vật. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Phạm Văn Số - Bùi Thị Như Thuận - Bùi Minh Đức, 1975.
Kiểm nghiệm lương thực, thực phẩm. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
4. Phan Văn Thích, 1973.
Hiện tượng huỳnh quang và phân tích huỳnh quang. Giáo trình Khoa Vật lý Đại học Tổng hợp, Hà Nội.
5. Quán Văn Thịnh, 1979.
Sinh tổng hợp protease từ chủng nấm mốc *Asp.oryzae* VNI và ứng dụng trong sản xuất nước chấm. Luận án PTS. Khoa học Kỹ thuật, Đại học Bách khoa, Hà Nội.
6. Bùi Thị Như Thuận - Nguyễn Phùng Tiến, Bùi Minh Đức, 1991.
Kiểm nghiệm chất lượng và thanh tra vệ sinh an toàn thực phẩm. NXB Y học, Hà Nội.
7. Lê Khánh Trai, Hoàng Hữu Như, 1979.
Ứng dụng xác suất thống kê trong Y, Sinh học. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

THE UTILIZATION STUDY OF *Aspergillus oryzae* STRAIN WITH HIGH
PROTEASE ACTIVITY ISOLATED FROM SOYBEAN SAUCE AT HUE
IN FERMENTED SAUCE PRODUCTION

Ngo Thi Tuong Chau

SUMMARY

*Researched and perfected the technology of fermented sauce production by using *Aspergillus oryzae* strain with high protease activity isolated from BoDe soybean sauce production. The results found that, according to the standard, the fermented sauce sample produced may reach at excellent level with hydrolizing efficiency 1,811/kg fermented material in optimum condition.*

1.P.8

PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU CÁC VI KHUẨN NHÓM *Bacillus* ƯA KIỀM SẢN XUẤT α - AMYLaza KIỀM

Nguyễn Văn Đạt, Đỗ Thị Hồng Việt, Hoàng Việt
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Vi sinh vật có khả năng đặc biệt thích nghi với các điều kiện môi trường khác nhau [3]. Các vi sinh vật mọc tốt ở pH kiềm, thường là ở pH 9-10 thì được gọi là vi sinh vật ưa kiềm [10]. Thời gian vừa qua, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào nghiên cứu về enzym học, sinh lý học, di truyền và sinh học phân tử của các vi sinh vật sinh sống được ở các điều kiện sống khác nhau, đặc biệt là ở môi trường có pH cao, vì ý nghĩa khoa học cũng như ứng dụng của chúng.

Các vi sinh vật ưa kiềm, đặc biệt là vi khuẩn nhóm *Bacillus* tiết nhiều enzym như amylaza, celulaza, xylanaza, proteaza [3, 7]. Việc sản xuất amylaza kiềm được thực hiện lần đầu tiên ở chủng *Bacillus* kiềm No. A-40-2 (ATCC21592), sau khi được chọn từ khoảng 300 chủng ưa kiềm [2]. Enzym này thuộc nhóm α -amylaza đường hoá. Gần đây, Iragashi và cs. [5] đã công bố việc phân lập α -amylaza đường hoá từ *Bacillus* ưa kiềm, tuy nhiên pH tối ưu cho phản ứng là 8,5. Có một số bài khác mô tả việc phân lập được các chủng cho α -amylaza kiểu dịch hoá từ *Bacillus* ưa kiềm. Tuy nhiên có rất ít thông tin về các enzym này [1, 8]. Các enzym α -amylaza dịch hoá khác từ *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* hay *B. stearothermophilus* là những *Bacillus* ưa pH trung tính (neutrophilic) cho pH tối ưu trong khoảng 6-9 [14]. Đã có một số nghiên cứu di truyền ở các chủng *Bacillus* kiềm [9, 11].

Trong bài báo này, chúng tôi mô tả việc phân lập các vi khuẩn nhóm *Bacillus* ưa kiềm, chọn lọc những chủng sản xuất cao amylaza kiềm và nghiên cứu chủng *Bacillus* No. 39 là chủng sản xuất một kiểu α -amylaza kiềm mới, thuộc loại dịch hoá.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Phân lập vi khuẩn nhóm *Bacillus* ưa kiềm từ đất

Các mẫu đất thu thập từ các vùng khác nhau, chủ yếu là đất vườn, được hoà vào dung dịch sinh lý vô trùng trong ống nghiệm. Sau đó các mẫu được ủ ở 80°C trong 20 phút. Phần dịch nổi được hoà loãng thích hợp và cấy vào môi trường Horikoshi [4]. Ngày

* Nghiên cứu này được thực hiện tại Viện Công nghệ Sinh học, TT Khoa học Tự nhiên & Công nghệ Quốc gia trong đề tài cấp trung tâm: "Hoàn thiện công nghệ sản xuất và ứng dụng amylaza tái tổ hợp" (1999-2000) do PTS. Trương Nam Hải chủ trì.

hôm sau, các khuẩn lạc mọc lên, được đánh giá sơ bộ và được cấy truyền sang môi trường Horikoshi II có bổ sung 1% tinh bột. Những chủng vi khuẩn ưa kiềm và chúng có cho vòng thủy phân tinh bột cao được tuyển chọn, nhuộm tiêu bản xác định là *Bacillus*, cất giữ ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2. Nuôi cấy vi khuẩn và sản xuất amylaza ở môi trường dịch thể

Các vi khuẩn được nuôi cấy ở môi trường Horikoshi dịch thể, trên máy lắc tròn 200 vòng/phút, trong 36 giờ ở 37°C. Dịch nổi được thu nhận sau khi ly tâm 14000 vòng/phút, trong 10 phút (Avanti™ 30 Centrifuge, Beckman) và cất giữ ở -20°C.

3. Xác định hoạt tính amylaza

Hoạt tính amylaza được xác định bằng việc bổ sung 0,1 ml dịch nổi vào 1 ml dung dịch tinh bột tan (0,5%) trong đệm acetat (pH 4-6), đệm Tris-HCl (pH 7-8) và glycine-Na₂CO₃ (pH 9-11). Sau đó hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 120 phút. Đường thủy phân được xác định theo như phương pháp của Somogyi [12]. Một đơn vị hoạt độ enzym được tính như là lượng enzym làm giải phóng lượng đường khử tương đương với 1μg glucoza trong 1 phút trong 1 ml hỗn hợp phản ứng ở điều kiện như trên.

4. Phân tích sản phẩm thủy phân bằng sắc ký giấy

10-20 μl dịch thủy phân tinh bột được chấm lên giấy sắc ký Whatman số 1 và được chạy 3 lần ở dung môi n-butanol:axit acetic:nước (4:1:1). Sau khi sắc ký, sản phẩm thủy phân được hiện hình bằng nhuộm với dung dịch nitrat bạc/KOH [13].

III. KẾT QUẢ

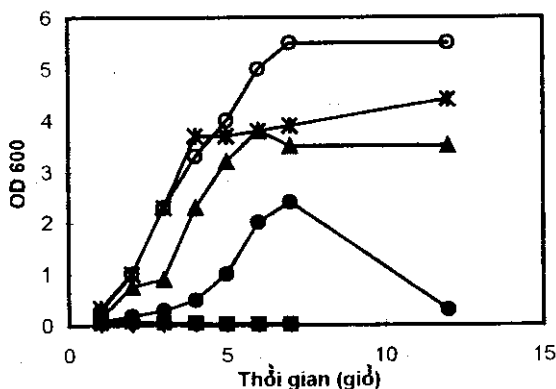
1. Phân lập và tuyển chọn *Bacillus* ưa kiềm có khả năng thủy phân tinh bột cao

Từ các mẫu đất thu thập, chúng tôi đã sơ bộ tuyển chọn được hơn 150 chủng *Bacillus* ưa kiềm. Khi được cấy trên môi trường có pH 7, chúng không mọc hoặc mọc rất yếu. Sau khi khẳng định về tính ưa kiềm của chúng, chúng tôi đã cấy sang môi trường Horikoshi II có bổ sung tinh bột tan và xem xét khả năng thủy phân tinh bột bằng nhuộm với dung dịch Lugol (0,1% I₂, 0,2% KI₂). Chúng tôi đã chọn được 12 chủng *Bacillus* cho khả năng thủy phân tinh bột cao. Sau khi nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy là 12 chủng tuy cho vòng thủy phân tinh bột trên đĩa thạch có chứa tinh bột, nhưng chúng không cho các sản phẩm thủy phân là đường đơn. Riêng có chủng số 3 và 39 ngoài việc cho sản phẩm thủy phân là đường đơn còn có hoạt tính cao ở pH 11. Qua nghiên cứu sơ bộ, chúng tôi quyết định nghiên cứu sâu hơn chủng số 39.

2. Ảnh hưởng của pH tới sự phát triển của *Bacillus* kiềm No. 39 ở môi trường dịch thể

Sự phát triển của *Bacillus* No. 39 được theo dõi ở môi trường dịch thể Horikoshi, với pH khác nhau, trong khoảng từ 6 cho đến 10.5. Các kết quả cho thấy, chủng No. 39 không thể mọc được ở pH vùng trung tính, hoặc rất yếu ở vùng kiềm nhẹ, mọc tốt nhất

ở trong khoảng pH 9-10 (hình 1). Các kết quả tương tự cũng đã được khẳng định khi nuôi cấy ở trên môi trường Horikoshi thạch. Điều này chứng tỏ rằng *Bacillus* No. 39 là vi khuẩn ưa kiềm bắt buộc (obligate alkaphilic *Bacillus* sp.). Ngoài ra, hoạt tính amylaza cao nhất cũng được phát hiện thấy khi nuôi cấy ở pH tối ưu cho sự phát triển, pH 9-10.

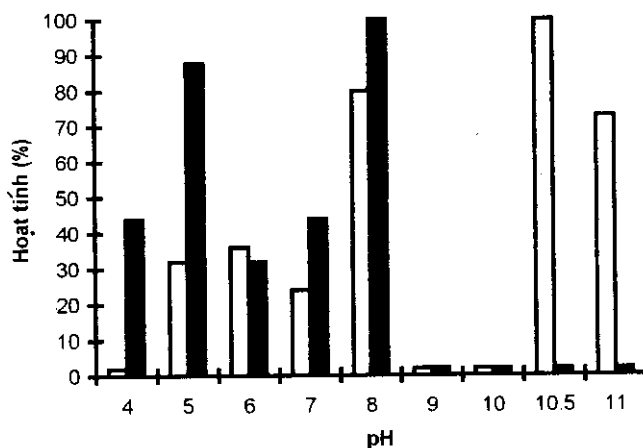


Hình 1. Đường cong phát triển của chủng *Bacillus* No. 39 ở môi trường Horikoshi có pH khác nhau.

Trên đồ thị hình vuông đen biểu diễn đường cong phát triển ở pH 7.0; hình tròn đen ở pH 8.2; hình tròn trắng ở pH 9.0; hình hoa thị ở pH 10 và tam giác đen ở pH 10.5.

3. Nghiên cứu tính chất sinh hoá của α -amylaza của chủng *Bacillus* No. 39

1. Ảnh hưởng của pH tới hoạt tính của amylaza



Hình 2. Hoạt tính thủy phân tinh bột ở các điều kiện pH khác nhau.

Cột đen và cột trắng biểu diễn hoạt tính amylaza của *B. amyloliquefaciens* và *Bacillus* sp. No. 39, tính theo phần trăm so với hoạt tính cao nhất đối với từng chủng.

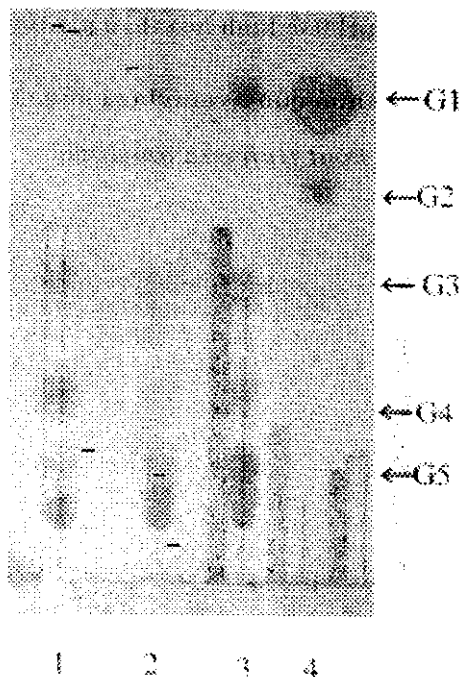
Hoạt tính của enzyme α -amylaza của *Bacillus* No. 39 trong môi trường nuôi cấy được thử ở các pH khác nhau. Như thấy ở hình 2, hoạt tính tối ưu được phát hiện thấy ở pH khoảng 10,5. Một đỉnh hoạt tính cao khác ở pH 8, tuy nhiên chỉ bằng khoảng 80% hoạt tính ở pH 10,5. Không thấy có hoạt tính thủy phân tinh bột nếu đệm dùng có pH 9 hay 10. Đối với α -amylaza của *Bacillus amyloliquefaciens*, hoạt tính cao nhất ở pH 8. ở pH 9, 10 hay 11, chúng tôi không phát hiện thấy có hoạt tính thủy phân tinh bột.

2. Sản phẩm thủy phân

Dịch α -amylaza được thử khả năng thủy phân các nguồn tinh bột khác nhau. Sau 2 giờ ủ ở 37°C, sản phẩm thủy phân được phân tích bằng sắc ký giấy Whatmann No.1. So sánh với α -amylaza dịch hoá của *B. amyloliquefaciens*, amylaza của chủng *Bacillus* No. 39 cũng cho một ít đường đơn như G1, G2, G3, G4. Có thể có nhiều đường G5, hay G6 hoặc dextrin (hình 3). Nói chung so với α -amylaza dịch hoá của *B. amyloliquefaciens*, không có khác biệt lớn.

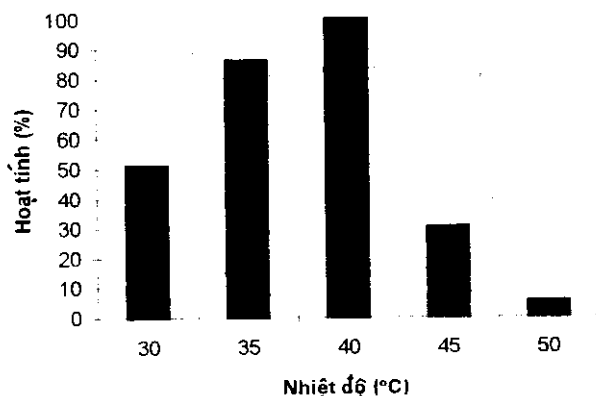
3. Ảnh hưởng của nhiệt độ, EDTA và ion Ca^{2+} tới hoạt tính amylaza

Hoạt tính thủy phân của enzym cũng đã được thử ở các nhiệt độ khác nhau, từ 30°C đến 50°C. Kết quả cho thấy, nhiệt độ tối ưu cho phản ứng ở khoảng 40°C (hình 4). Chất tẩy EDTA làm bất hoạt phản ứng ở nồng độ 5 mM. Việc bổ sung ion Ca^{2+} làm cho enzym có bền nhiệt hơn, tuy nhiên không đáng kể.



Hình 3. Sắc ký giấy sản phẩm thủy phân tinh bột của amylaza kềm chủng *Bacillus* No. 39.

Đường chạy 1: mẫu ủ với dịch nuôi cấy của *B. amyloliquefaciens*; Đường chạy 2: mẫu ủ với dịch nuôi cấy của *Bacillus* No. 3; Đường chạy 3: mẫu ủ với dịch nuôi cấy của *Bacillus* No. 39; Đường chạy 4: chuẩn glucoza và maltoza.



Hình 4. Nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính thủy phân tinh bột.
 Dịch nuôi cấy chủng *Bacillus* No. 39 được ủ với dung dịch tinh bột ở vùng nhiệt độ 30-50°C. Trên đồ thị, hoạt tính được biểu diễn theo phần trăm khi so với hoạt tính ở điều kiện cho hoạt tính cao nhất.

IV. THẢO LUẬN

Bằng cách sử dụng môi trường Horikoshi được bổ sung Na_2CO_3 (pH môi trường được chỉnh lại ở pH khoảng 9,5 hay 10), chúng tôi đã phân lập được hơn 150 chủng *Bacillus* kiềm, trong đó có 12 chủng *Bacillus* cho khả năng thủy phân mạnh. Theo tính toán, tỷ lệ vi khuẩn *Bacillus* kiềm chiếm khoảng 5-10% tổng số *Bacillus* phân lập được từ đất. Tuy nhiên, tỷ lệ này rất thay đổi, phụ thuộc vào việc chọn nguồn đất. Trong số 12 chủng *Bacillus* cho khả năng thủy phân tinh bột mạnh, chỉ có 2 chủng cho thấy sản phẩm thủy phân tinh bột là đường đơn, hoặc oligosacharide. Có lẽ phần lớn vi khuẩn ưa kiềm đó sản xuất debranching enzym, như pullulaza, izoamylaza, neopullunaza [6].

Việc chủng *Bacillus* No. 39 mọc tốt ở vùng pH kiềm (9-10), không có khả năng mọc ở pH trung tính cho thấy vi khuẩn này là vi khuẩn ưa kiềm bắt buộc. Nghiên cứu sơ bộ khác, cũng cho biết là vi khuẩn này cũng sản xuất nhiều enzym ngoại bào khác, như proteaza, cellulaza. Các nghiên cứu sơ bộ về enzym thủy phân tinh bột của chủng *Bacillus* No. 39 này như sản phẩm thủy phân tinh bột, tính miễn cảm cao với EDTA, khả năng làm mất màu nhanh tinh bột, và trọng lượng phân tử của enzym giống như của α -amylaza của *B. amyloliquefaciens*, khoảng 55000 dalton (kết quả không công bố). Cho thấy là chủng *Bacillus* No. 39 sản xuất enzym α -amylaza kiểu dịch hoá, với một tính chất đặc biệt là có hoạt tính tối ưu ở pH 10,5. Tuy nhiên enzym này không bền nhiệt: ủ 50°C trong 10 phút, làm bất hoạt hoàn toàn enzym. α -amylaza của *Bacillus* No. 39 có thể thuộc vào nhóm III, theo như sắp xếp phân loại các amylaza kiềm của Horikoshi (1996). Chưa có nhiều tài liệu công bố về các enzym α -amylaza kiểu dịch hoá từ *Bacillus* kiềm. Gần đây, có một công bố của Iragashi và cs. (1998) về việc tìm ra một enzym α -amylaza kiểu dịch hoá của một *Bacillus* kiềm, tuy nhiên pH tối ưu cho phản ứng là 8-8,5. Chúng tôi cho rằng *Bacillus* No. 39 có thể sản xuất α -amylaza kiềm mới, không những có ý nghĩa khoa học mà còn có ý nghĩa thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baijppai P., P. K. Baipai, 1989.
Biotechnol. Bioeng. 33:72-78
2. Horikoshi K., 1971.
Agric. Biol. Chem. 35:1783-1791
3. Horikoshi K. và T. Akiba, 1982.
Japan Scientific Society Press, Tokio, Springer-Verlag, New York.
4. Horikoshi K., 1996.
FEM Microbiology Review 18: 259-270.
5. Iragashi K., Y. Hatada, H. Hagihara, K. Saeki, M. Takaiwa, T. Uemura, K. Ara, K. Ozaki, S. Kawai, T. Kobayashi, S. Ito, 1998.
Appl. Environ. Microbiol. 64 :3282- 3289
6. Ito S., T. Kobayashi, K. Ara, K. Ozaki, S. Kawai, Y. Hatada, 1998.
Extremophiles 2:185-190.
7. Kelly C. T. và W. M. Fogarty, 1976.
Process Biochem. 11: 3-9.
8. Kimura K., A. Tsukamoto, Y. Ishi, T. Takano, K. Yamane, 1988.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:372-377.
9. Kudo T., M. Hino, M. Kitada, K. Horikoshi, 1990.
J. Bacteriol. 172:7282-7283.
10. Langworthy T. A., 1978.
In Microbial life in extreme environments (Kushner D. J. ed), trang 318-368.
Academic Press, London and New York.
11. Seto Y., M. Hashimoto, R. Usami, T. Hamamoto, T. Kudo, K. Horikoshi, 1995.
12. Somogyi M., 1952.
J. Biol. Chem. 195: 19-23.
13. Trecoflyan W. E., D. P. Procter, J. S. Hanison, 1950.
Nature (London), 166: 444- 448.
14. Yamamoto T., 1988.
Trong The Amylase Research Society of Japan (ed.). Hanbook of amylases and related enzymes. Pergamon Press. Oxford. England.

ISOLATION AND STUDY OF ALKAPHILIC *Bacillus* sp.
PRODUCING ALKAPHILIC α -AMYLASE

Nguyen Van Dat, Do Thi Hong Viet, Hoang Viet

SUMMARY

More than 150 alkaphilic Bacillus sp. were isolated from Vietnam soil. Twelve of them have a high amylolytic activity. Alkaphilic Bacillus No. 39 could produce a novel alkaphilic liquefying α -amylase. The preliminary results show that the enzyme has a pH optimum of 10,5 and displayed maximum activity at 40°C. This enzyme hydrolysed potato starch to yield maltopentaose, maltohexaose and dextrin as major end products.

1.P.9

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI TINH BỘT SỐNG

Tống Kim Thuần, Ngô Duy Tuấn,
Hoàng Tiên Nam, Trương Nam Hải
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Tinh bột là nguồn cơ chất được sử dụng rộng rãi trong công nghệ lên men. Để tạo thành các loại đường có phân tử lượng thấp mà các cơ thể lên men được, tinh bột trước hết phải được dịch hóa bằng enzym hoặc axit. Công đoạn đường hóa và dịch hoá tiêu hao tới 40% tổng số năng lượng. Để tránh sự lãng phí này, người ta đã sử dụng những amylaza có khả năng thủy phân tinh bột sống. Các enzym loại này có thể thu nhận từ rất nhiều nguồn trong thiên nhiên như thực vật, vi sinh vật. Tuy nhiên, những kiến thức về amylaza thủy phân tinh bột sống còn ít hơn rất nhiều so với các amylaza thủy phân tinh bột chín. Trong những năm gần đây, đã có một số công trình nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các vi sinh vật (nấm mốc, vi khuẩn, nấm men) có khả năng phân giải tinh bột sống [1-10]. Họ đã tách chiết, tinh sạch và nghiên cứu các đặc tính của glucoamylaza từ nấm mốc *Aspergillus awamoni*, *Rhizopus niveus*, *Chalara paradoxa* [4,9,11], từ nấm men *Cryptococcus* sp., *Endomycopsis fibuligera* [5,8], từ vi khuẩn *Clostridium thermosulfurogenes*, *Bacillus circulans*, *Cytophaga* sp. [10,7,6] và đã chỉ cho thấy các enzym thu nhận từ các chủng vi sinh vật trên đều có hoạt tính phân giải tinh bột sống cao. Đặc biệt amylaza ngoại bào của vi khuẩn *B. circulans* phân giải tinh bột khoai tây sống được coi như là một trong những amylaza có hoạt lực cao nhất trong các loại enzym thủy phân tinh bột sống [12]. Một số tác giả còn đi sâu nghiên cứu khả năng bám trên bề mặt hạt bột sống của glucoamylaza [9,10,12] và ảnh hưởng của các chất ức chế lên hoạt tính glucoamylaza [13]. Một số tác giả Nhật Bản và Thái Lan đã nghiên cứu sử dụng chế phẩm từ nấm sợi *Rhizopus koji* và *Chalara paradoxa* để lên men cồn từ bột sắn sống và thu được những kết quả rất khả quan [11,14].

Ở Việt Nam, các công trình đề cập tới vi sinh vật phân giải tinh bột sống còn ít [15,16,17]. Vì vậy, việc tuyển chọn, sưu tầm một bộ chủng vi sinh vật đa dạng về chủng loại có khả năng phân giải tinh bột sống từ các nguồn thiên nhiên khác nhau là một vấn đề cần thiết, có ý nghĩa lý thuyết và thực tiễn. Các chủng vi sinh vật hoang dại có hoạt tính phân giải tinh bột sống cao có thể được nghiên cứu sâu hơn để áp dụng trực tiếp vào sản xuất. Còn đối với các chủng có đặc điểm đặc biệt (sinh trưởng ở nhiệt độ và

dải pH rộng) là nguồn gen quý cho nghiên cứu di truyền tái tổ hợp để tạo ra các chủng lai có ưu thế.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải tinh bột sống từ các nguồn nguyên liệu tự nhiên của Việt Nam.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

Mẫu	Địa điểm thu thập
• Gạo, sắn, ngô bị phân huỷ:	Bắc Giang, Hà Nội, Yên Bái, Hòa Bình,
• Tinh bột sắn, ngô, gạo sống mốc:	Bắc Giang, Hà Nội, Hải Phòng
• Nước, bánh men rượu sắn, gạo:	Bắc Giang, Bắc Ninh, Thái Nguyên
• Bánh men rượu Trung Quốc:	Chợ Bưởi
• Bánh men rượu Bắc Hà:	Lào Cai
• Thức ăn gia súc:	Đồng Nai, Kiên Giang, Bắc Giang
• Bã rượu Sake Nhật Bản:	Huế
• Đất nơi sản xuất bún, miến, phở:	Phú Đô, Hà Tây, Hà Nội
• Hoa quả chín: chuối, cà chua, táo:	Hà Nội

2. Phương pháp

Phân lập vi sinh vật có khả năng sinh trưởng tốt trên tinh bột sống: môi trường thạch đĩa Czapek và Hansen chứa 2% tinh bột sống các loại là nguồn cacbon duy nhất [18]. Tinh bột sống trước khi bổ sung vào môi trường thạch cần được dàn mỏng, khử trùng bằng tia UV trong Box cấy vô trùng 30 phút. Đổ thạch ra các đĩa Petri, xây khô mặt thạch. Phân lập các chủng vi sinh vật bằng phương pháp pha loãng tới hạn [18]. Các đĩa Petri được ủ trong tủ ấm 30°C, sau một thời gian nhất định (vi khuẩn sau 24 giờ, nấm men sau 48 giờ và nấm sợi sau 72 giờ) lấy ra để tách các chủng dựa trên các đặc điểm hình thái của các khuẩn lạc. Các chủng vi sinh vật được đánh số thứ tự và đặt kí hiệu theo nguồn gốc phân lập.

Tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải tinh bột sống: dựa trên hiệu số đường kính vòng phân giải không bắt màu với dung dịch Lugol trên môi trường thạch đĩa chứa các loại tinh bột sống và đường kính khuẩn lạc.

Quan sát hình dáng tế bào dưới kính hiển vi quang học Jena.

Xác định hoạt tính phân giải tinh bột sống bằng phương pháp của Millek G. L. [19]: cho 100µl dịch enzym vào ống nghiệm chứa 1ml dung dịch tinh bột tan trong đệm photphat, ủ 37°C trong 15 phút. Hút 500µl hỗn hợp trên cho vào 750µl DNSA (dinitrosalicylic acid). Đun sôi 15 phút, làm lạnh và bổ sung 2,5ml nước cất rồi đo trên máy quang phổ với bước sóng 575nm. Xác định lượng đường khử bằng đồ thị glucoza chuẩn.

Một đơn vị hoạt tính enzym là lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 μ mol đường khử trong 1 phút ở điều kiện xác định trên.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập vi sinh vật có khả năng phân giải tinh bột sống từ các nguồn nguyên liệu khác nhau

Vi sinh vật phân giải tinh bột sống phân bố ở khắp nơi trong thiên nhiên, nhưng chúng thường có mặt và có hoạt tính cao ở trong đất, hạt ngũ cốc bị phân huỷ và các loại quả chứa nhiều tinh bột.

Từ 18 nguồn mẫu thu thập được ở nhiều địa phương khác nhau, đã phân lập được 462 chủng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường có chứa tinh bột sống. Chúng bao gồm các nhóm vi sinh vật sau: nấm sợi 227 chủng, vi khuẩn 179 chủng, nấm men 56 chủng. Kết quả phân lập được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải tinh bột sống, phân lập từ các nguồn khác nhau

Số TT	Nguồn phân lập	Số chủng vi sinh vật phân lập được			Tổng số	Tỉ lệ %
		Nấm men	Vi khuẩn	Nấm mốc		
1	Sắn khô, sắn tươi mốc	0	12	36	48	10,38
2	Gạo bị phân huỷ	0	15	27	42	9,09
3	Nước men rượu sắn	2	2	5	9	1,94
4	Nước men rượu nếp	2	2	4	8	1,73
5	Nước men rượu gạo	3	5	2	10	2,16
6	Bánh men rượu làng Vân	6	3	15	24	5,19
7	Bánh men rượu chợ Bưởi	6	6	21	33	7,14
8	Hoa quả chín	12	10	8	30	6,49
9	Bã rượu Sa ke	4	8	8	20	4,33
10	Đất nơi sản xuất bún Phú Đô	4	8	19	31	6,70
11	Đất nơi sản xuất bún Hà Tây	0	17	13	30	6,49
12	Đất nơi sản xuất miến Hà Tây	1	11	10	22	4,76
13	Khoai tây mốc	2	5	3	10	2,16
14	Thức ăn gia súc	9	2	13	24	5,19
15	Nước nơi sản xuất bún Phú Đô	0	2	0	2	0,43
16	Đất trồng đậu tương Bắc Ninh	0	1	8	9	1,95
17	Đất trồng đậu tương Hà Tây	0	2	5	7	1,51
18	Bột gạo, ngô, sắn sống	5	68	30	103	22,30
	Σ	56	179	227	462	100

Từ kết quả bảng 1 ta thấy, trong số 462 chủng vi sinh vật phân lập được thì nhóm nấm mốc và vi khuẩn chiếm đa số. Nấm mốc chiếm 227 chủng (49,13 %), vi khuẩn 179 chủng (38,74%), riêng nhóm nấm men chỉ tách được 56 chủng (12,13%). Điều này chứng tỏ rằng, nhóm nấm mốc và vi khuẩn có khả năng sinh trưởng, phân giải tinh bột sống mạnh hơn so với nhóm nấm men.

Số chủng vi sinh vật được phân lập phụ thuộc vào nguồn gốc của mẫu thu thập. Mẫu nào chứa nhiều tinh bột thì phân lập được số chủng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng, phân giải tinh bột sống nhiều hơn. Thí dụ, từ nguồn tinh bột sắn gạo ngô sống, phân lập được 103 chủng vi sinh vật. Trong khi đó, từ các mẫu đất trồng đậu tương ở Bắc Ninh và Hà Tây chỉ phân lập được 7, 9 chủng.

2. Khả năng phân giải tinh bột sắn sống của các chủng vi sinh vật phân lập được

Bảng 2. Khả năng phân giải tinh bột sắn sống của các chủng vi sinh vật phân lập được

Số TT	Nhóm VSV	Tổng số chủng	Tỷ lệ % các chủng vi sinh vật phân giải tinh bột sắn sống			
			Tốt	Khá	Trung bình	Kém
1	Nấm men	56	30,0	11,6	28,4	30,0
2	Vi khuẩn	179	47,2	17,8	12,9	22,1
3	Nấm mốc	227	63,2	18,6	6,9	11,3
	Σ	462	52,8	17,5	11,9	17,7

Ghi chú: Tốt: $d \geq 2$ Trung bình: $0,5 \leq d < 1,5$ Khá: $1,5 \leq d < 2$ Kém: $d < 0,5$
d: hiệu số đường kính vòng phân giải (cm)

Dựa vào hiệu số đường kính vòng phân giải không bắt màu với dung dịch Lugol và đường kính khuẩn lạc, tính được tỷ lệ % số chủng có khả năng phân giải tinh bột sống tốt, khá, trung bình và yếu.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, trong nhóm nấm mốc tỷ lệ các chủng có khả năng phân giải tinh bột sống cao hơn so với vi khuẩn và nấm men. Trong số 227 chủng nấm mốc, tỷ lệ % số chủng phân giải tinh bột sắn sống tốt chiếm 63,2% gấp 1,5 lần so với vi khuẩn và 2 lần so với nấm men.

Mặc dù vậy, cần nhấn mạnh một điểm là phần lớn các chủng nấm mốc đều có hệ sợi phát triển rất mạnh, nhưng khả năng tiết enzym ngoại bào kém hơn vi khuẩn. Những chủng này có thể được sử dụng cho những mục đích thu sinh khối, protein, tách chiết các chất thứ cấp.

3. Một số đặc điểm hình thái và hoạt tính phân giải tinh bột sống của 15 chủng vi sinh vật được tuyển chọn

Trong số 462 chủng vi sinh vật, đã tuyển chọn được 15 chủng có đặc điểm hình thái khuẩn lạc tương đối khác nhau (11 chủng vi khuẩn, 2 chủng nấm mốc, 2 nấm men) có

vòng phân giải lớn nhất để xác định hoạt tính phân giải tinh bột sống của chúng. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Một số đặc điểm hình thái và hoạt tính phân giải tinh bột sống của các chủng vi sinh vật tuyển chọn từ các nguồn khác nhau

Nhóm vi sinh vật	Kí hiệu chủng	Nguồn phân lập	Một số đặc điểm hình thái của các chủng vi sinh vật	Đường kính vòng phân giải (cm)	Hoạt tính phân giải tinh bột sống (đv/ml)
Vi khuẩn	KK130	Tinh bột sống các loại	Hình que ngắn	1,5	2,50
	KK139	Tinh bột sống các loại	Hình que, mảnh	1,4	4,04
	KK153	Đất nơi làm bún	Hình que ngắn	1,2	1,17
	KK154	Đất nơi làm bún	Hình que ngắn, to	1,1	4,17
	KK163	Tinh bột sống các loại	Hình que ngắn	1,3	1,50
	KK184	Tinh bột sống các loại	Hình que ngắn	0,9	3,25
	KK186	Tinh bột sống các loại	Hình que ngắn, hình trứng	1,6	3,83
	KK201	Tinh bột sống các loại	Hình que ngắn, hình trứng	1,4	3,75
	SM323	Sắn tươi bị phân huỷ	Hình trứng rất nhỏ	1,1	2,44
	SK336	Bã rượu Sake	Hình que to, dài	1,1	4,20
	SM358	Sắn mốc	Hình trứng, cầu nhỏ, tách rời	1,3	2,75
Nấm mốc	SM33	Sắn mốc	Khuẩn lạc màu đen. Hệ sợi có vách ngăn. Bào tử nâu đen, tròn	1,1	3,58
	BM74	Bánh men rượu làng Vân	Khuẩn lạc màu trắng xám, lan rộng. Sợi mảnh, có vách ngăn. Bào tử hình tròn	1,8	4,00
Nấm men	F7	Thức ăn gia súc	Có 3 loại: oval, trụ, sợi	0,8	3,17
	F28	Thức ăn gia súc	Có 3 loại: tròn, trụ, sợi	0,5	2,25

Từ bảng 3 cho thấy, chủng vi sinh vật được tuyển chọn đều có hoạt tính phân giải tinh bột sống, từ 1,5-4,0 đơn vị /ml dịch chiết. Trong các chủng vi khuẩn thì 3 chủng KK139, KK154, SK336 có hoạt tính enzym phân giải tinh bột sống cao nhất, lớn hơn 4 đơn vị /ml. Chủng nấm mốc BM74 có hoạt tính 4 đơn vị /ml. Chủng nấm men F7 có hoạt tính 3,17 đơn vị /ml.

Tóm lại, đã tuyển chọn được một bộ giống vi sinh vật lớn, có khả năng phân giải tinh bột sống khá, phong phú về chủng loại và đa dạng về nguồn gốc. Các chủng vi

sinh vật này hiện đang được giữ giống trên môi trường thạch nghiêng với nguồn cacbon duy nhất là tinh bột. Đó là nguồn gen đa dạng, quý giá để tạo các chủng vi sinh vật tái tổ hợp bằng công nghệ gen.

5 chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải tinh bột sống cao nêu trên (trên 4 đơn vị /ml) sẽ được nghiên cứu tiếp sâu hơn.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã phân lập được 462 chủng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường có các loại tinh bột sống là nguồn cacbon duy nhất. Trong đó, nhóm nấm mốc chiếm 227 chủng, vi khuẩn 179 chủng và nấm men 56 chủng.
2. Trong số 462 chủng vi sinh vật phân lập được có 52,8% tổng số chủng có khả năng phân giải tinh bột sống tốt, 17,5% phân giải khá, còn lại là trung bình và yếu.
3. Đã tuyển chọn được 15 chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải tinh bột sống tốt, từ 1,5-4 đơn vị /ml. Đặc biệt, có 3 chủng vi khuẩn KK139, KK154, SK336 và 1 chủng nấm mốc BM74, 1 chủng nấm men F7 có hoạt tính phân giải tinh bột sống cao, trên 4 đơn vị /ml. 5 chủng này sẽ được nghiên cứu tiếp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Takao S., 1987.
Screening of microorganisms for raw starch saccharifying enzyme production. Annual report of ICBiotech., 9 (6), P. 308-312.
2. Elegado F. B., Fujio Y., 1987.
Screening of *Rhizopus* strain active on raw starch digestion. Annual report of ICBiotech., 9(6), P. 459-460.
3. Sukara E., Yoshida T., Fujio Y., 1987.
Raw starch digestion enzyme production by *Rhizopus* mould in liquid culture. Annual report of ICBiotech., 9(6), P. 436-440.
4. Hayashida S., Perfecto Q.F., 1981.
Raw starch digestive glucoamylase productivity of protease-less mutant from *Aspergillus awamoni* var.kawachi. J. Agric. Biol. Chem., 45(12), P. 2675-2681.
5. Iefuji H., Chino M., Iimura Y., 1996.
Raw starch digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. Biochem. J., 318, P. 989-996.
6. Jeang C., Lee Y., Chang L.W., 1995.
Purification and characterization of a raw starch digesting amylase from soil bacterium *Cytophaga* sp. J. Bioch. and Molecular biology international. 35 (3). P. 549-557.

7. Pornsilapatip J., Pichyangkura S., 1988.
Characteristics of a partially purified raw starch digesting glucoamylase from *Amylomyces* sp. Annual report I.C. Biotech. 11(5), P. 352-357.
8. Ueda S., Saha B., 1983.
Raw starch digestive glucoamylase productivity from yeast *Endomycopsis fibuligera*. J. Enzyme Microbiol. Technol. 5, P. 196-199.
9. Saha B., Ueda S., 1983.
Raw starch adsorption, elution and digestion behaviour of glucoamylase of *Rhizopus niveus*. J. Ferment. Technol., 61(1), P. 67-72.
10. Saha B.C., Lecureux L.W., Zeikus J.G., 1988.
Raw starch adsorption-desorption purification of a thermostable β -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. Annual biochemistry. 175, P. 569-572.
11. Monma M., Kainuma K., 1992.
Heterogeneity of the glucoamylase components of the raw starch digesting amylase from *Chalara paradoxa*. Carbohydrate research. 227, P. 385-388. Amsterdam.
12. Taniguchi H., Odashima F., Igarashi M., Maruyama Y., Nakamura M., 1982.
Characterization of a potato starch digesting bacterium and its production of amylase. J. Agric. Biol. Chem. 46(8), P. 2107-2115.
13. Dương Văn Hợp, Ueda S., Fujio Y., 1988.
Effect of inhibitory factor (IF) on varieties of raw starch digestion with glucoamylase. Annual report. IC Biotech. 11, P. 271-277.
14. Fujio Y., Suyamadona P., Attasampunna P., Ueda S., 1984.
Alcoholic fermentation of raw cassava starch by *Rhizopus koji* without cooking. J. Biotech. and Bioeng. 26, P. 315-319.
15. Dương Văn Hợp, 1994.
Nghiên cứu thu nhận và ứng dụng chế phẩm etanol từ bột sắn sống. Tóm tắt luận án PTS Sinh học, Hà Nội.
16. Dương Văn Hợp, Nguyễn Lâm Dũng, 1990.
Sử dụng glucoamylaza từ *Aspergillus niger* và tế bào nấm men bất động trong lên men cồn từ bột sắn sống. Tạp chí Sinh học, Số 4, trang 28-32.
17. Nguyễn Lâm Dũng, Đào Xuân Mượn, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Thạch, Phạm Văn Ty, 1972.
Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật. Tập 1. NXB Khoa học & Kỹ thuật Hà Nội.
18. Millek G.L., 1959.
Use of DNS reagent for determination of reducing sugar. J. Anal. chem. 31, P. 426-428.

ISOLATION AND SCREENING OF MICROORGANISMS PRODUCING RAW STARCH DIGESTIVE AMYLASE

*Tong Kim Thuan, Ngo Duy Tuan,
Hoang Tien Nam, Truong Nam Hai*

SUMMARY

We have isolated 462 strains of microorganisms from various which were able to grow on the medium supplemented with raw starch as a carbon source. Among the isolated strains, 227 were fungi, 179 were bacteria and 56 were yeasts. It was show that 52.8% of the strains were capable of utilizing raw starch and 5 strains with highest activity had been selected for further study.

1.P.10

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ KHẢ NĂNG LÊN MEN CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM MEN PHÂN LẬP TỪ BÁNH MEN CỔ TRUYỀN

*Phùng Thị Thu Hà⁽¹⁾, Nguyễn Thế Trang⁽³⁾,**Nguyễn Thị Hiền⁽²⁾, Lương Đức Phẩm⁽³⁾*

(1): VIỆN NGHIÊN CỨU RƯỢU-BIA - NƯỚC GIẢI KHÁT

(2): TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

(3): VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Đã từ rất lâu, nhân dân ta đã biết dùng các loại bánh men để sản xuất rượu theo phương pháp cổ truyền và thu được sản phẩm là rượu trắng có chất lượng khá tốt. Nhưng chỉ đáp ứng được nhu cầu trong nước mà chưa chiếm lĩnh được thị trường xuất khẩu. Một trong những nguyên nhân chính của vấn đề này, theo chúng tôi là do chất lượng của bánh men chưa tốt. Bánh men được làm từ bột gạo, trộn men giống. Trong quá trình ủ, các vi sinh vật được phát triển và chính những vi sinh vật này có khả năng đường hoá tinh bột thành dịch đường và lên men rượu, tức là hai quá trình đường hoá và rượu hoá xảy ra đồng thời.

Hệ vi sinh vật trong bánh men cổ truyền chủ yếu là: nấm men, nấm mốc, vi khuẩn... nhưng việc nghiên cứu các chủng nấm men thuần khiết và vai trò của chúng trong bánh men cổ truyền chưa được quan tâm nhiều.

Chính vì vậy, báo cáo này trình bày kết quả nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và khả năng lên men của các chủng nấm men phân lập từ bánh men cổ truyền ở làng Vân.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

1. Bánh men

Sử dụng bánh men cổ truyền ở làng Vân, xã Vân Hà, huyện Việt Yên, tỉnh Bắc Giang.

2. Chủng giống

Các chủng nấm men được kí hiệu N^o1; N^o2; N^o3; N^o4; N^o5 và N^o6 được phân lập từ bánh men cổ truyền làng Vân được tiến hành tại Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ Sinh học thuộc Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia.

3. Môi trường

Môi trường thạch malt (KH_2PO_4 : 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1g, NaCl: 1g, Nước malt 7⁰Bx: 1000ml, thạch: 20g) và môi trường thạch Hansen (Glucosa: 50g, Pepton: 10g, KH_2PO_4 : 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 3g, Cao nấm men: 1g, thạch: 20g, Nước máy: 1000ml) để phân lập và nghiên cứu đặc điểm hình thái tế bào, hình dáng khuẩn lạc. Môi trường Hansen có bổ sung các loại đường để nghiên cứu khả năng đồng hoá và lên men các loại đường. Môi trường lên men (Glucosa: 200g, KH_2PO_4 : 1,5g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2,5g, Cao nấm men: 5g, Nước máy: 1000ml) để nghiên cứu khả năng lên men và các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng lên men của các chủng nấm men.

2. Phương pháp

1. Phân lập giống thuần khiết [1]

Môi trường phân lập được hấp cách thuỷ và được phân vào đĩa petri vô trùng để nguội. Nghiền mịn bánh men, cân 1g pha loãng bằng nước cất vô trùng tới nồng độ 10^{-5} đến 10^{-6} . Dùng pipet piston lấy 1 giọt dịch pha loãng cho vào đĩa petri, dùng que gạt vô trùng gạt khắp bề mặt môi trường. Sau đó nuôi trong tủ ấm ở 28°C nắp quay xuống dưới trong thời gian 48h. Chọn được 6 khuẩn lạc đặc trưng to, bóng riêng rẽ cấy chuyển vào ống thạch nghiêng chứa môi trường giữ giống (môi trường thạch malt hoặc Hansen + cao men) đã được khử trùng.

2. Đặc điểm hình thái tế bào và khuẩn lạc [1]

Cấy 6 chủng đã phân lập được vào các bình tam giác có chứa 100ml môi trường Hansen. Lắc trên máy lắc 220vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 24h. sau đó lấy ra làm tiêu bản giọt ép. quan sát trong kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần. Chọn kính trường tế bào nấm men đặc trưng nhất và rõ nét nhất thì chụp ảnh.

Xác định số lượng tế bào nấm men sử dụng buồng đếm hồng cầu.[3]

Quan sát khuẩn lạc ở các đĩa petri phân lập được ở nồng độ 10^{-5} : hình dáng, kích thước, màu sắc, bề mặt khuẩn lạc trơn, nhẵn bóng hay xù xì, mép khuẩn lạc.

3. Khả năng đồng hoá nitrat, đồng hoá và lên men các hợp chất các bon [1]

- Khả năng đồng hoá các loại đường: Dùng môi trường thạch Hansen có bổ sung các loại đường (2%) đổ vào hộp petri. Cấy giống từ môi trường nhân giống vào các hộp thạch. Nuôi trong tủ ấm 28°C , sau 24h, quan sát sự phát triển của khuẩn lạc.
- Khả năng lên men các loại đường: dùng bình Einhorn-Smith[1].

4. Xác định khả năng sinh enzyme [1]

Trên môi trường thạch Hansen có thay glucosa 50g/l bằng tinh bột 4g/l. Cấy nấm men theo phương pháp cấy chấm điểm. Nuôi ở 28°C trong 48h, lấy ra quan sát, nhuộm mặt thạch bằng dung dịch lugol (I_2 : 1g, KI: 2g, Nước cất 300ml). Đo vòng phân giải tinh bột.

5. Xác định hoạt lực lên men [1]

Phương pháp Calc: xác định hoạt lực lên men của nấm men bằng cách đo lượng khí CO_2 sinh ra sau 1h, 2h, 3h khi cho nấm men lên men trong môi trường lên men 10% đường maltoza và 0,2% KH_2PO_4 . **Phương pháp cân bình lên men:** Xác định hoạt lực lên men bằng các xác định lượng CO_2 sinh ra sau 24h, 48h, 72h qua việc cân khối lượng bình lên men.

6. Xác định các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng lên men

- **Ảnh hưởng pH môi trường[4]:** Trong môi trường lên men, dùng axit D-Tactic và NH_4OH để điều chỉnh pH= 4; 5;6. Bổ sung 5% giống, cho lên men ở 28°C. Sau 24,48,72h lấy ra đo nồng độ chất khô bằng khúc xạ kế và xác định độ cồn bằng ti trọng kế.
- **Ảnh hưởng nồng độ cồn[2]:** Trên môi trường lên men có bổ sung cồn 10, 12, 14, 16%V. Tiếp 5% giống, sau 72h xác định lượng CO_2 tạo thành bằng phương pháp cân bình lên men.
- **Ảnh hưởng của nồng độ đường[2]:** Tiếp 5% giống vào môi trường lên men có chứa các hàm lượng đường glucoza khác nhau: 100, 150, 200, 250, 300 g/l. Theo dõi khả năng lên men của các chủng thông qua việc cân khối lượng bình lên men sau 24, 48, 72h.

II. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Đặc điểm sinh học của các chủng nấm men

1. Hình thái khuẩn lạc và hình dáng tế bào

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của các chủng nghiên cứu

Chủng Đặc điểm	N ^o 1	N ^o 2	N ^o 3	N ^o 4	N ^o 5	N ^o 6
Hình dáng tế bào	Elip, cầu, trứng	Elip, cầu, trứng	Cầu, ovan, trứng	Cầu, ovan	Đa phần cầu, ovan	Tròn, trụ, sợi, hệ sợi có vách ngăn ngang
Nảy chồi	Nhiều phía	Nhiều phía	Nhiều phía	Nhiều phía	Nhiều phía	Vừa nảy chồi vừa bằng lối phân cắt
Tạo váng	–	–	Tạo váng	–	–	–
Căn	Rắn chắc	Rắn chắc	Hơi chắc	Rắn chắc	Rắn chắc	Nhảy
Hình dáng khuẩn lạc	Tròn to	Tròn to	Tròn	Tròn	Tròn nhỏ	Tròn to
Bề mặt khuẩn lạc	Nhấn bóng	Nhấn bóng	Nhấn	Nhấn	Nhấn	Nhấn
Màu khuẩn lạc	Trắng đục	Trắng	Trắng	Trắng đục	Trắng	Trắng đục
Mép khuẩn lạc	Không răng cưa	Không răng cưa	Có răng cưa	Không răng cưa	Không răng cưa	Có răng cưa

Ghi chú : – không có.

Từ 6 chủng nghiên cứu là N^o1, N^o2, N^o3, N^o4, N^o5 và N^o6, trên môi trường thạch malt và Hansen, chúng tôi nghiên cứu hình dáng tế bào, nảy chồi, sinh bào tử, khuẩn ty thật, khuẩn ty giả, tạo váng, cặn, hình dáng khuẩn lạc. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy: tế bào chủng N^o1, N^o2 chủ yếu là hình elip và hình trứng, Chủng N^o 3, 4, 5 chủ yếu là hình cầu. Riêng chủng N^o6 có hình tròn, hình trụ, hệ sợi có vách ngăn. Tất cả các chủng đều nảy chồi nhiều phía, chỉ chủng N^o6 vừa nảy chồi vừa bằng lối phân cắt. Bốn chủng N^o : 1, 2, 4, 5 không tạo váng, không có khuẩn ty giả. Chủng N^o3 có tạo váng, mép khuẩn lạc không có răng cưa. Đặc biệt chủng N^o6 không tạo váng, bề mặt khuẩn lạc nhẵn, có răng cưa, có khuẩn ty thật.

2.Xác định khả năng lên men và đồng hoá nitrat và các hợp chất cacbon

Với khả năng đồng hoá nitrat, chúng tôi sử dụng KNO₃ (0,7g) đưa vào môi trường và nhận thấy: tất cả các chủng đều không đồng hoá nitrat trừ chủng N^o6.

Để xác định khả năng đồng hoá và lên men các hợp chất cacbon, chúng tôi thí nghiệm với các nguồn cơ chất là các loại đường khác nhau. Kết quả được trình bày ở trong bảng 2.

Bảng 2. Khả năng đồng hoá và lên men các loại đường

Chủng Đường	N ^o 1	N ^o 2	N ^o 3	N ^o 4	N ^o 5	N ^o 6
Glucoza	++	++	+-	++	++	++
Saccharoza	++	++	++	++	++	++
Maltoza	++	++	++	++	++	++
Lactoza	--	--	--	+-	+-	++
Galactoza	++	++	++	++	++	--
Dextrin	+-	+-	+-	+-	+-	+-

Ghi chú: -- Không đồng hoá, Không lên men.
 ++ Đồng hoá, Lên men.
 +- Đồng hoá, Không lên men.

Từ bảng 2 cho thấy cả 6 chủng đều đồng hoá và lên men được glucoza, saccharoza, maltoza. Tất cả các chủng đều đồng hoá và lên men được đường galactoza trừ chủng N^o6. Chủng N^o1, 2, 3 không đồng hoá, không lên men được lactoza, chủng N^o4, 5 đồng hoá nhưng không lên men lactoza. Riêng chủng N^o6 đồng hoá và lên men lactoza. Cả 6 chủng đều đồng hoá nhưng không lên men dextrin.

3. Khả năng phân giải tinh bột của các chủng nghiên cứu

Để xác định khả năng sinh enzyme của các chủng nấm men, chúng tôi đo đường kính vòng thủy phân tinh bột. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Hoạt tính phân giải tinh bột của các chủng nghiên cứu

Chủng	Đường kính vòng thủy phân (mm)
N ^o 1	0
N ^o 2	0
N ^o 3	0
N ^o 4	0
N ^o 5	0
N ^o 6	10,875

Từ bảng 3 cho thấy: chỉ có chủng N^o6 là có vòng phân giải tinh bột tức là chủng N^o6 có hoạt tính amilaza có khả năng sinh enzyme glucoamilaza, 5 chủng còn lại không sinh enzyme. Như vậy, chủng N^o6 có thể là giả nấm men thuộc giống *Endomycopsis*.

Kết luận: Sau khi nghiên cứu một số đặc điểm sinh học trên như : sinh lí, sinh hoá và tra theo khoá phân loại của Lodder [6], chúng tôi kết luận: chủng N^o1; N^o2 là *Saccharomyces cerevisiae* ; chủng N^o3 là *Pichia farinoza* ; chủng số N^o4; N^o5 là *Saccharomyces vini* ; chủng N^o6 là *Endomycopsis fibuliger* nhưng trong quá trình phát triển có khả năng xảy ra hiện tượng thay đổi hình thái và mọc hệ sợi.

2. Xác định hoạt lực lên men của các chủng nghiên cứu

Lực lên men của mỗi chủng giống là một chỉ tiêu quan trọng hàng đầu trong men rượu. Lực lên men được biểu thị bằng lượng CO₂ sinh ra trong điều kiện nuôi kỵ khí.[5]

1. Phương pháp Calor

Xác định lượng CO₂ sinh ra sau 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ trên môi trường lên men có chứa 10% đường maltoza có chứa 0,2 % KH₂PO₄. Kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Hoạt lực lên men của các chủng nghiên cứu

Chủng	Hoạt lực lên men (ml CO ₂)			
	Sau 1 giờ	Sau 2 giờ	Sau 3 giờ	Tổng
N ^o 1	2,2	6,4	8,0	16,6
N ^o 2	3, 8	7,3	8,1	19,2
N ^o 3	4,0	5,9	6,0	15,9
N ^o 4	0,8	1,9	2,5	5,2
N ^o 5	1,6	3,	6,6	11,7
N ^o 6	0,08	0,1	0,14	0,32

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy chủng N^o1, N^o2 có hoạt lực mạnh nhất là 16,6 và 19,2 ml CO₂, còn chủng N^o6 có hoạt lực kém nhất là 0,32 ml CO₂. Như vậy chỉ có chủng N^o1, N^o2 là có khả năng lên men sinh rượu với hiệu suất cao. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng lên men của chủng N^o1 và N^o2 để chọn điều kiện lên men tối ưu nhất.

2. Ảnh hưởng của nồng độ đường ban đầu trong môi trường lên men

Nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ đường(100 g/l, 150 g/l, 200 g/l, 250 g/l và 300 g/l) lên các chủng chọn lựa thông qua lượng CO₂ thoát ra bằng phương pháp cân bình lên men qua ba giai đoạn: 24 , 48, 72 giờ. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

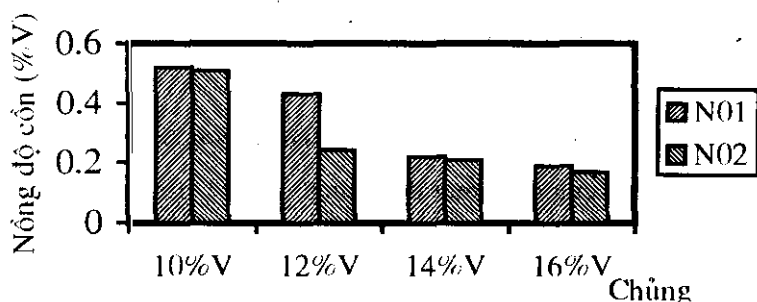
Bảng 5. Khả năng lên men chủng N^o1, N^o2 ở các nồng độ đường khác nhau

Hàm lượng đường	Chủng	Lượng CO ₂ giải phóng (g/50ml)			
		Sau 24h	Sau 48h	Sau 72h	Tổng
	N ^o 1	0,24	0,28	0,50	1,02
	N ^o 2	0,23	0,27	0,43	0,93
100g/l	N ^o 1	0,17	0,29	0,40	1,50
	N ^o 2	0,14	0,28	0,47	0,81
150 g/l	N ^o 1	0,61	0,89	0,91	2,41
	N ^o 2	0,40	0,73	0,92	2,05
200 g/l	N ^o 1	0,07	0,18	0,36	0,61
	N ^o 2	0,04	0,12	0,32	0,48
250 g/l	N ^o 1	0,03	0,06	0,10	0,19
	N ^o 2	0,03	0,05	0,09	0,17
300 g/l	N ^o 1				
	N ^o 2				

Từ bảng 5 chúng tôi nhận xét thấy với hàm lượng đường 200g/l , khả năng lên men của chủng số một là mạnh nhất, sau 72h lượng CO₂ sinh ra nhiều nhất (2,41 g/50ml).

3. Ảnh hưởng của nồng độ cồn ban đầu trong môi trường lên men

Để tuyển chọn được các chủng nấm men có thể chịu được nồng độ cồn đã chọn có trong môi trường lên men, nghĩa là chúng đó có thể tiếp tục lên men hoặc tích tụ cồn với nồng độ cồn đó hoặc cao hơn. Quá trình thực hiện trong môi trường lên men đã có cồn với nồng độ 10, 12, 14, 16 %V, ở nhiệt độ 28°C sau 72h, căn cứ vào lượng cồn được tạo thành qua việc xác định bằng tỉ trọng kế. Kết quả được trình bày dưới hình 1:



Hình 1. Khả năng lên men của chủng N^o1; N^o2 ở các nồng độ cồn

Từ hình vẽ trên chúng tôi thấy chủng N^o1; N^o2 phát triển tốt nhất trên môi trường có hàm lượng cồn là 10% V (lượng cồn tạo ra thêm là 0,5%V), vẫn phát triển trên môi trường có hàm lượng cồn 12%V, cồn ở 14%V và 16%V cả hai chủng N^o1; N^o2 bị ức chế.

4. Ảnh hưởng của pH môi trường

pH của môi trường có ảnh hưởng lớn đến lực lên men của men rượu và đến khả năng tạp nhiễm của các vi sinh vật trong quá trình lên men. Chọn được pH thích hợp sẽ tạo điều kiện tăng hiệu suất lên men, với những chủng chịu được pH thấp có thể ứng dụng sản xuất rượu vang lên men từ dịch nước quả. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của pH lên chủng chọn lựa thông qua giá trị độ đường (°Bx) và độ cồn (%V) của dịch nuôi cấy sau 24, 48, 72h. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của pH tới các chủng N^o1; N^o2

pH	Chủng	Độ đường (°Bx)				Độ cồn (%V)			
		0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24h	48 h	72 h
4,0	N ^o 1	20,00	13,00	7,00	4,50	0,00	4,48	8,32	9,92
	N ^o 2	20,00	11,50	5,00	5,00	0,00	5,44	9,60	9,60
5,0	N ^o 1	20,00	16,50	14,00	6,00	0,00	2,24	3,84	8,96
	N ^o 2	20,00	18,00	15,50	6,00	0,00	1,28	2,88	8,96
6,0	N ^o 1	20,00	19,00	18,00	16,00	0,00	0,64	1,28	2,56
	N ^o 2	20,00	19,00	18,00	16,00	0,00	0,64	1,28	2,56

Từ bảng 6 cho thấy trong khoảng pH=4,0 - 5,0 chủng số 1 phát triển tốt nhất, độ đường giảm nhiều nhất từ 20°Bx xuống còn 4,5 °Bx, lượng cồn tạo thành nhiều nhất 9,92%V.

III. KẾT LUẬN

Từ bánh men cổ truyền, chúng tôi đã phân lập được 6 chủng nấm men và thu được một số kết quả sau:

1. Nghiên cứu được một số đặc điểm sinh học của chúng như: đặc điểm hình thái tế bào, khuẩn lạc, khả năng lên men và đồng hoá một số loại đường... và sơ bộ định tên:

Chủng N⁰1 và chủng N⁰2 là *Saccharomyces cerevisiae*.

Chủng N⁰3 là *Pichia farinoza*.

Chủng N⁰4 và chủng N⁰5 là *Saccharomyces vini*.

Chủng N⁰6 là *Endomycopsis fibuliger*.

2. Từ 6 chủng trên chúng tôi chọn ra 2 chủng:

Chủng *Saccharomyces cerevisiae* (N⁰1, N⁰2) có hoạt lực lên men mạnh nhất.

Chủng *Endomycopsis fibuliger* (N⁰6) có khả năng sinh glucoamilaza.

3. Xác định được điều kiện lên men thích hợp nhất cho chủng *Saccharomyces cerevisiae*.

Nhiệt độ: 28-30°C; Nồng độ đường: 200g/l; Khả năng chịu cồn: 10%V; pH: 4-5.

Với kết quả nghiên cứu trên, hi vọng hai chủng *Saccharomyces cerevisiae* và *Endomycopsis fibuliger* sẽ được nghiên cứu tiếp để áp dụng vào công nghiệp sản xuất rượu dùng giống thuần chủng hoặc dùng bánh men cổ truyền nhằm nâng cao hiệu suất và chất lượng rượu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lân Dũng và những người khác, 1972.

Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học tập 1 - Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật, Hà Nội.

2. Vũ Công Hậu, 1982.

Chế rượu vang trái cây trong gia đình - Nhà xuất bản Nông Nghiệp Hà Nội.

3. Trịnh Thị Ngọt, Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn Thị Trọng, 1992.

Thí nghiệm vi sinh vật công nghiệp - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

4. N.X. ÊGÔRÔV (Nguyễn Lân Dũng dịch)

Thực tập vi sinh vật học - Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp Hà Nội.

5. Lương Đức Phẩm, 1998.

Công nghệ vi sinh vật - Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội.

6. J.Lodder, 1971.

The Yeasts, A taxonomic study - North Holland, Pnbl - Co Amsterdam, London.

STUDYING SOME BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND THE
FERMENTATION ABILITY OF SOME STRAINS OF YEASTS ISOLATED
FROM TRADITIONAL YEAST CAKES IN VIET NAM

*Phung Thi Thu Ha, Nguyen The Trang,
Nguyen Thi Hien, Luong Duc Pham*

SUMMARY

*From some kinds of traditional yeast cakes in Viet Nam, 6 strains of yeasts are selected and named as: N^o1, N^o2 is *Saccharomyces cerevisiae*; N^o3 is *Pichia farinoza*; N^o4, N^o5 is *Saccharomyces vini*; N^o6 is *Endomycopsis fibuliger*. From 6 strains are selected 2 strains as: *Saccharomyces cerevisiae* (N^o1, N^o2) has the strongest of alcoholic fermentation; *Endomycopsis fibuliger* (N^o6) extracts glucoamilaza. The optimal conditional of alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* is defined (tempreture: 28 - 30°C; sugar concentration: 200g/l; alcohol concentration: 10%V; pH: 4 - 5). We hope that this result will use for traditional alcoholic industry.*

1.P.11

NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU CHO QUÁ TRÌNH LÊN MEN RƯỢU ETILIC TỪ RỈ ĐƯỜNG MÍA LAM SƠN - THANH HÓA

Chu Kỳ Sơn, Nguyễn Thị Hiền, Lê Thanh Mai
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC PHẨM
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

I. MỞ ĐẦU

Hiện nay với chương trình mía đường quốc gia, nhiều nhà máy đường đã mọc lên ở khắp nơi với năng suất tổng cộng 800.000 tấn đường/năm và thải ra từ 400.000 - 600.000 tấn rỉ đường/năm. Lượng rỉ đường rất lớn này là nguồn nguyên liệu dồi dào cung cấp cho các nhà máy sản xuất rượu cồn. Để có thể tận dụng có hiệu quả lượng rỉ đường nói trên, chúng tôi đi sâu nghiên cứu *các điều kiện tối ưu cho quá trình lên men rượu etilic từ rỉ đường mía Lam Sơn - Thanh Hóa.*

Chúng tôi đã xác định được những điều kiện tối ưu cho quá trình lên men rượu etilic từ rỉ đường mía, thu được dịch lên men có nồng độ rượu cao với hiệu suất cao, do đó, tiết kiệm được chi phí điện hơi cho quá trình chưng cất. Đồng thời, chúng tôi còn nghiên cứu tái sử dụng sữa men để rút ngắn thời gian sản xuất, giảm chi phí lao động và nâng cao hiệu suất thu hồi rượu etilic

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

- Rỉ đường mía lấy từ nhà máy đường Lam Sơn - Thanh Hóa (tháng 8/1998)
- Sử dụng 4 chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong bộ sưu tập giống của bộ môn Công nghệ sinh học thực phẩm trường ĐHBK, được ký hiệu RDI, RD2, RD3, RD4.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác định tổng lượng vi sinh vật có trong rỉ đường [2]
- Xác định sinh khối nấm men bằng phương pháp đo mật độ quang OD [2]
- Xác định khả năng lên men của các chủng [2]
- Xác định lượng rượu etilic: bằng phương pháp chưng cất và xác định nhiệt độ sôi [2,3]
- Xác định hàm lượng đường bằng phương pháp Graxianop [3]

- Xác định hàm lượng nitơ tổng số bằng phương pháp Kjeldahl [3]
- Xác định tổng lượng chất keo có trong rỉ đường [2]
- Sử dụng ma trận thực nghiệm Doehlert để tối ưu hóa quá trình lên men rượu etilic từ rỉ đường với 2 yếu tố ảnh hưởng là hàm lượng men giống (X_1) và nồng độ chất khô của dịch lên men (X_2). Số lần thí nghiệm N với các biến số K được xác định: $N = K^2 + K + 1$.

Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Trong đó: Y là các đại lượng cần xác định, b là các hệ số hồi quy, X là các biến. Các yếu tố ảnh hưởng có khoảng biến đổi như sau:

Các yếu tố	Mức (-1)	Mức 0	Mức (+1)
Hàm lượng men giống (%V)	1	2	3
Nồng độ chất khô (°Bx)	25	30	35

Các đại lượng cần xác định:

- Hàm lượng rượu etilic tạo thành Y_1 , % V
- Hàm lượng đường sót Y_2 , g/100 ml
- Hiệu suất thu hồi rượu so với lý thuyết Y_3 , %

Quá trình tính toán được xử lý bằng máy tính theo chương trình NEMROD (New Efficient Methodology for Research using Optimal Design).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đánh giá chất lượng rỉ đường mía Lam Sơn - Thanh Hóa

Rỉ đường có màu nâu đen, tan tốt trong nước, ít cặn thô. Kết quả xác định một số chỉ tiêu hóa học của rỉ đường mía được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học của rỉ đường mía Lam Sơn - Thanh Hóa

Nồng độ chất khô (%)			Hàm lượng đường tổng %	Hàm lượng đường khử %	Hàm lượng nitơ tổng %	Chất keo %	pH	Độ thuần khiết (%)		
Tỉ trọng kế	Chiết quang kế	Sấy						Tỉ trọng kế	Chiết quang kế	Sấy
81,0	80,3	79,0	58,8	27,4	0,6	3,0	4,47	72,5	73,0	74,4

Kết quả cho thấy rỉ đường mía Lam Sơn có chất lượng tốt. Hàm lượng chất khô cao (81%); hàm lượng đường tổng số cao (58,8%); trong đó hàm lượng đường khử là 27,4%. Hàm lượng nitơ tổng số thấp (0,6%), ngược lại, lượng chất keo chiếm tới 3% trọng lượng rỉ đường.

Để kết hợp định hướng việc xử lý rỉ đường sao cho có lợi nhất, chúng tôi đã tiến hành xác định tổng lượng vi sinh vật nhiễm tạp trong rỉ đường. Kết quả cho thấy mật độ vi sinh vật trong khoảng 900.000 tế bào/g rỉ đường. Như vậy, trạng thái nhiễm tạp vi sinh vật trong rỉ đường Lam Sơn ở mức độ trung bình. Có thể do rỉ đường có nồng độ chất khô cao và pH = 4,47 nên hạn chế nhiều hoạt động của các vi sinh vật nhiễm tạp.

Qua xem xét, nghiên cứu một số phương pháp xử lý rỉ đường, chúng tôi thấy phương pháp axit hóa rỉ đường bằng axit sulfuric tới pH = 4,0 và kết hợp với tác dụng nhiệt ở 90 - 95°C trong 30 - 45 phút là thích hợp nhất. Rỉ đường sau khi lọc sơ bộ và để lắng trong có màu sáng, độ nhớt giảm đáng kể.

2. Tuyển chọn chủng nấm men thích hợp cho quá trình lên men rượu etilic từ rỉ đường

1. Tốc độ sinh trưởng của các chủng

Chúng tôi tiến hành nhân giống 4 chủng trên môi trường nhân giống cấp 2 (nuôi cấy trên máy lắc) sau đó xác định sinh khối thông qua xác định mật độ quang OD ở 630 nm bằng máy đo mật độ quang Jenway 6300.

Như vậy, cả 4 chủng đều có khả năng phát triển tốt tạo lượng sinh khối có chất lượng cao từ 35 - 38 g/l (trong đó chủng loại RD1, RD2 tạo sinh khối nhiều nhất), đủ cung cấp men giống cho quá trình lên men.

Sinh khối nấm men có độ ẩm W = 83%.

2. So sánh khả năng lên men ở các nồng độ đường khác nhau của các chủng

Bảng 2. So sánh khả năng lên men của 4 chủng nấm men

Nồng độ chất khô	Chủng	CO ₂ (g/100ml)	Rượu etilic (% V)	Đường sót (g/100ml)	Hiệu suất thu hồi theo lý thuyết (%)
20°Bx	RD1	6,76	8,31	0,7	89,0
	RD2	6,83	8,44	0,5	90,6
	RD3	6,66	8,20	0,9	88,1
	RD4	6,64	7,95	1,0	85,4
25°Bx	RD1	6,04	7,79	3,9	66,9
	RD2	6,20	7,63	3,9	65,5
	RD3	6,01	7,16	4,6	61,5
	RD4	6,12	7,31	4,5	62,8
30°Bx	RD1	5,30	6,38	8,6	45,7
	RD2	5,33	6,49	8,7	46,4
	RD3	5,10	6,00	9,3	42,9
	RD4	5,20	6,15	9,3	44,0

Chúng tôi tiến hành lên men của các chủng trên các môi trường có nồng độ chất khô ban đầu là 20, 25 và 30°Bx (với hàm lượng đường tương ứng là 144, 180 và 216 g/l) ở nhiệt độ 30°C trong 3 ngày (bảng 2).

Kết quả cho thấy các chủng nấm men chỉ lên men tốt nhất ở nồng độ 20 - 25°Bx. Điều này cũng chứng tỏ tác dụng ức chế của các chất không phải là đường trong rỉ đường là rất lớn. Trên cơ sở đó, các nghiên cứu về sau, khi lên men nên khống chế nồng độ chất khô trong khoảng 20 - 25°Bx. Đồng thời, kết quả bảng 2 cho thấy chủng RD1 và RD2 không những có khả năng lên men mạnh nhất mà còn tạo được hàm lượng cồn cao nhất và lượng đường sót cũng thấp nhất.

3. So sánh khả năng chịu cồn của các chủng

Đây là một chỉ số rất quan trọng, chủng nào có khả năng chịu cồn cao thì khi ứng dụng vào sản xuất sẽ thu được hiệu quả cao nhất 1.

Bảng 3. So sánh khả năng chịu cồn của 4 chủng

Môi trường Chủng	Môi trường có 10% V cồn và nồng độ chất khô 14°Bx				Môi trường có 12% V cồn và nồng độ chất khô 10°+ Bx			
	RD1	RD2	RD3	RD4	RD1	RD2	RD3	RD4
CO ₂ (g/100 ml)	0,21	0,42	0,32	0,69	0,17	0,19	0,20	0,15
Rượu (% V)	10,17	10,42	10,26	10,84	12,19	12,19	12,11	12,02
Đường sót (g/100ml)	3,4	9,0	9,1	8,4	6,6	6,8	6,8	7,0

Bảng 3 cho thấy cả 4 chủng nấm men trên đều có khả năng lên men được ở nồng độ cồn cao tới 10 và 12% V. Chủng RD2 là chủng chịu cồn tốt nhất, có thể hoạt động ở nồng độ cồn tới 12% V.

Kết hợp các kết quả đã phân tích ở trên, chúng tôi kết luận chủng RD2 là chủng có khả năng lên men tốt nhất, chịu được nồng độ chất khô cao nhất và cho hàm lượng cồn lớn nhất trong số 4 chủng đã nghiên cứu. Do vậy, các thí nghiệm nghiên cứu về sau được thực hiện trên chủng RD2.

3. Chọn phương pháp bổ sung rỉ đường thích hợp cho quá trình lên men rượu etilic

Qua các kết quả thu được ở phần trên, chúng tôi thấy các chủng nấm men chỉ hoạt động có hiệu quả cao ở nồng độ chất khô từ 20 - 25°Bx. Nguyên nhân là do các chất phi đường và các hợp chất khác có trong rỉ đường có tác dụng ức chế rất lớn đến hoạt động của tế bào nấm men, làm quá trình lên men chậm, hiệu suất thu hồi cồn sẽ rất thấp. Nhưng nếu pha dần rỉ đường vào thiết bị lên men thì tác dụng ức chế của các chất phi đường có thể giảm đáng kể.

Chúng tôi đã chọn ra 3 phương pháp bổ sung dần rỉ đường trong quá trình lên men sao cho mỗi lần pha nồng độ chất khô của dịch lên men phải nhỏ hơn 25°Bx và nồng độ chất khô tổng số là 30°Bx.

Bảng 4. Các phương pháp bổ sung rỉ đường theo thời gian trong quá trình lên men rượu etilic

Thời gian (h)	Nồng độ rỉ đường bổ sung (°Bx)	Lượng rỉ đường bổ sung (% V)					
		2 lần		3 lần		4 lần	
		Thể tích bổ sung	Lượng dịch	Thể tích bổ sung	Lượng dịch	Thể tích bổ sung	Lượng dịch
0	Men giống	10		10		10	
	Rỉ đường 15°Bx	20	30	20	30	20	30
8	Rỉ đường 30°Bx	20	50	20	50	20	50
32	Rỉ đường 40°Bx	50	100	25	75	20	70
56	Rỉ đường 40°Bx	0	100	25	100	20	90
68	Rỉ đường 40°Bx	0	100	0	100	10	100

Đồng thời với các thí nghiệm trên, chúng tôi làm thêm mẫu kiểm chứng, cho lên men ngay từ đầu với 100% lượng dịch (không bổ sung). Lên men ở nhiệt độ 30°C trong thời gian là 96h.

Bảng 5. So sánh các phương pháp bổ sung rỉ đường

Các chỉ tiêu	Không bổ sung	2 lần	3 lần	4 lần
CO ₂ (g/100ml)	4,52	7,25	7,53	7,56
Cồn (% V)	6,57	9,43	10,34	10,44
Đường sót (g/100ml)	12,7	8,3	7,1	6,8
Hiệu suất (%)	41,0	58,7	64,5	65,1
Tổn thất (%)	7,8	7,8	6,9	7,5

Bảng 5 cho thấy được hiệu quả của việc bổ sung rỉ đường theo thời gian lên men là rất lớn. Các phương pháp pha dần rỉ đường làm tăng 3 - 4% V cồn so với phương pháp không bổ sung rỉ đường, hiệu suất thu hồi rượu etilic cũng cao hơn và lượng đường sót còn lại ít hơn.

Tuy nhiên, so với phương pháp bổ sung 3 và 4 lần, phương pháp bổ sung 2 lần cho hàm lượng cồn thấp hơn và lượng đường sót còn lại nhiều hơn. Như vậy, nếu càng bổ sung rỉ đường làm nhiều lần thì khả năng lên men của các chủng càng tốt hơn. Mặt khác phương pháp bổ sung nhiều lần, nếu không chú ý sẽ dễ bị nhiễm tạp hơn và không có lợi cho việc ứng dụng vào thực tế (tốn thêm chi phí lao động).

Từ các kết quả trên và để phù hợp với điều kiện sản xuất thực tế, chúng tôi chọn phương pháp bổ sung 3 lần.

4. Tối ưu hóa quá trình lên men rượu cồn từ rỉ đường

Mục đích chính của nghiên cứu này là xác định một số yếu tố ảnh hưởng tới quá trình lên men rượu cồn trên môi trường rỉ đường mía Lam Sơn và tối ưu hóa quá trình này.

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng lớn đến quá trình lên men như: nhiệt độ, pH, nồng độ chất khô, thời gian, hàm lượng và chất lượng men giống ... Để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm, chúng tôi chọn hai yếu tố, theo chúng tôi, có ảnh hưởng nhiều nhất tới quá trình lên men là: nồng độ chất khô và hàm lượng men giống còn các yếu tố khác giữ ở mức độ trung bình: $t = 30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 4,7$; thời gian lên men: 96 giờ.

Quá trình lên men được tiến hành theo phương pháp bổ sung rỉ đường 3 lần.

Sau khi xem xét các hệ số hồi quy và các bề mặt đáp ứng, chúng tôi thấy điểm tối ưu của các biến là: hàm lượng men giống $X_1 = 2,5\%$, nồng độ chất khô $X_2 = 27^{\circ}\text{Bx}$.

Trong khoảng đã chọn này, ta vừa có thể thu được dịch lên men có nồng độ cồn cao (tối đa là $10,8\% \text{ V}$), vừa đạt được hiệu suất cao (tối đa 82%). Trên cơ sở này, chúng tôi sẽ chọn các điều kiện thích hợp cho quá trình tái sử dụng sữa men sẽ nói ở phần sau.

5. Nghiên cứu tái sử dụng sữa men

Sau khi kiểm tra nấm men còn lại ở cuối quá trình lên men, chúng tôi thấy tỉ lệ tế bào sống còn khá lớn từ 50 đến 75%, kích thước tế bào không thay đổi lớn. Như vậy, lượng sinh khối này có thể tái sử dụng trong quá trình lên men sau. Nếu lượng sữa men này được tái sử dụng tốt thì một mặt có thể giảm thời gian cho một chu kỳ sản xuất, mặt khác tiết kiệm được chi phí lao động và khả năng nấm men quen với môi trường có nồng độ chất khô cao. Do đó, chúng tôi đề ra quy trình tái sử dụng sữa men như sau: Sau khi lên men xong, gạn lấy phần cặn có chứa nhiều nấm men và mang đi ly tâm, sau đấy rửa bằng nước lạnh vô trùng từ 2 - 3 lần sau đấy ly tâm lại và có thể dùng ngay hoặc bảo quản ở nhiệt độ lạnh. Trước khi sử dụng cho quá trình lên men tiếp theo cần qua quá trình hoạt hóa.

Sau khi xử lý xong, sữa men thu được có chất lượng khá tốt: tỉ lệ tế bào sống từ 85 - 90%, tỉ lệ nảy chồi 40 - 50%. Tiếp theo, nấm men được đưa vào lên men theo phương pháp bổ sung 3 lần với nồng độ chất khô từ 27°Bx và tỉ lệ men giống 2,5% với 2 loại: men giống và men tái sinh. Thời gian lên men là như nhau (4 ngày ở 30°C).

Bảng 6. Nghiên cứu khả năng tái sử dụng sữa men

Các chỉ tiêu	I	II	III
Rượu (% V)	9,85	10,30	10,45
Đường sót (g/100ml)	5,9	5,3	5,0
Hiệu suất (%)	70,0	72,7	73,8
Tổn thất đường (%)	3,5	3,5	3,4

I: 100% sữa men tái sinh; II: 50% sữa men tái sinh + 50% men giống; III: 100% men giống.

Khi tái sử dụng nấm men, nồng độ cồn tạo ra chỉ thấp hơn phương pháp dùng men giống là 0,60% V, hiệu suất đạt tới 70%, còn lại các chỉ số khác là xấp xỉ tương đương nhau. Như vậy, phương pháp tái sử dụng sữa men cho kết quả gần tương đương như sử dụng men giống thông thường. Hơn nữa, phương pháp này có ưu điểm: tiết kiệm được chi phí lao động và rút ngắn chu kỳ sản xuất ở khâu nhân giống (3 ngày).

Đây mới chỉ là những nghiên cứu ban đầu nhưng cũng cho thấy hướng sử dụng nấm men tái sinh sau quá trình lên men rượu là rất khả quan.

IV. KẾT LUẬN

Rỉ mía đường Lam Sơn - Thanh Hóa là loại nguyên liệu có chất lượng tốt, ít bị nhiễm tạp, thích hợp cho quá trình lên men rượu etilic.

Phương pháp bổ sung 3 lần rỉ đường trong quá trình lên men thích hợp cho lên men trên nồng độ chất khô cao, thu được hàm lượng rượu lớn và hiệu suất thu hồi cao. Đã sử dụng ma trận thực nghiệm Doehlert để tối ưu hóa quá trình lên men, với hàm lượng men giống là 2,5% và nồng độ chất khô là 27°Bx cho dịch lên men có hàm lượng cồn đạt tới đa 10,8% V và hiệu suất thu hồi rượu tới đa 82%. Triển vọng tái sử dụng sữa men trong quá trình lên men rượu khá cao, nhằm giúp ngắn thời gian sản xuất, giảm chi phí lao động.

Với những kết quả đã đạt được như trên, chúng tôi hy vọng đề tài này sẽ được ứng dụng có hiệu quả trong chương trình mía đường quốc gia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Giang Thế Bình, 1996.*

Luật án Phó tiến sĩ khoa học kỹ thuật, trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.

2. *Nguyễn Thị Hiền, 1991.*

Phương pháp kiểm tra cần thiết trong sản xuất bia, rượu, nước giải khát, Tổng cục tiêu chuẩn đo lường chất lượng, Hà Nội.

3. Nguyễn Đình Thường, 1976.

Tài liệu thí nghiệm chuyên ngành lên men, trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.

4. Jean - Paul Larpen, 1991.

Biotechnologie des levures, Masson.

5. PRAJ FAR EAST PTE LTD - Alcohol plant and equipment, published by PRAJ, 101 Thomson Road 24 - 02, United Square, Singapore, 1998.

**STUDY OF SOME OPTIMAL TECHNICAL CONDITIONS FOR THE ALCOHOL
FERMENTATION FROM LAMSON CANE MOLASSES**

Chu Ky Son, Nguyễn Thị Hien, Lê Thanh Mai

SUMMARY

In this research, some optimal technical condition for fermentation of alcohol from Lam Son cane molasses have been investigated as follows:

- Determination of main composition and microbial contamination of this cane molasses.*
- Selection of the most suitable strain of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* for alcohol fermentation (RD2).*
- Study of suitable method for fermentation by using Doehlert matrix of experiments to find out: suitable concentration of yeast milk for inoculation (2,5%) and suitable concentration of total dry matter (27°Bx).*
- Essay of reusing of the yeasts after first alcohol fermentation for the next fermentation.*

1.P.12

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG *Saccharomyces cerevisiae* VÀ VI KHUẨN LACTIC TRONG SẢN XUẤT ĐỒ UỐNG CÓ ĐỘ CỒN THẤP

Nguyễn La Anh, Vũ Quỳnh Hương, Nguyễn Thị Lộc,
Đinh Mỹ Hằng, Nguyễn Thị Hương Giang, Đặng Thị Hoà Bình.
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

Sự kết hợp giữa *Saccharomyces cerevisiae* và vi khuẩn lactic được biết đến trong nhiều quá trình lên men trong công nghiệp thực phẩm như sự lên men malolactic trong giai đoạn tăng trưởng của sản xuất rượu vang, sam-panh và xirô. Tuy nhiên người ta còn biết đến công nghệ sản xuất một loại đồ uống nhẹ độ cồn bằng cách lên men trực tiếp bởi hỗn hợp nấm men và vi khuẩn lactic. Loại đồ uống này có xuất xứ là nước cvas của nước Nga. Nguyên liệu để sản xuất cvas là đại mạch và lúa mạch đen nảy mầm, bột mạch đen, đường và nước. Dưới tác dụng của các enzym xitaza, proteaza và amilaza của các hạt nảy mầm, người ta thu được dịch cvas. Sau đó dùng hỗn hợp *S. cerevisiae* (có thể là các chủng M, 131- K, C-2, Steiberg-6...) và vi khuẩn lactic dị men β - bacterium 11 và 13 để lên men không hoàn toàn dịch này; sản phẩm thu được có nồng độ cồn thấp hơn 1.2%, axit lactic, axit axetic, ngoài ra etylaxetat và diaxetyl tạo cho sản phẩm có hương và vị hài hoà (Malsev P.M. et al., 1970).

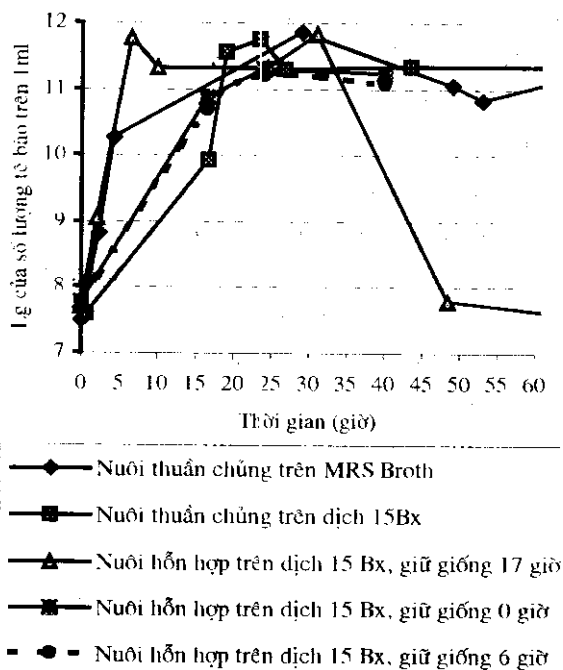
Tuy nhiên quá trình vi sinh vật của sản xuất cvas ít được nghiên cứu (Kvasnicov E.I. et al, 1991). Viện Công nghệ thực phẩm đang tiến hành nghiên cứu một loại sản phẩm tương tự bằng cách lên men hỗn hợp dịch từ dịch chiết đại mạch, dịch thủy phân gạo và nếp cẩm, xirô đường. Quá trình chọn giống đã được tiến hành nhằm nhận được một loại đồ uống có hương vị dễ chịu. Việc nghiên cứu quá trình vi sinh vật của sản phẩm này là cần thiết. Để hiểu rõ sự tương tác của *S. cerevisiae* và vi khuẩn lactic, sự phát triển của chúng được theo dõi khi nuôi riêng rẽ và nuôi hỗn hợp.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

- Chủng vi sinh vật được sử dụng: *S. cerevisiae* 7072; chủng vi khuẩn *Lactobacillus* BC-5-1 dị men, chưa định tên, được phân lập từ sản phẩm thực vật lên men. Những chủng này được giữ tại bộ sưu tập của Viện Công nghiệp Thực phẩm.

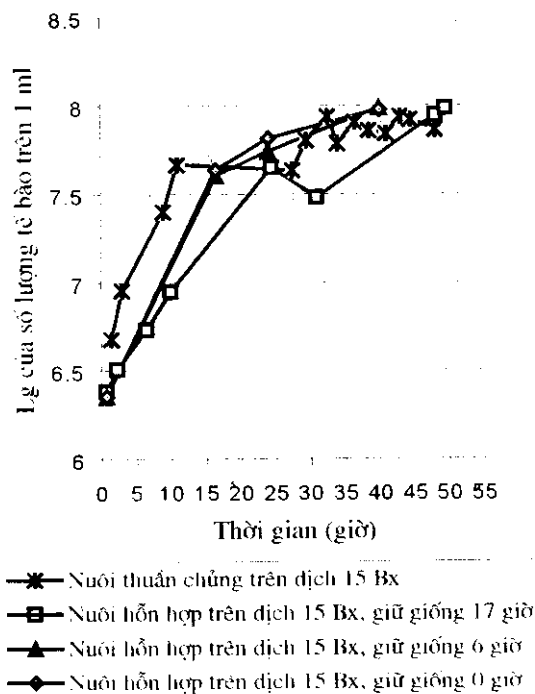
- Dịch hỗn hợp 15°Bx, gồm nước chiết malt, nước thủy phân gạo và nếp cẩm và xirô đường dùng để lên men.
- Dịch MRS broth để nuôi chủng *Lactobacillus* BC-5-1.
- Số lượng nấm men được xác định bằng buồng đếm Goreava.
- Số lượng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp cấy rải trên đĩa petri MRS agar có bổ sung 0,4 g/l axit sorbic để ức chế nấm men mọc.
- Tiến hành thí nghiệm: Các thí nghiệm sau tiến hành song song ở 28°C:
 - + Vi khuẩn lactic được nuôi cấy riêng trên môi trường MRS broth và dịch 15°Bx.
 - + Nấm men được nuôi cấy riêng trên dịch 15°Bx.
 - + Vi khuẩn lactic và nấm men được nuôi chung trên dịch 15°Bx. Giống nấm men và vi khuẩn được nuôi cấy riêng rẽ rồi trộn hỗn hợp với nhau. Hỗn hợp giống được giữ với các khoảng thời gian khác nhau 0; 6; 17 giờ trước khi được cấy vào dịch 15°Bx để theo dõi sự ảnh hưởng của thời gian giữ giống hỗn hợp đến sự phát triển của từng chủng vi sinh vật. Nồng độ ban đầu của nấm men là 10^6 tế bào/ml, của vi khuẩn là 10^7 tế bào/ml.

II. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN



Hình 1. Sự phát triển của vi khuẩn Lactic

Từ hình 1 cho thấy lúc đầu vi khuẩn lactic phát triển trên môi trường MRS broth và dịch 15°Bx tương tự nhau. Tuy nhiên, có thể do môi trường MRS broth giàu dinh dưỡng hơn nên số lượng vi khuẩn trên môi trường này chỉ bắt đầu giảm sau ngày thứ 6, còn trên môi trường 15°Bx là sau ngày thứ 5 (kết quả không biểu diễn trên đồ thị). Mặt khác, trong nuôi cấy hỗn hợp vi khuẩn lactic lại phát triển nhanh hơn so với khi nuôi riêng. Kết quả tương tự cũng thấy ở các tác giả khác (Young G. et al., 1956; Lemauresquier H. et al., 1987). Điều này có thể giải thích là sự tiết ra vitamin của nấm men đã kích thích vi khuẩn phát triển. Tuy nhiên, trong lên men hỗn hợp, sau ngày thứ 2, số lượng tế bào vi khuẩn giảm đáng kể, có lẽ do ảnh hưởng của hàm lượng cồn được tích lũy trong dịch.



Hình 2. Sự phát triển của *S. cerevisiae*

Nhìn chung *S. cerevisiae* và vi khuẩn lactic đã thể hiện sự tương tác đáng kể khi nuôi cấy hỗn hợp. Vi khuẩn ức chế sự phát triển lúc đầu của nấm men và nấm men làm vi khuẩn chết nhanh hơn. King S.W. et al., 1986 lại tìm thấy hiện tượng ngược lại trong lên men malo-lactic khi mà nấm men ức chế sự phát triển lúc đầu của vi khuẩn và sự phát triển của vi khuẩn lại làm nấm men chết sớm hơn. Điều này có thể giải thích là các chủng vi sinh vật khác nhau trong các điều kiện lên men khác nhau có các phản ứng khác nhau.

Nhiệm vụ tiếp theo của chúng tôi là nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển chung của cả hai chủng và chất lượng của sản phẩm như etanol, axit lactic, axit axetic và hợp chất tạo hương như diacetyl, etylacetat.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Herrero M., C. de la Roza, Garcia L.A., Diaz M., 1999.

Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 22, 48- 51.

Từ hình 2 cho thấy *S. cerevisiae* nuôi cấy một mình phát triển với tốc độ cao hơn so với nuôi cấy hỗn hợp trong pha logarit. Kết quả tương tự cũng thấy ở thí nghiệm của Herrero M. et al., 1999. Mặc dù kháng sinh và chất giống kháng sinh được sinh ra bởi vi khuẩn lactic nói chung và vi khuẩn lactic dị men nói riêng là phổ biến (Vandevoorde L. et al., 1992) nhưng nấm men có vẻ không bị ức chế bởi yếu tố này do sự bền vững của nấm men khá lâu trong pha ổn định. Hiện tượng này có thể giải thích bằng sự tranh giành thức ăn giữa hai chủng vi sinh vật để phát triển. Với thời gian giữ giống 17 giờ, nấm men trong nuôi cấy hỗn hợp phát triển chậm hơn cả, còn ở thời gian giữ giống 0 giờ và 6 giờ, nấm men phát triển với tốc độ bằng nhau và ở mức trung bình. Tuy nhiên ở pha ổn định, ở các thí nghiệm, số lượng tế bào nấm men đều xấp xỉ nhau. Nguyên nhân ảnh hưởng của vi khuẩn đến nấm men theo thời gian giữ hỗn hợp giống còn cần được nghiên cứu và làm rõ thêm.

2. Kvasnicov E.I., Shelocova I.F., 1991.

Drogi: Biologia: puti ispolsovania. Izd.: Kiev naukova dumca, 224- 225.

3. King S.W. and Beelman R.B., 1986

Metabolic Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a Model Grape juice/ wine system. Am. J. Enol. Vitic., 37, 53-60.

4. Lemaresquier H., 1987.

Inter- relationships between strains of *Sacchchromyces cerevisiae* from the champagne area and lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol., 4, 91- 94.

5. Malsev P. M., Zazirnaia M.V., 1970.

Tekhnologia bezalcogolnuc i slaboalcogolnuc napitcov. Izd.: Pischevaia promushlenost, M., 304-311.

6. Vandevoorde L. et al., 1992

Critical Factors governing the competitive behavior of lactic acid bacteria in mixed culture.- in The lactic acid Bacteria, Vol 1, Brian J.B. Wood. Elsevier applied science, London and New York, 447-475.

7. Young G., Krasner R.I. and Yudkofsky P.L., 1956.

Interations of oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. Journal of Bacteriology, 72, 525-529.

1.P.13

MỘT SỐ KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU TRONG NGHIÊN CỨU NẤM MEN SINH KILLER TOXIN

Vũ Nguyên Thành, Đào Anh Hải

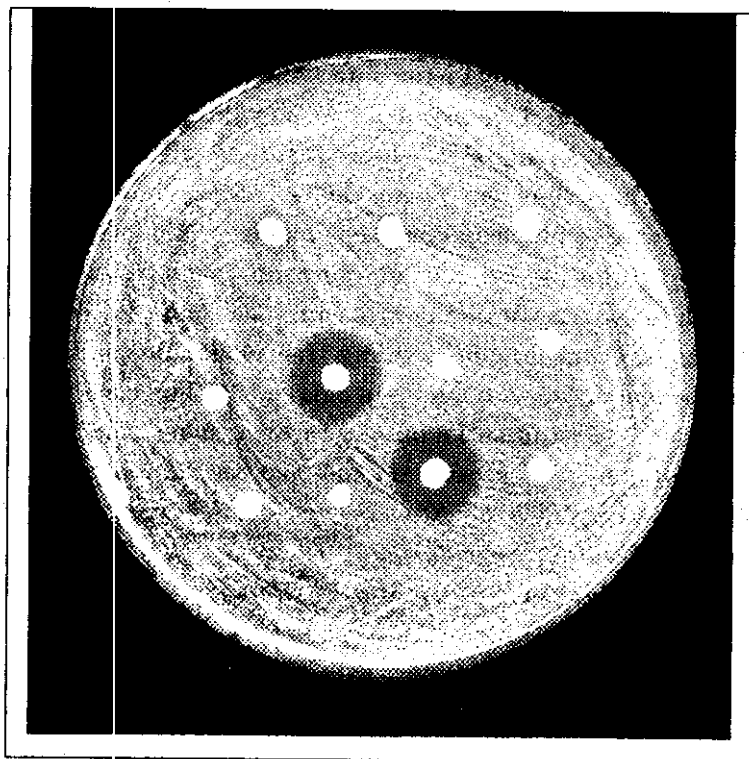
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

TEL: 858-3450 FAX: 858-4554 E-MAIL: Thanh@firi.ac.vn

Lần đầu tiên vào năm 1963, khả năng sinh kháng sinh của một số chủng nấm men chống lại các chủng cùng loài được biết đến. Những chủng nấm men này được gọi là "nấm men killer", còn chất kháng sinh - killer toxin hay zymocin. Trong đa số trường hợp killer toxin có phổ hoạt động hẹp, chúng chỉ diệt những chủng có họ hàng gần. Tuy nhiên, một số killer toxin có phổ hoạt động chống nấm và nấm men tương đối rộng hơn. Killer toxin thường là các protein hay glucoprotein có khả năng tương tác với các receptor trên thành tế bào của các chủng mẫn cảm. Tác động của killer toxin lên tế bào mẫn cảm có thể là tạo thành những lỗ thủng trên màng phospholipid dẫn tới sự phá huỷ cân bằng ion hoặc ngừng chu trình phân chia tế bào bằng cách ức chế tạm thời quá trình tổng hợp ADN. Ngay sau sự khám phá ra hiện tượng killer ở *S. cerevisiae*, đặc tính này đã được chứng minh là có tồn tại ở một loạt các nấm men khác. Những chủng đó thuộc các chi sau: *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Sporidiobolus*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* (Schmitt & Neuhausen, 1994; Magliani, 1997; Vondrejs & Palkova 1997). Hệ killer trong *S. cerevisiae* được nghiên cứu kỹ nhất. Khả năng killer của *S. cerevisiae* có liên quan tới sự tồn tại của dsARN virus trong nguyên sinh chất. Hệ gen virus này chứa hai loại dsARN là L-A và M. L-A (4.6 Kb) mã hoá 76 KDa protein vỏ. M dsARN mang thông tin của killer toxin và yếu tố quyết định tính kháng killer của bản thân tế bào chủ. Cả hai dsARN được đóng gói riêng rẽ bởi vỏ protein trên và tồn tại dưới dạng hạt virus. Hệ killer của *K. lactis* liên quan tới hai dsADN có khả năng biến nạp và thể hiện trong nấm men của một số chi khác. Trong các trường hợp còn lại đặc tính killer hoặc xác định bởi dsARN, hoặc còn chưa được nghiên cứu, hoặc được giả thiết là mã hoá bởi gen trong nhiễm sắc thể.

Nấm men killer hứa hẹn mang lại cho y học những loại kháng sinh chống nấm hiệu quả. Trong công nghệ sinh học chúng chứa một nguồn vector thể hiện hữu hiệu. Killer toxin có thể ứng dụng trong bảo quản thực phẩm, và trong công nghệ lên men. Mục tiêu lâu dài của chúng tôi là nghiên cứu hiện tượng killer của nấm men nhằm tìm ra những giải pháp cải tạo các chủng nấm men công nghiệp cũng như ứng dụng killer toxin trong bảo quản đồ uống có độ đường cao. Báo cáo này trình bày một số kết quả ban đầu của nghiên cứu trên.

Các chủng nấm men phục vụ nghiên cứu có nhiều nguồn gốc khác nhau. Một số chủng được cung cấp từ các bộ sưu tập giống chuẩn (CBS, VKM, KBP). Những chủng còn lại do chúng tôi phân lập. Các chủng này được phân loại dựa theo đặc điểm hình thái, khả năng sử dụng các nguồn cacbon, nitơ và định tên theo khoá phân loại chuẩn (Barnett et al. 1990). Giống được giữ trên môi trường nước chiết malt Bx=2 và thạch. Để thử tương tác killer môi trường malt-thạch chứa 0.05 M đệm citrate-phosphat pH 4.5 được sử dụng. Chủng tạm coi là mẫn cảm (chủng nền) được cấy trên bề mặt với mật độ xấp xỉ $10^5 - 10^6$ tế bào/hộp Petri sau đó một vòng que cấy chủng thử được cấy tiếp lên bề mặt. Khả năng sinh killer được xác định bằng sự hình thành vòng vô khuẩn quanh chủng thử sau 1-2 ngày ở nhiệt độ 28 °C (hình 1).



Hình 1. Vòng vô khuẩn tạo bởi *Torulaspora delbrueckii* G-361.7 (trên) và G-348.11.1 (dưới) trên nền *Pichia onychis* G-387. Môi trường malt-agar chứa 0.05M đệm citrate-phosphat pH 4.5

Để phân nào hiểu thêm về cơ chế tương tác của nấm men trong quá trình lên men tự nhiên của dịch quả dâu *Morus alba* các chủng đại diện được thử khả năng sinh killer toxin. Môi trường mô phỏng dịch quả dâu với thành phần: nước chiết malt 3Bx, gluco 9%, đệm 0.5 M citrate-phosphat pH 3.17, thạch 2% được sử dụng. Sau khi kiểm tra chéo 13 chủng nền và 44 chủng thử có 28 cặp killer-mẫn cảm được phát hiện (4.9% số cặp thử là dương tính) (bảng 1). Đáng chú ý là chủng *Kloeckera* sp (MW-14) có khả năng sinh killer rất mạnh chống lại các chủng *Kloeckera* khác. Tất cả 5 chủng nền *Kloeckera* đều bị tác động bởi chủng nói trên (bảng 1, 2). Như chúng ta đã biết *Kloeckera* là loại nấm men phổ biến trong giai đoạn đầu của quá trình lên men dịch các loại quả. *Kloeckera* gây ảnh hưởng lớn đến chất lượng rượu vang và vì vậy dịch quả

thường được sulphit hoá chống lại chúng. Khả năng áp dụng các chủng nấm men công nghiệp có khả năng diệt *Kloeckera* sẽ rất có ý nghĩa. ở pha sinh sản hữu tính, *Kloeckera* còn được gọi là *Hanseniaspora*. Killer virus ở *Hanseniaspora* tồn tại dưới dạng dsARN. Những virus này có thể phát triển và thể hiện trong tế bào chủ *S. cerevisiae*.

Tất cả năm chủng *Saccharomyces* dương tính có phổ killer trùng nhau (bảng 1). Chúng diệt được các chủng *Candida* sp. "white", loại nấm men phổ biến phát triển trước *Saccharomyces* trong quá trình lên men tự nhiên của quả dâu. Điều này giải thích được phần nào diễn biến thay đổi các loài trong quá trình nói trên.

Trên 60 chủng nấm men từ bộ sưu tập giống cũng được thử khả năng sinh killer chống lại 1 chủng *Saccharomyces cerevisiae* mẫn cảm. Hai chủng killer là *Torulaspora delbrueckii* G-361.7 và G-348.11.1 được phát hiện. Những chủng này cùng các chủng MW-4, MW-14, MW-19, MW-180 sau đó được thử khả năng chống 35 chủng đại diện cho 35 loài từ bộ sưu tập. Những kết quả dương tính được trình bày ở bảng 2. Hai chủng G-361.7 và G-348.11.1 có phổ killer khá rộng và mạnh (bảng 2; hình 1). G-361.7 và G-348.11.1 được phân lập từ ruột của loài cuốn chiếu *Pachyiulus flavipes*. Trái với *Torulaspora delbrueckii* killer toxin của *Kloeckera* mang tính đặc hiệu cao, trong tất cả 35 loài làm nền *Kloeckera* W-14 chỉ diệt *Kloeckera lindneri*.

Đề tài nghiên cứu về nấm men killer sẽ được tiếp tục. Những hướng phát triển tiếp theo của chúng tôi sẽ bao gồm: tiếp tục tìm kiếm các chủng sinh killer, xác định đặc điểm và yếu tố di truyền của killer toxin tìm được, chuyển đặc tính killer quan tâm sang *Saccharomyces cerevisiae*.

Bảng 1. Khả năng sinh killer toxin của các chủng nấm men phân lập từ dịch quả dâu *Morus alba*

Chủng Killer	Chủng mẫn cảm									
	MW 14 KI	MW 28 KI	MW 37 KI	MW 57 KI	MW 68 KI	MW 87 Cbr	MW 76 Cw	MW 90 Cw	MW 97 Cw	MW 88 Sac
MW 19 C.sp	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+++
MW 4	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MW 14 KI	-	+++	+++	++	+++	-	+	+	-	-
MW 28 KI	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
MW 88 Sac	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
MW 168 Sac	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
MW 175 Sac	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
MW 180 Sac	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
MW 190 Sac	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-

Ghi chú: Mức độ ức chế được thể hiện bằng dấu "+"; Dấu "-" - không có phản ứng;
Csp - *Candida* sp.; Sac - *Saccharomyces* sp.; KI - *Kloeckera* sp.;
Cbr - *Candida* sp. "brown"; Cw - *Candida* sp. "white"

Bảng 2. Phổ killer của một số chủng từ bộ sưu tập giống và từ quả dâu

Chủng killer	Chủng mẫn cảm					
	G 387 <i>Pichia</i> <i>Onychis</i>	CBS 6422 <i>Candida</i> <i>quercuum</i>	KBP 3364 <i>Yarrowia</i> <i>lipolitica</i>	G 167 <i>Zygowilliopsis</i> <i>Californicus</i>	G 392 <i>Kloeckera</i> <i>lindneri</i>	G 95.2 <i>Schizobl.</i> <i>starkeyi-</i> <i>henricii</i>
G 361.7	++++	++++	++	+	-	+++
G 348.11.1	++++	++++	++	+	-	+++
MW 14 KI	-	-	-	-	++	-
MW 19 Csp	-	-	+	-	-	-
MW 4	-	-	-	-	+	-

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., 1990.
Yeasts: characteristics and identification, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, New York.
2. Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., & Polonelli L., 1997.
Yeast killer systems. Clinical Microbiology Review, v.10, p. 369-400.
3. Schmitt M.J., & Newhausen F., 1994.
Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeast *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. Journal of Virology, v. 68, p. 1765-1772.
4. Vondrejs V., & Palkova Z., 1997.
Chapter 9. Chemical warfare among the yeasts: the "killer" phenomenon, genetics and applications. In: J.F.T. Spencer & D.M. Spencer (eds) Yeast in natural and artificial habitats. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1997.

A PRELIMINARY STUDY ON KILLER YEASTS

Vu Nguyen Thanh, Dao Anh Hai

SUMMARY

The killer phenomenon was studied in order to improve the industrial yeasts used in fermentation technology. A preliminary screening study for killer yeast was presented. Yeasts were isolated at different stages during natural fermentation of

mulberries. They were cross-tested for selection of killer active strains. A number of collection strains was also employed. It was shown that around 5% of possible crosses were killer positive. From around 100 strains tested 2 strains of Kloeckera, 5 of Saccharomyces, 1 of Candida, 2 of Torulaspora delbrueckii, and 1 of an unidentified yeast were found to be killer. All Saccharomyces strains had the same killing profile. Two strains of Torulaspora delbrueckii showed wide killer spectrum toward sensitive ones. A strain of Kloeckera had very strong killer reaction against all 5 tested Kloeckera strains. The strain was thought to be a promising candidate as killer donor for industrial yeast in winemaking.

1.P.14

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ SỬ DỤNG VACCIN NHƯỢC ĐỘC ĐA GIÁ PHÒNG CHỐNG 4 BỆNH ĐỎ CỦA LỢN

*Phan Thanh Phương⁽¹⁾, Nguyễn Ngã⁽²⁾, Trương Văn Dung⁽¹⁾,
Nguyễn Thị Phương Duyên⁽²⁾, Lê Lập⁽²⁾, Nguyễn Thiên Thu⁽²⁾*

(1) : VIỆN THỦ Y QUỐC GIA HÀ NỘI

(2) : PHÂN VIỆN THỦ Y MIỀN TRUNG, NHA TRANG

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở nước ta, để nâng cao năng suất chăn nuôi lợn, cần phải phòng chống dịch bệnh có hiệu quả đối với 4 bệnh quan trọng, mà ở ta thường gọi là 4 bệnh đỏ: bệnh dịch tả lợn (DTL), bệnh Tụ huyết trùng (THT) bệnh Phó thương hàn (PTH) và bệnh đóng dấu lợn (DDL).

Để giảm nhẹ chi phí tiêm phòng, giảm nhẹ sức lao động của người dân, đồng thời nâng cao hiệu lực vaccin lên hơn các vaccin đơn hiện dùng, cần nghiên cứu chế tạo một vaccin nhược độc đa giá một mũi tiêm phòng được 4 bệnh đỏ của lợn. Đây chính là mục đích của công trình nghiên cứu này.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU CHỦ YẾU

- Virut DTL chủng C
- Vi khuẩn nhược độc Tụ huyết lợn chủng Av PS₁
- Vi khuẩn nhược độc đóng dấu lợn chủng VR₂
- Vi khuẩn nhược độc PTH chủng Smith
- Chuột bạch, thỏ, chuột lang và lợn đạt tiêu chuẩn thí nghiệm.

III. NHỮNG KẾT QUẢ CHỦ YẾU ĐÃ ĐẠT ĐƯỢC

1. Chế tạo vaccin

Nghiên cứu chế độ tối ưu để phối hợp 3 chủng vi khuẩn và 1 chủng virut, không dùng kháng sinh, nhưng dùng chất phụ gia thích hợp và tiến hành đông khô ngay sau khi phối hợp các vi sinh vật (VSV) với các tỷ lệ thích hợp và hiệu quả

2. Kiểm tra sau khi đông khô

Kiểm tra số VSV còn sống và kiểm tra phản ứng nhiệt trên thỏ sau khi đông khô vaccin

Kết quả kiểm tra: Một liều vaccin phải có:

$2,5 \times 10^9$ vi khuẩn PTH

$0,2 \times 10^9$ vi khuẩn THT

$0,2 \times 10^9$ vi khuẩn đóng dấu lợn

Riêng DTL kiểm tra phản ứng nhiệt đặc trưng.

Chú ý: Khi kiểm tra phản ứng nhiệt dùng kháng sinh mẫn cảm (làm kháng sinh đồ chọn gentamycin) để giết chết 3 loại vi khuẩn rồi mới tiêm cho thử.

3. Kiểm nghiệm vaccin đã chế tạo (vaccin được đặt tên là CNSH-97)

1. Thuần khiết

Dựa vào TCVN để kiểm tra. Vaccin không có tạp khuẩn và nấm, chỉ mọc 3 loại vi khuẩn có trong vaccin. Nếu có tạp khuẩn lô vaccin bị loại bỏ.

2. An toàn

- Trên chuột lang: Mỗi lô tiêm 3 chuột lang liều bằng 3/5 liều vaccin dùng cho lợn vào dưới da. Kết quả theo dõi 7 ngày, các lô vaccin đều đạt tiêu chuẩn an toàn không giết chết chuột lang, chúng phát triển bình thường, không có các phản ứng phụ.
- Trên lợn: Mỗi lô tiêm cho 2 lợn cai sữa, liều gấp đôi liều quy định sử dụng vào dưới da. Theo dõi 21 ngày. Kết quả các lô vaccin đạt an toàn, lợn khỏe mạnh, không sốt, không bỏ ăn.

3. Hiệu lực

Đã tiến hành kiểm tra hiệu lực 3 lô vaccin (lô 1, 4 và 6). Kiểm tra hiệu lực vaccin CNSH-97 đối với THT và ĐDL, tiến hành trên chuột bạch. Mỗi lô tiêm cho 20 chuột bạch vào dưới da liều bằng 1/10 liều dùng cho lợn. Qua 14 ngày sau tiêm vaccin tiến hành công cường độc. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy đối với THT hiệu lực vaccin đạt khá cao, hai lô tỷ lệ bảo hộ đạt 90%, 1 lô - 70%. Còn đối với đóng dấu lợn tỷ lệ bảo hộ đạt từ 70-80%.

Kiểm tra hiệu lực vaccin CNSH-97 đối với phó thương hàn: Tiến hành trên chuột lang. Mỗi lô tiêm 5 chuột lang vào dưới da bằng 1/5 liều dùng cho lợn. Qua 14 ngày sau tiêm vaccin tiến hành công cường độc bằng vi khuẩn phó thương hàn chủng S_2 với liều 1MLD. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Kết quả bảng 2 cho thấy hiệu lực vaccin CNSH-97 đối với phó thương hàn đạt khá cao từ 80-100%.

Kiểm tra hiệu lực vaccin CNSH-97 đối với dịch tả lợn: Được tiến hành trên thử. Lấy vaccin CNSH-97 pha để tiêm. Trước khi tiêm được sử lý bằng kháng sinh gentamycin (qua kết quả kháng sinh đồ) để diệt 3 loại vi khuẩn trong vaccin. Mỗi lô vaccin được tiêm vào tĩnh mạch tai cho ba thử bằng liều 1/50 liều dùng cho lợn. Tất cả thử đều có phản ứng nhiệt đặc trưng cho dịch tả lợn. Chứng tỏ vaccin CNSH-97 đạt hiệu lực cao đối với bệnh dịch tả lợn.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra hiệu lực đối với THT và ĐDL trong vaccin CNSH-97 trên chuột bạch

Lô vaccin	Lô chuột bạch	Đối với tụ huyết trùng			Đối với đóng dấu lợn		
		Liều MLD chủng FgHC	Sống/ chết	Tỷ lệ bảo hộ %	Liều MLD chủng E37, E65, E67 và E80	Sống/ chết	Tỷ lệ bảo hộ %
1	TN	1	9/10	90	1000	8/10	80
	ĐC	1	0/5	0	10	0/5	0
4	TN	1	7/10	70	1000	7/10	70
	ĐC	1	0/5	0	10	0/5	0
6	TN	1	9/10	90	1000	7/10	80
	ĐC	1	0/5	0	10	0/5	0

Bảng 2. Kết quả kiểm tra hiệu lực đối với phó thương hàn trong vaccin CNSH-97 trên chuột lang

Lô vaccin	Lô chuột lang	Liều MLD công cường độc chủng S ₂	Chuột sống/ Chuột chết	Tỷ lệ bảo hộ %
1	Thí nghiệm	1	4/5	80
	Đối chứng	1	0/5	0
4	Thí nghiệm	1	4/5	80
	Đối chứng	1	0/5	0
6	Thí nghiệm	1	5/5	100
	Đối chứng	1	0/5	0

4. Kiểm tra hiệu lực vaccin nhược độc CNSH-97 khu vực

Đã phối hợp cùng trường Đại học Hồng Đức Thanh Hoá, đã tiến hành bố trí thử nghiệm 3 lô vaccin nhược độc đa giá tại Hoàng Hoá, Thanh Hoá. Tiêm đại trà cho 300 lợn cai sữa lứa tuổi từ 45 đến 110 ngày tuổi và 5 lợn nái, trong đó có 2 lợn nái chửa.

Sau khi tiêm vaccin nhược độc đa giá cho lợn theo sơ đồ trên đến ngày thứ 21 lấy máu để kiểm tra hiệu giá kháng thể (HGKT) kháng 3 bệnh: THT, ĐDL và PTH bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu gián tiếp. Riêng kiểm tra hiệu lực vaccin kháng bệnh DTL đã tiến hành trên thỏ.

1. Kiểm tra hiệu lực miễn dịch đối với PTH, THT và ĐDL

Đối với kháng nguyên PTH hiệu giá kháng thể đạt khá cao, có cá thể đạt đến 1/128 và 1/256. Để đánh giá được sự khác nhau giữa 3 lô vaccin chúng tôi đã tiến hành xác định hệ số miễn dịch và thấy rằng hệ số miễn dịch ở lô 1 là cao nhất, sau đó đến lô 2 và thấp hơn cả là lô 3. Cũng bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu gián tiếp đã xác định hiệu giá kháng thể kháng THT, số cá thể đạt hiệu giá kháng thể 1/28 và 1/256 nhiều hơn và chỉ số miễn dịch (CSMD) đạt khá cao. So sánh 3 lô vaccin, CSMD đạt cao nhất ở lô 1 vaccin đạt 19,91 sau đó là lô 3 đạt 16,64 và cuối cùng là lô 2 đạt 15,78. Hai lô sau có CSMD gần như bằng nhau. Phân tích kết quả cho thấy HGKT kháng ĐDL có yếu hơn HGKT kháng 2 kháng nguyên trước, HGKT cao nhất là 1/64 và chỉ có ít cá thể đạt được mà thôi. CSMD của 3 nhóm cho thấy đáp ứng miễn dịch ở nhóm 1 cao nhất (đạt 11,42), còn nhóm 2 cũng cho CSMD gần bằng nhóm 1 (11,16). Và thấp nhất là lô vaccin 3 (8,63).

2. Kiểm tra hiệu lực vaccin đa giá nhược độc đối với bệnh DTL

Mỗi lô vaccin được tiêm cho 3 thỏ, còn lô đối chứng có 3 thỏ được tiêm 1 ml/con nước sinh lý mặn dùng để pha vaccin, tiêm vào tĩnh mạch tai. Tiêm vaccin cũng vào tĩnh mạch tai với liều 1ml/con. Tiêm từ từ tránh thỏ bị sốc. Sau đó phải theo dõi thân nhiệt của thỏ trong vòng 96 giờ sau tiêm. Từ 24 giờ sau tiêm trở đi cứ 6 giờ đo nhiệt độ một lần. Kết quả cho thấy thân nhiệt ở thỏ diễn biến rất đặc trưng. Chứng tỏ vaccin có một hiệu lực miễn dịch cao.

5. Vaccin nhược độc đa giá CNSH - 97 phòng chống 4 bệnh đỏ của lợn được thực nghiệm trong sản xuất

Đã sử dụng 40.000 liều tại: Thừa Thiên Huế, Ninh Thuận, Thái Bình, Thanh Hoá. Vaccin tỏ ra an toàn và hiệu lực đạt yêu cầu cao.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã chế tạo thành công vaccin nhược độc đa giá phòng chống 4 bệnh đỏ của lợn, được đặt tên là CNSH-97. Vaccin này đạt thuần khiết an toàn và hiệu lực trong phòng thí nghiệm.
2. Đã xây dựng được 3 quy trình chế tạo, kiểm nghiệm và sử dụng vaccin CNSH-97 và 4 sản phẩm vaccin khác nhau:
 - Vaccin tứ liên một mũi phòng chống 4 bệnh đỏ DTL, ĐDL, THT và PTH.
 - Vaccin tam liên một mũi phòng chống 3 bệnh DTL, ĐDL và THT.
 - Vaccin tam liên một mũi phòng chống 3 bệnh DTL, THT và PTH.
 - Vaccin nhị liên 1 mũi tiêm phòng được hai bệnh DTL và PTH lợn.
3. Đã thực nghiệm khu vực trên 300 lợn tại Hoàng Hoá Thanh Hoá. Sau khi tiêm vaccin CNSH-97 ở lợn có một đáp ứng miễn dịch cao, qua 9 tháng đều không có dịch của 4 bệnh DTL, ĐDL, PTH và THT, trong lúc đó một số vùng giáp danh có dịch gây chết 18% số con bị bệnh.

- Đối với bệnh Phó thương hàn (PTH) HGKT đạt đến 1/128 và 1/256 và chỉ số miễn dịch (CSMD) của 3 lô vaccin đạt từ 7,85 ; 9,21 và 15,56.
- Đối với bệnh Tụ huyết trùng (THT) HGKT đạt 1/128 đến 1/256 và CSMD của 3 lô đạt khá cao: 15,78 ; 16,64 và 19,91.
- Đối với bệnh Đóng dấu lợn (DDL) HGKT đạt cao nhất 1/64, CSMD của 3 lô vaccin đạt 8,63 ; 11,16 và 11,42.

So với đối chứng thì HGKT và CSMD ở 3 lô miễn dịch đạt cao hơn hẳn lô đối chứng ($P < 0,01$).

Phản ứng nhiệt của thỏ đối với virus nhược độc DTL trong vaccin CNSH-97 khá điển hình đạt yêu cầu khi đánh giá hiệu lực của một vaccin.

4. Đã thử nghiệm tại Thừa Thiên Huế, Ninh Thuận, Thái Bình, Thanh Hoá vào khoảng 40.000 liều cho thấy vaccin CNSH-97 có độ an toàn cao, có hiệu lực bảo đảm, đồng thời giảm chi phí tiêm phòng từ 15 - 25% so với trước. Đề nghị cho phép sử dụng rộng trong sản xuất sau khi kiểm nghiệm Quốc gia đạt yêu cầu. Đề tài này đã được nghiệm thu Quốc gia tổ chức vào ngày 2 - 4 - 1999 đạt loại xuất sắc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. ASEAN cooperation in Food, Agriculture and Forestry. Manual of Asean standards for animals vaccine. Livestock Publication series 16. 2A, 1998.
2. Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp Thực phẩm, 1994.
Quy trình kiểm nghiệm vaccin dùng trong thú y. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
3. Nguyễn văn Lâm và CTV, 1986.
Nghiên cứu chế tạo vaccin kép nhược độc phòng bệnh tụ huyết trùng và đóng dấu lợn (Vaccin tụ dấu 3-2). Kết quả nghiên cứu KHKT thú y (1978- 1984). NXB Nông nghiệp, tr. 76-83.
4. Nguyễn Vinh Hoà, Nguyễn Ngã, Nguyễn Thị Xuân Liên, 1987
Tóm tắt kết quả nghiên cứu vaccin 3 giá trị Tụ - Dấu - Dịch tả lợn. KHKT thú y số 1 - 1987, tr. 5-6.
5. Quinn P.J. ; M. E. Carter; B. Markey; G. R. Carter, 1994
Clinical Veterinary. Microbiology. Wolfe Publishing.

STUDY ON PREPARATION AND APPLICATION POLYVALENT ATTENUATED VACCINE AGAINST 4 RED DISEASES OF SWINE

*Phan Thanh Phuong, Nguyen Nga, Truong Van Dung,
Nguyen Thi Phuong Duyen, Le Lap, Nguyen Thien Thu*

SUMMARY

A polyvalent attenuated vaccine nommenclatured vaccine CNSH - 97 to prevent swine from the 4 red diseases has developed successfully.

Experiments using vaccine CNSH -97 on over 300 pigs have been conducted at a number of swine rearers in Hoang hoa district, Thanh hoa province.

The obtained results show that:

- Anti-Pasteurellosis antibody titers reach maximum 1/128 - 1/256. Immune Indites are rather high with 19.91 for batch 1; 15,78 for batch 2 and 16.64 for batch 3.

- Anti- Salmonellosis antibody titers are the same as above and immune indices are also rather high with 15.56 for batch 1 ; 9. 21 for batch 2; 11.85 for batch 3.

- Anti- Erysipelas antibody titers reach maximum 1/64, immune indices are lower than those of the above two groups : 14.41 for batch 1; 11.16 for batch 2; 8.16 for batch 3.

- The body temperature test on rabbits with respect to attenuated virus of Hog Cholera in the vaccine CNSH - 97 to prevent swine from 4 red diseases indicates a very typical body temperature reaction.

Over 40,000 doses of this vaccine CNSH - 97 were used in several provinces such as Thai Binh, Ninh Thuan, Thua Thien Hue, Thanh Hoa with excellent results.

These results suggest that a firm immunity against the 4 red diseases of swine has been developed in swine vaccinated with the vaccine CNSH - 98. We recommend that the quality of this vaccine must be enhanced in order to pass the National Inspection in 1999. before such vaccine can be expand en mass in year 2000.

1.P.15

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU VI KHUẨN *Azotobacter* TRONG ĐẤT VÙNG GÒ ĐỒI TỈNH THỪA THIÊN - HUẾ

Phạm Thị Ngọc Lan, Trương Văn Lung

TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC - ĐẠI HỌC HUẾ

I. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây đã có nhiều biện pháp cải tạo và sử dụng đất gò đồi, điển hình là chương trình phủ xanh đất trống đồi trọc. Tuy nhiên, việc sử dụng cây trồng một cách đại trà không chọn lọc thường không mang lại hiệu quả mong muốn. Nhưng với chất đất đã bạc màu và cằn cỗi của vùng gò đồi, muốn giải pháp trên thật sự đạt hiệu quả cần có biện pháp tái tạo độ phì cho đất bằng cách trồng cây bộ Đậu và sử dụng phân bón sinh học. Ưu điểm của phân bón sinh học là tính hiệu quả và đảm bảo an toàn cho người sử dụng, cho môi trường xung quanh. Trong các loại vi sinh vật để chế tạo phân sinh học có sự đóng góp của nhóm vi khuẩn cố định đạm (nitrogen fixation bacteria). Chúng có vai trò to lớn trong việc giữ chặt đạm cho đất, thường, rất phong phú về thành phần loài và khả năng phân bố, đáng chú ý là vi khuẩn *Azotobacter*. Đây là nhóm vi khuẩn hiếu khí sống tự do trong đất, ngoài khả năng cố định nitrogen còn có tác dụng kích thích sinh trưởng cây trồng [2,3,7]. Tùy điều kiện khí hậu từng vùng mà chúng có một kiểu thích nghi đặc trưng. Do vậy đặt vấn đề nghiên cứu nhóm vi khuẩn này là cần thiết cho việc trồng cây bộ đậu một cách có hiệu quả trên vùng đất gò đồi của miền Trung.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là các chủng vi khuẩn *Azotobacter* được phân lập từ đất trồng các loại cây Keo 'Tai Tượng và Tràm Hoa Vàng ở một số vùng gò đồi thuộc tỉnh Thừa Thiên - Huế.

2. Phương pháp

- Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Azotobacter* trên môi trường vô đạm.
- Xác định các điều kiện sinh trưởng tối ưu trên môi trường dịch thể, thu dịch mẫu và so màu ở bước sóng 520nm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

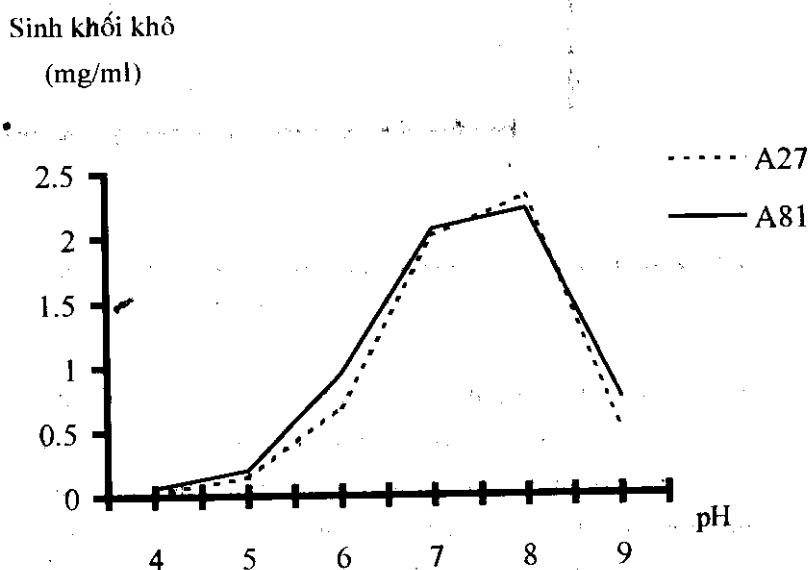
1. Phân lập và tuyển chọn *Azotobacter*

Từ đất vùng rẫy Keo Tai Tượng, Trầm Hoa Vàng và đất đối chứng, đã phân lập được 37 chủng *Azotobacter*, ký hiệu $A_1, A_2 \dots A_{37}$. Để tìm hiểu khả năng cố định nitrogen của các chủng *Azotobacter* đã phân lập, tiến hành nuôi cấy đồng loạt trên môi trường Ashby vô đạm, thay một phần glucose (0,5g) bằng sodiumbenzoate nhằm hạn chế những loại vi khuẩn sống ký sinh trong bao nhầy của *Azotobacter*.

Sau 4 ngày nuôi cấy chọn được 6 chủng có khả năng sinh trưởng và phát triển khá mạnh. Nhưng qua sơ tuyển khả năng kháng kháng sinh chỉ chọn được 2 chủng A_{27} - phân lập từ đất trồng Keo Tai Tượng ở huyện Hương Trà và A_{81} - phân lập từ đất trồng Trầm Hoa Vàng ở huyện A Lưới tỉnh Thừa Thiên - Huế.

2. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*

Để thăm dò ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*, tiến hành nuôi cấy trên môi trường nhân giống ở nhiệt độ 26 - 28°C. Sau 4 ngày thu dịch mẫu, so màu ở bước sóng 520nm, kết quả được trình bày ở đồ thị 1.



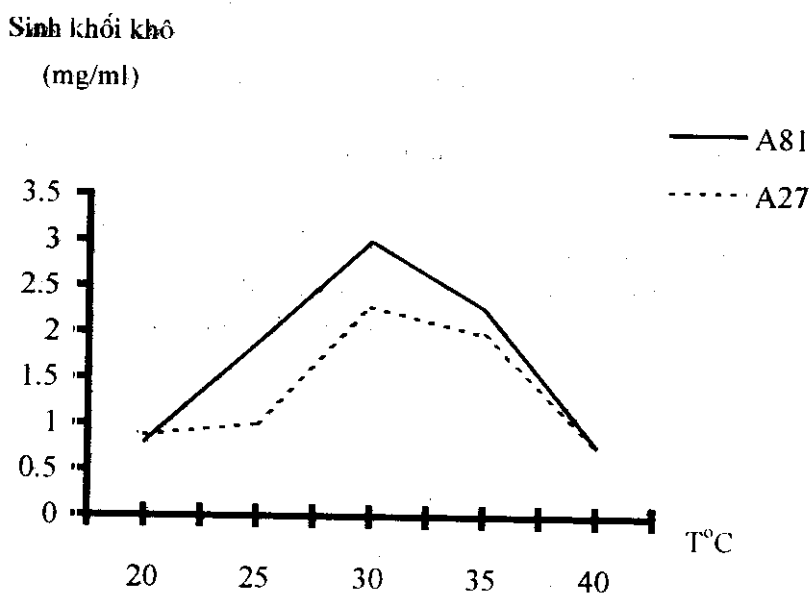
Đồ thị 1. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*

Từ kết quả thu được, nhận thấy cả hai chủng hầu như không tăng trưởng ở pH dưới 5. Khoảng pH thích hợp nhất cho sinh trưởng của chúng là 7 - 8, cả hai chủng đều đạt sinh khối cực đại ở pH = 8 và bị ức chế rõ rệt khi pH lên quá 8,5. Nhiều nghiên cứu cho biết *Azotobacter* có thể phát triển được trên các môi trường có pH trong khoảng

4,5 - 9,0, tuy nhiên quá trình cố định nitrogen chỉ thực hiện trong phạm vi khá hẹp: pH = 5,5 - 7,2, đôi khi đến 7,7[3].

3. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*

Để thăm dò ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*, tiến hành nuôi cấy trên môi trường nhân giống ở nhiệt độ 20, 25, 30, 35, 40°C. Sau 4 ngày, thu dịch mẫu và so màu ở bước sóng 520nm, kết quả được trình bày ở đồ thị 2.

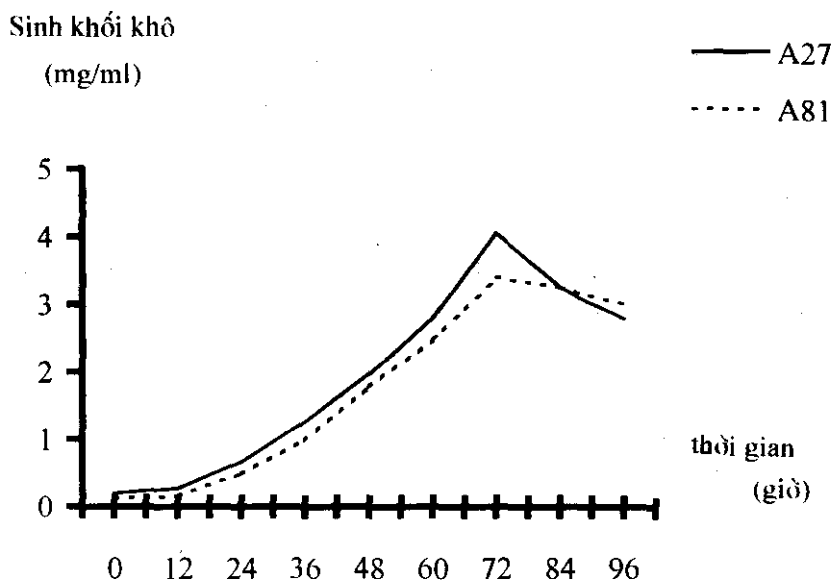


Đồ thị 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*

Qua số liệu thu được nhận thấy, *Azotobacter* có biên độ nhiệt khá rộng: trong khoảng 27- 33°C, chúng sinh trưởng tương đối chậm ở 25°C và hầu như không phát triển ở cận 20°C và cận 40°C. Sinh khối cả hai chủng đều đạt cực đại ở 30°C. Kết quả thực nghiệm của chúng tôi cho thấy hai chủng *Azotobacter* được nghiên cứu có phổ nhiệt khá rộng và sinh trưởng tốt ở nhiệt độ tương đối cao.

4. Thăm dò thời gian thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*

Để xác định thời gian thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*, tiến hành nuôi cấy trên môi trường nhân giống ở 28 - 30°C. Sau mỗi khoảng thời gian nhất định, thu dịch mẫu, so màu ở bước sóng 520nm, kết quả được trình bày ở đồ thị 3.



Đồ thị 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*

Như vậy, trong 24 giờ nuôi cấy đầu tiên, *Azotobacter* hầu như không tăng trưởng. Sau 36 giờ nuôi cấy, sinh khối bắt đầu tăng lên. Cả hai chủng đều đạt đến mức sinh khối cực đại ở giờ nuôi thứ 72, sau đó sinh khối giảm đi nhanh chóng. Chủng A_{27} có độ giảm sinh khối nhanh hơn với chủng A_{81} .

5. Hiệu quả của vi khuẩn *Azotobacter* đến sinh trưởng của một số loại cây bộ Đậu

Bảng 1. Hiệu quả của *Azotobacter* (có bổ sung vi khuẩn nốt sần) đối với cây 22 ngày tuổi

Đối tượng	Loại mẫu	Chiều cao cây (cm)	Trọng lượng tươi (mg/cây)	Trọng lượng khô (mg/cây)	Hàm lượng đạm tổng số (%)
Tràm	ĐC	4,86	34,30	7,10	2,407
Hoa Vàng	Xử lí T_2	6,37	55,50	14,50	2,947
	Xử lí T_2 và A_{81}	8,70	60,00	12,65	5,800
Keo Tai Tượng	ĐC	5,20	24,26	5,44	2,635
	Xử lí K_1	5,73	30,50	7,02	2,965
	Xử lí K_1 và A_{27}	6,78	36,40	6,66	7,701

Để tìm hiểu tác dụng của *Azotobacter* đến sinh trưởng và phát triển của Tràm Hoa Vàng và Keo Tai Tượng, chúng tôi đã tiến hành tẩm vi khuẩn vào hạt trước khi gieo, kết quả được trình bày ở bảng 1. Các tài liệu hiện có về *Azotobacter* đều cho rằng tác

dụng của *Azotobacter* thường không rõ ràng và không ổn định [2]. Do đó, chúng tôi chỉ tẩm *Azotobacter* cho trường hợp đã xử lý hạt với vi khuẩn nốt sần (được tuyển chọn từ nốt sần của cây Tràm Hoa Vàng và Keo Tai tượng trồng trên vùng đồi), đồng thời bón thêm *Azotobacter* vào chậu cát vô trùng trước khi gieo.

Qua kết quả ở bảng 1, chúng tôi nhận thấy khi xử lý hạt với vi khuẩn, các chỉ tiêu so sánh trên đều tăng. Những cây được tẩm vi khuẩn nốt sần phối hợp với *Azotobacter* có chiều cao cây, trọng lượng tươi và hàm lượng đạm tổng số tăng rõ rệt so với đối chứng và so với khi chỉ xử lý hạt bởi vi khuẩn nốt sần. Cả hai loại cây Tràm Hoa Vàng, Keo Tai Tượng trọng lượng khô của cây cao hơn so với đối chứng, nhưng lại có phần thấp hơn trường hợp chỉ tẩm vi khuẩn nốt sần. Mặt khác, mẫu thu khi cây 22 ngày tuổi, còn rất non nên tác dụng của *Azotobacter* thể hiện đặc biệt rõ trong giai đoạn này [4].

IV. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi rút ra những kết luận sau:

1. Phân lập thuần khiết được 96 chủng vi khuẩn hiếu khí cố định nitrogen sống tự do thuộc nhóm *Azotobacter*. Chọn được hai chủng A_{27} và A_{81} có hoạt tính cố định nitrogen cao và có khả năng chống chịu khá tốt đối với kháng sinh.
2. Các chủng *Azotobacter* A_{27} , A_{81} có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt trong phạm vi pH 7-8, nhiệt độ 30-35°C. Trong đó, điều kiện tối ưu cho sinh trưởng, phát triển của chúng là pH 8, nhiệt độ 30°C.
3. Thời gian nuôi cấy lactic thích hợp cho sinh trưởng, phát triển của các chủng A_{27} , A_{81} là 72 giờ.
4. Các chủng A_{27} và A_{81} cho kết quả dương tính rõ rệt trên cây thí nghiệm 22 ngày tuổi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng và các tác giả, 1972.
Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 1997.
Vi sinh vật học. NXB Giáo dục, Hà Nội.
3. Nguyễn Ngọc Dũng, 1997.
Chuyên đề cố định nitơ sinh học. Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia, Hà Nội (Tài liệu lưu hành nội bộ).
4. Võ Châu Tuấn, 1997.
Tuyển chọn các chủng vi khuẩn cố định nitrogen sống cộng sinh trên cây bộ Đậu và vi khuẩn phân giải phosphore vô cơ sống trong đất ở một số địa điểm tại Thừa Thiên - Huế. Luận văn tốt nghiệp Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế.

5. De P. K, 1989.

Blue green algae as nitrogen fixer. Annals - of - Agricultural - Research, 1989. 10:4, 331-341.

6. Osmanis V.A.; Vinkalne M.O., 1990.

Rates and methods of application of anhydrous ammonia to a barley cover crop and microbiological processes in soil. Udobrenie polevykh kultur s sistema intensivnogo zemledeliya [Edited by Shrikans Yu.A.], 1990, 115-125.

7. Rajendra - Prasad et al., 1990.

Nitrogen management. Soil fertility and fertilizer use. Vol IV. Nutrient management and supply system for sustaining agriculture in 1990 [Edited by Virendra Kumar; Shrivariya G. C; Kaore S.V.], 1990, 41-51.

8. Thies J. E., Singleton P.W., Bohlool B.B., 1991.

Modeling symbiotic performance of introduced indigenous population size and nitrogen status of the soil. Applied - and - Environmental - Microbiology, 1991. 57:1, 29-37.

PRELIMINARY STUDY ON AZOTOBACTER IN SOIL OF THE HILL IN THUATHIEN - HUE PROVINCE

Pham Thi Ngoc Lan, Truong Van Lung

SUMMARY

From soil of the hill is planted *Acacia auriculiformis* A. Cunn and *A. magnum* Will is selected two strains *Azotobacter* A₂₇ and A₅₄ can high nitrogen fixation. They grow well at pH = 8, temperature 30°C after 72 hours. *Azotobacter* and *Rhizobium* were contaminated on seeds of those trees had positive result after planted 22 days.

1.P.16

SẢN XUẤT AXIT INDOLEACETIC BỞI VI KHUẨN CĂN TĂNG *Azospirillum brasiliense* VÀ HIỆU ỨNG GIA TĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT

Hoàng Quốc Khánh, Nguyễn Phúc Hoàng,
Ngô Đức Duy, Lê Kim Huê

VIỆN SINH HỌC NHIỆT ĐỚI TP. HỒ CHÍ MINH

I. MỞ ĐẦU

Azospirillum là vi khuẩn căn tăng (rhizobacterium) sống tự do, cố định N₂. Một số báo cáo gần đây cho thấy vi khuẩn này có khả năng sinh tổng hợp các hocmôn tương tự các hocmôn sinh trưởng thực vật như IAA, (axit idoleacetic), gibberelin, cytokinin [1]. *Azospirillum* được phát hiện trong vùng rễ của các cây ngũ cốc (lúa, ngô, lúa mì và lúa miến), cà chua, cây thuộc họ đậu. Trong một số trường hợp khi được chủng *Azospirillum* làm gia tăng năng suất ngô lên 30% [4].

Trong bài báo này sẽ trình bày một số các kết quả về ảnh hưởng của axit malic và tryptophan lên quá trình sinh tổng hợp IAA ở *A. brasiliense*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng *Azospirillum brasiliense* Cd do TS Bashan (Mexico) gửi tặng.

Môi trường và các điều kiện nuôi cấy. Môi trường chuẩn nước chiết khoai tây (Potato medium - PM) (200 g/L) có bổ sung khoáng (g/L) : axit malic - 2,5 saccharose - 2,5, pH 6,5. Môi trường rắn có chứa 15 g/L agar (Dobreigner, 1995).

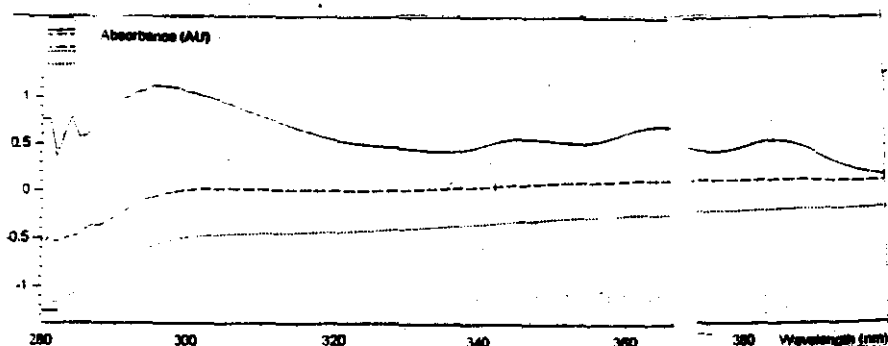
Hàm lượng IAA được xác định như sau: dịch nuôi cấy sau những khoảng thời gian nhất định được ly tâm ở 8000 rpm trong 4 phút. Phần dịch trong được đo trên máy quang phổ HP. IAA chuẩn của Sigma (USA).

Phương pháp xác định độ dài rễ (Gnotobiotic root elongation assay). Phương pháp này được sử dụng để đo tác dụng kích thích của vi khuẩn lên độ dài của rễ. Hạt lúa (*Oryza sativa*) được khử trùng bề mặt bằng Eau de javel 1 % và được rửa lại bằng nước cất. Ngay sau khi khử trùng hạt lúa được ủ 1h trong dịch huyền phù của *A. brasiliense* Cd, đồng thời đối chứng được ủ trong nước cất. Sau khi ủ hạt lúa được rửa lại để loại vi khuẩn và đặt trên các khoanh giấy lọc trong đĩa petri.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của nồng độ axit malic lên sinh tổng hợp IAA

Trong trường hợp là nguồn carbon duy nhất axit malic được xem như nhân tố giới hạn sinh trưởng của *Azospirillum*. Mặc dù trong môi trường chuẩn có hàm lượng axit malic là 2,5 g/L, chúng tôi đã thử thay đổi hàm lượng axit malic để xem xét nồng độ nào tốt nhất đối với quá trình sinh tổng hợp IAA. Các kết quả đo trên máy quang phổ HP trên bước sóng từ 280 - 400 nm cho thấy trong môi trường nuôi cấy có hàm lượng 1 g/L axit malic, năng suất sinh tổng hợp IAA là cao nhất, trong khi đó hàm lượng 3,5 g/L không có tác dụng (hình 1). Tác dụng kích thích phát triển rễ lúa của dịch nuôi cấy *A. brasilense* Cd dưới các nồng độ axit malic khác nhau được trình bày trên bảng 1. Các thí nghiệm này cũng chứng tỏ dịch nuôi cấy *A. brasilense* Cd có chứa nồng độ 1 g/L axit malic cho kết quả tốt nhất, phù hợp với kết quả đo trên máy quang phổ HP (bảng 1).



Hình 1. Phổ hấp thụ IAA của dịch nuôi cấy *A. brasilense* Cd dưới nồng độ axit malic (g/L) 1 (-); 2,5 (--) và 3,5 (---).

Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy *A. brasilense* Cd lên độ dài rễ lúa dưới nồng độ axit malic khác nhau.

	Độ dài rễ (cm)	n
Đối chứng	$32,9 \pm 3,8$	58
PM + axit malic (1,0 g/L)	$41,9 \pm 4,1$	60
PM + axit malic (2,5 g/L)	$36,9 \pm 4,2$	58
PM + axit malic (3,5 g/L)	$35,9 \pm 3,9$	60

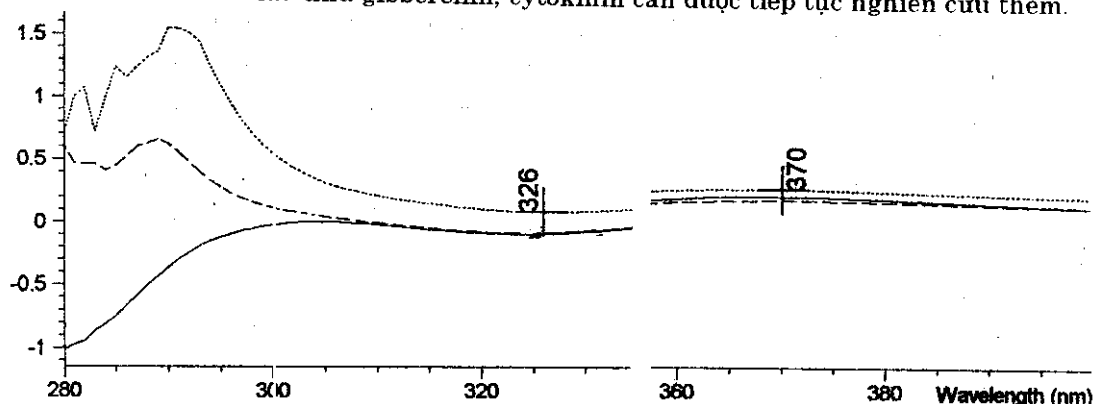
n - số hạt được xử lý.

2. Ảnh hưởng của tryptophan lên sinh tổng hợp IAA

Người ta đã xác định có ba hướng tổng hợp chính để tổng hợp IAA ở *Azospirillum* là amino transferase, indole-3-acetamid, và hướng thứ ba phụ thuộc vào tryptophan [5]. Để theo dõi xem tryptophan có ảnh hưởng như thế nào lên quá trình sinh tổng hợp IAA, nồng độ tryptophan khác nhau (25, 50 và 100 mg/L) được bổ sung vào môi trường

chuẩn. Các kết quả trình bày trên hình 2 cho thấy sinh tổng hợp IAA ở *A. brasilense* Cd tăng theo tỷ lệ với nồng độ tryptophan đưa vào. Các thí nghiệm về tác dụng của dịch nuôi cấy *A. brasilense* Cd lên độ dài rễ lúa dưới nồng độ tryptophan khác nhau được trình bày trong bảng 2. Các kết quả này minh chứng thêm cho kết quả đo được trên máy quang phổ HP.

Như vậy, các kết quả thí nghiệm cho thấy axit malic và tryptophan có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp IAA ở *A. brasilense* Cd. Như phần mở đầu đã trình bày, mặc dù *Azospirillum* có khả năng cố định đạm, nhưng hiệu suất không cao và ít có ý nghĩa. Phần đóng góp quan trọng cho sự kích thích sinh trưởng cây trồng thuộc về khả năng sản xuất các phytohormôn, đặc biệt là IAA. Tuy nhiên vai trò của các phytohormôn khác nhau như gibberellin, cytokinin cần được tiếp tục nghiên cứu thêm.



Hình 2. Phổ hấp thu IAA của dịch nuôi cấy *A. brasilense* Cd với nồng độ tryptophan (mg/L): 25 (-); 50 (—) và 100 (...).

Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy *A. brasilense* Cd lên độ dài rễ lúa dưới nồng độ tryptophan khác nhau.

	Độ dài rễ đơn vị	n
Đối chứng	42,3 ± 3,9	59
PM + tryptophan (25 mg/L)	48,7 ± 4,0	58
PM + tryptophan (50 mg/L)	50,7 ± 3,9	60
PM + tryptophan (100 mg/L)	52,8 ± 3,8	59

n - số hạt được xử lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Y. Bashan, G. Holgui, 1997.

Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990 - 1996). Can. J. Microbiol. 43 (1997), 103 - 121.

2. J. Dobereigner, 1995.

Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soils and plants. in Methods in App. Soil Microbiol. And Biochem. K. Alef & P. Nannipieri (eds). Academy Press, San Diego, 1995, 137 - 139.

3. G. Holguin et al, 1999.

Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. Biol. Fertil. Soils 29 (1999), 10 - 23.

4. B. Glick et al, 1995.

A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonas. Can. J. Microbiol, 41 (1995).

5. CL Patten, B. Glick, 1996.

Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can. J. Microbiol, 42 (1996), 207 - 220.

INDOLE-ACETIC ACID (IAA) PRODUCTION BY *Azospirillum brasilense* AND PLANT GROWTH STIMULATION EFFECT

Hoang Quoc Khanh et al

SUMMARY

*The indole-3-acetic acid production by rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Cd was investigated. By spectral analysis, DL-malic and tryptophan might be utilized as precursors for IAA synthesis by *A. brasilense* Cd. The influence of *A. brasilense* culture suspension on root length of rice was studied.*

1.P.17

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITƠ TRONG RỄ LÚA LÊN SINH TRƯỞNG CỦA MẦM LÚA CR203

Nguyễn Ngọc Dũng, Hồ Thị Kim Anh, Phan Thị Hoài Anh
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Hướng tới một nền sản xuất nông nghiệp bền vững sinh thái, trong vài năm gần đây ngày càng gia tăng các nghiên cứu vi khuẩn cố định nitơ trong rễ cây trồng không thuộc cây họ đậu, đặc biệt ở cây ngũ cốc. Theo Doebereiner (3,4), vi khuẩn ở trong rễ cây không gặp phải sự cạnh tranh nguồn cacbon như vi khuẩn khu trú trên bề mặt rễ và có thể cung cấp đạm cho cây trồng mà không phải nhờ đến khí tế bào chết.

Vi khuẩn cố định nitơ khu trú trong rễ lúa tại một số địa điểm thuộc đồng bằng sông Hồng đã được phân lập và một số đặc điểm phân loại của chúng đã được xác định (6,7). Trong bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu ban đầu về ảnh hưởng của các chủng phân lập lên sinh trưởng của mầm lúa.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vi sinh vật: 78 chủng phân lập từ rễ lúa đã thanh trùng bề mặt có khả năng cố định nitơ (6).

Giống lúa: CR203

Các môi trường MAZ (1), Khoáng vô cơ tổng hợp chứa 0,4g cao nấm men/l và môi trường Weaver (2) dùng để nuôi vi khuẩn hoặc mầm lúa.

Hạt thóc giống không có vết được thanh trùng bằng dung dịch ôxy già 10%, và dung dịch HgCl_2 (0,1%) rửa sạch các dung dịch bằng nước vô trùng. Khi mầm lúa có độ dài xấp xỉ 1cm thì được xử lý với dịch nuôi vi khuẩn.

Mầm lúa 1cm vô trùng được cấy vào ống nghiệm lớn ($\varnothing$: 3cm, dài 25cm) chứa 10ml môi trường Weaver bán lỏng (5g thạch/l) với mật độ 10^8 tế bào vi khuẩn /ml. 3 mầm lúa cho một ống nghiệm; một ống nghiệm chỉ chứa tế bào của một chủng vi khuẩn phân lập được nuôi ở 28° C, 24 giờ trong môi trường khoáng vô cơ tổng hợp chứa 0,4g cao men. Trong thí nghiệm đối chứng một lượng môi trường khoáng tương đương được dùng để thay thế lượng dịch nuôi vi khuẩn. Mầm lúa được nuôi ở điều kiện chiếu sáng tự nhiên bên cửa sổ, trong 7 ngày. Sau đó chiều dài rễ và thân lá mầm lúa được xác định. Các số đo là giá trị trung bình của 3 mầm lúa.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các số đo cho thấy không có sự khác biệt về chiều dài thân lá mầm lúa được xử lý vi khuẩn và đối chứng; ở thí nghiệm đối chứng giá trị thân lá trung bình là 6,7 cm, còn ở các thí nghiệm xử lý vi khuẩn dao động trong khoảng 5,5 - 7,2 cm. Tuy vậy hệ rễ thể hiện có sự khác biệt khi tiếp xúc với các chủng (bảng 1).

Bảng 1. Phân nhóm chủng phân lập theo ảnh hưởng của chúng lên rễ mầm lúa

Số chủng Chiều dài rễ trung bình R (cm)	Đc	G1	G2	G3
4,0	+	-	-	-
$2,0 \leq R < 3,0$	-	19	-	-
$3,0 \leq R \leq 5,0$	-	-	45	-
$5,0 < R \leq 6,6$	-	-	-	14

G1, G2, G3: Các nhóm chủng phân lập; chữ số là số chủng;

+ : giá trị trung bình của rễ mầm lúa không xử lý với vi khuẩn, 4,0cm;

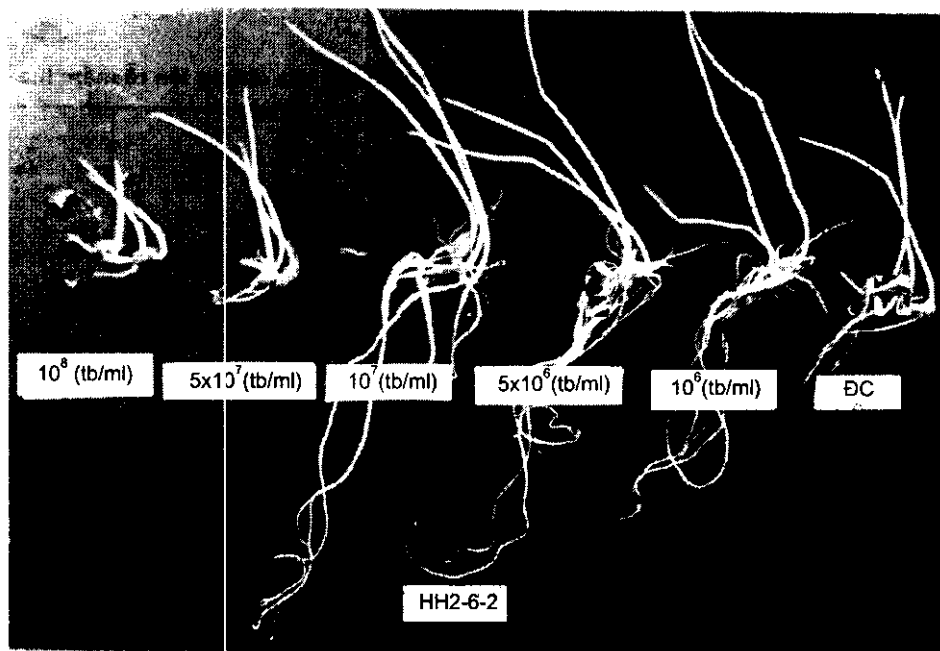
- : không có. Đc: đối chứng (mầm lúa không được nhiễm vi khuẩn).

Các chủng đặc trưng của nhóm G1 như là HH2-6-2, TS1-7-R4, TS2-1-7; khi xử lý mầm lúa với các chủng này với mật độ 10^8 tế bào/ml thì hệ rễ bị ức chế khá rõ, chiều dài rễ trung bình chỉ đạt khoảng 2,0 cm. Khác với các chủng của nhóm G1, các chủng của nhóm G3, chẳng hạn như TS1-6-1 hay TS2-1-6R, ở cùng mật độ tế bào như vừa nêu trên, không thể hiện sự ảnh hưởng âm tính lên sinh trưởng rễ lúa, ngoài ra ít nhiều còn có ảnh hưởng tích cực; chiều dài rễ trung bình đạt tới 6,6 cm.

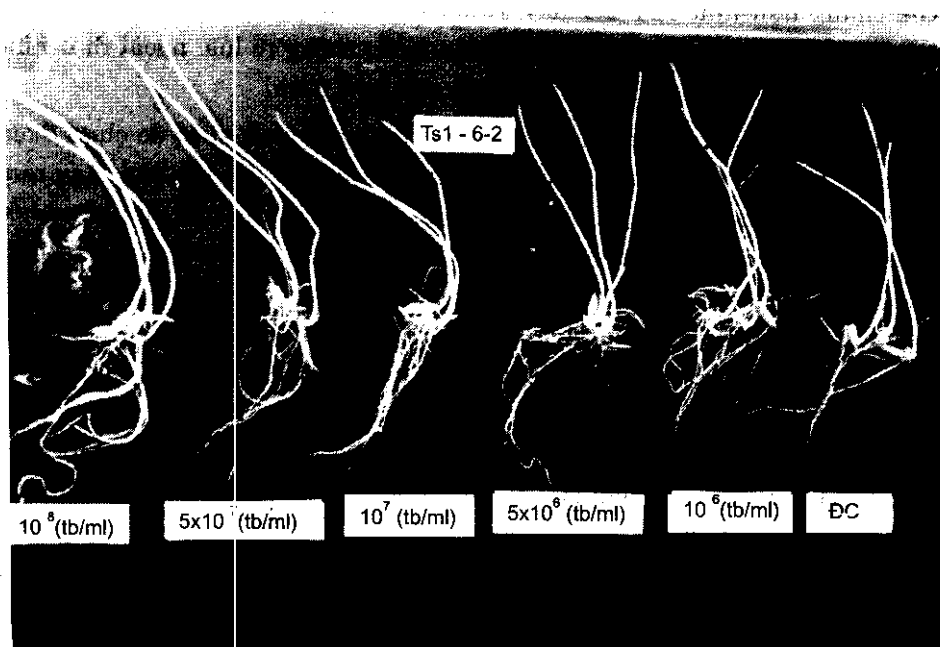
Tuy đây là một sự phân nhóm sơ bộ mang tính chủ quan vì số đo chưa được xử lý xác suất thống kê, nhưng nếu so sánh các giá trị trung bình thì dễ nhận thấy rằng giữa chúng có hệ số cách biệt khoảng 1,5; điều đó cho phép nói rằng một sự phân nhóm như vậy ít nhiều có ý nghĩa. Như đã biết, nhiều vi sinh vật hội sinh với rễ cây trồng có khả năng sinh tổng hợp các chất điều hoà sinh trưởng thực vật (8). Chủng HH2-6-2 là chủng có nhiều đặc điểm của loài *Azospirillum lipoferum* (7). Khả năng tổng hợp axit indolaxetic ở vi khuẩn *Azospirillum* vùng rễ lúa đồng bằng sông Hồng đã được xác định (5). Như vậy, có thể cho rằng, một trong những nguyên nhân làm cho rễ mầm lúa bị ức chế là tồn tại các chất điều hoà sinh trưởng thực vật với nồng độ cao trong dịch nuôi các chủng nhóm G1. Tất nhiên không loại bỏ tồn tại khả năng cạnh tranh chất dinh dưỡng khi mật độ tế bào vi khuẩn lớn.

Để khẳng định các kết quả trên, thí nghiệm ảnh hưởng của các chủng HH2-6-2, TS1-6-1 và TS2-1-6R với nồng độ tế bào khác nhau đã được tiến hành (hình 1a, 1b và 1c). Quan sát các hình cho thấy, đối với chủng HH2-6-2, ở mật độ tế bào 5.10^7 /ml, rễ mầm lúa đã bị ức chế, nhưng ở mật độ $10^6 - 10^7$ tế bào/ml cho hệ rễ phát triển nhất.

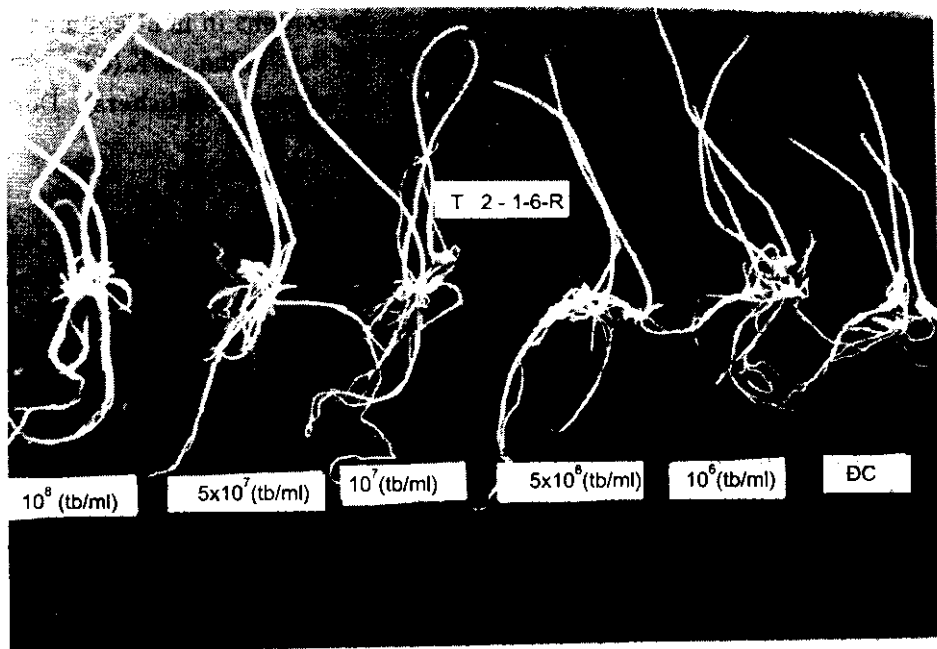
Đối với các chủng TS1-6-1 và TS2-1-6R, rõ ràng mật độ tế bào cao không ảnh hưởng tới sinh trưởng của mầm lúa và hình như các chủng này ít nhiều có lợi cho mầm lúa và điều đó được nhận thấy hơn ở thân lá. Để khẳng định giả định này cần tiến hành các thí nghiệm cần thiết khác.



Hình 1a. Ảnh hưởng của chủng HH2-6-2 lên mầm lúa CR203.



Hình 1b. Ảnh hưởng của chủng TS1-6-2 lên mầm lúa CR203



Hình 1c. Ảnh hưởng của chủng TS2-1-6R lên mầm lúa CR203

IV. KẾT LUẬN

Tóm lại các chủng vi khuẩn phân lập cố định nitơ khu trú trong rễ lúa ở đồng bằng sông Hồng thể hiện sự ảnh hưởng khác nhau lên sinh trưởng của mầm lúa CR203. Với kết quả thu được cho phép đưa ra giả định ban đầu về khả năng ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn lên mầm lúa và định hướng chọn lọc chủng hữu hiệu đối với sản xuất chế phẩm phân bón cho cây lúa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Albrecht S.L. and Okon Y., 1980.
Culture of *Azospirillum*. In: San Pietro, A. (ed.): *Methods in Enzymol.*, 69, Acad. Press, New York
2. Charyulu, P.B.B.N., Fourcassie, F., Barbouche, A.K., Rondro Harisoa, L, Omar, A.M.N., Weinhard, P., Marie, R. and Blandraeu, J., 1985.
Field inoculation of rice using in vitro selected bacterial and plant genotypes. In: Klingmueller, W. (ed.): *Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology*. Springer Verlag, Heidelberg
3. Doeberiner, J., 1992.
History and new perspectives of diazotrophs in association with non-legumous plants. *Symbiosis*, 13, p.1.

4. Doeberiner, J. and Baldani, V.L.D., 1998.

Biological nitrogen fixation by endophytic diazotrophs in non-leguminous crops in the tropics. In: Malik, K.A., Mirza, M.S., Ladha, J.K.(eds): Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London

5. Nguyễn Ngọc Dũng, 1994.

Isolierung und Charakterisierung Azospirillenartiger Bakterien aus Reiswurzeln und Reisfeldboeden im Rotflussdelta, Nordvietnam. Doktorarbeit.

6. Nguyễn Ngọc Dũng, Hồ Thị Kim Anh, Vũ Thanh, 1998.

Phân lập vi khuẩn cố định nitơ trong rễ cây lúa ở một số địa điểm thuộc đồng bằng sông Hồng. Kỷ yếu 1997. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, Việt Nam.

7. Nguyễn Ngọc Dũng, Hồ Thị Kim Anh, 1999.

Một số đặc điểm phân loại của các chủng vi khuẩn cố định nitơ trong rễ lúa ở một số địa điểm thuộc đồng bằng sông Hồng. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học, 1999.

8. Tien, T.M., Gaskins, M.H. and Hubbell, D.H., 1978.

Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol., 37, p. 1016

EFFECTS OF THE RICE ROOT ENDOPHYTIC NITROGEN-FIXING ISOLATES ON THE GROWTH OF CR203 RICE SEEDLINGS

Nguyen Ngoc Dung, Ho Thi Kim Anh, Phan Thi Hoai Anh

SUMMARY

Rice seedlings CR203 were treated by the cultures of 78 rice root endophytic nitrogen-fixing isolates for 7 days in the condition of window light. While the root system of rice seedlings appeared to be differently effected by the bacterial strains used, their effect on the shoot seemed not to be clear. Results also showed that the isolates HH2-6-2, TS1-6-2 and TS2-1-6R were potential to be used for the preparation of microbial fertilizer for rice plant.

Địa chỉ : Phòng Vi sinh vật đất

Viện Công nghệ Sinh học

Tl. 8358333-1076

1.P.18

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP LƯU GIỮ CHỦNG VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ

Nguyễn Kim Vũ⁽¹⁾, Nguyễn Ngọc Quyên⁽²⁾,
Nguyễn Thu Hà⁽²⁾, Phạm Văn Toán⁽²⁾, Trần Tú Thủy⁽²⁾

(1): VIỆN CÔNG NGHỆ SAU THU HOẠCH

(2): VIỆN KHOA HỌC KỸ THUẬT NÔNG NGHIỆP

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc tìm phương pháp bảo quản các chủng vi sinh vật nhằm duy trì lâu dài sức sống, tránh nhiễm tạp, giữ hoạt tính của chủng giống không bị biến đổi theo thời gian là một việc làm có ý nghĩa thực tiễn. Hơn nữa, mỗi chủng vi sinh vật chỉ thích hợp với một vài phương pháp bảo quản nhất định. Hiện nay, hầu hết các phòng thí nghiệm đều sử dụng các phương pháp cấy chuyển định kỳ, do vậy các đặc tính sinh học cơ bản của chủng giống dễ bị biến đổi theo thời gian. Vì vậy chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sử dụng một số phương pháp bảo quản mới đối với từng chủng giống vi sinh vật. Sau đây là kết quả nghiên cứu về một số phương pháp lưu giữ chủng vi sinh vật cố định nitơ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

Bảng 1. Các chủng giống dùng trong nghiên cứu

STT	Tên chủng giống	Ký hiệu	Nguồn gốc	Hoạt tính sinh học
1	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Az.12	Viện VSVNN LB Nga	Cố định nitơ hội sinh
2	<i>Azotobacter agilis</i>	AT.18	nt	Cố định nitơ tự do
3	<i>Azotobacter chroococcum</i>	AT.19	nt	Cố định nitơ tự do
4	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	RG.57	nt	Cố định nitơ cộng sinh

Các chủng giống dùng trong nghiên cứu hiện đang được lưu giữ tại bộ môn Vi sinh vật Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp.

2. Phương pháp

Các chủng giống được kiểm tra độ thuần và hoạt tính trước khi đưa vào lưu giữ bảo quản.

- Xác định mật độ tế bào chủng giống vi sinh vật theo phương pháp pha loãng nuôi cấy gọt trên thạch đĩa.
- Xác định khả năng cố định nitơ (hoạt tính Nitrogenaza) bằng phương pháp khử axetylen trên máy sắc ký khí PYE UNICAM series 204 chromatograp (Anh)
- Xác định khả năng hình thành nốt sần bằng phương pháp trồng cây trên cát vô trùng có bổ sung dịch dinh dưỡng và nhiễm hạt với chủng *B.japonicum* 10^6 TB/hạt
- Lưu giữ bảo quản chủng giống vi sinh vật
 - Giữ trên môi trường thạch nghiêng
 - Giữ trên môi trường thạch dưới lớp dầu khoáng
 - Giữ ở dạng đông khô

Giữ giống trên môi trường thạch

Tuỳ từng loại chủng giống được cấy trên môi trường thích hợp được sử dụng. Sau khi tế bào đã phát triển ổn định thì bắt đầu đưa ống giống vào bảo quản ở nhiệt độ $4-10^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ phòng ($25-30^{\circ}\text{C}$)

Giữ trên môi trường thạch dưới lớp dầu khoáng

Khử trùng dầu khoáng parafin rồi đặt ở nhiệt độ 40°C cho bay hết nước có lẫn trong dầu. Sau đó bằng thao tác vô trùng đổ lên bề mặt của lớp thạch nghiêng đã cấy giống sao cho khi dựng đứng ống thạch lên thì bề mặt lớp dầu khoáng cách lớp trên của lớp thạch khoảng 1 cm. Bảo quản ở nhiệt độ phòng; nhiệt độ $4-10^{\circ}\text{C}$

Giữ ở dạng đông khô

Làm thăng hoa phần nước có trong môi trường trong điều kiện chân không. Giống được bảo vệ trong môi trường sữa tách bơ 10%. Môi trường bảo vệ cần được thanh trùng cẩn thận theo phương pháp Pasteur. Trước khi tiến hành thí nghiệm các chủng giống phải được cấy trên môi trường đặc và nuôi ở những điều kiện thích hợp sau một thời gian để giống phát triển tốt.

Chuyển các chủng này sang môi trường bảo vệ thành các dịch huyền phù với sự tham gia hợp lý của các chất bổ trợ sao cho:

- Dịch lỏng đó có thể đông khô được.
 - Sản phẩm sau đông khô phải an toàn về sinh học và có cấu trúc đẹp về mặt vật lý
- Dịch lỏng được nạp vào trong lọ thuỷ tinh với :

- Loại lọ: 3ml
- Thể tích dịch 1ml
- Chiều cao cột dịch 10mm
- Điểm đông pha: -10°C

- Quá trình đông khô được tiến hành như sau:

- + Pha 1: Hạ băng: từ 20°C xuống 35°C : 3 h
- + Pha 2: Đông khô: Từ -35°C đến -10°C : 18 h
Từ -10°C đến 25°C : 4 h
- + Pha 3: Làm kiệt: duy trì ở 25°C : 4 h

Qui định chất lượng đông khô

1. Vùng nhiệt sử dụng: nằm trong vùng cho phép, các vi sinh vật không bị tổn thương (ở đây là từ -35°C đến 25°C). Như vậy, yêu cầu hàng đầu của chất lượng đông khô là tỉ lệ sống sót của chủng vi sinh vật ít thay đổi và không bị nhiễm tạp.
2. Ẩm độ của sản phẩm sau đông khô $< 4\%$.
3. Độ chân không $< 0,05$ mbar.
4. Cấu trúc vật lý đẹp : xốp, không nứt, không vỡ, không thay đổi hình khối.
5. Tan nhanh khi cho dung môi vào chế phẩm đã đông khô
6. Không bị biến màu

Bảo quản mẫu giống đông khô ở nhiệt độ $4-10^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ phòng.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Giữ trên môi trường thạch nghiêng thường xảy ra hiện tượng mất nước của môi trường làm môi trường khô dần, các chủng giống có thể bị chết. Hơn nữa việc giữ trên môi trường thạch nghiêng thường dễ nhiễm tạp mất nhiều thời gian và tốn kém do phải cấy chuyển nhiều lần.

Giữ dưới lớp dầu khoáng parafin khắc phục tình trạng khô khoáng môi trường. Dưới lớp dầu khoáng, các chủng vẫn duy trì sự sống. Các chủng hiếu khí vẫn sinh trưởng với tốc độ chậm vì không khí vẫn khuếch tán vào môi trường.

Kết quả bảng 2 cho thấy giữ dưới lớp dầu khoáng đối với các chủng AT18, AT19 và RG57 có thể duy trì khả năng sống sót của chủng giống trong 12 tháng so với đối chứng (giữ trên môi trường thạch nghiêng là 6 tháng) ở cả hai nhiệt độ bảo quản (4°C , nhiệt độ phòng). Riêng chủng Az12, bảo quản dầu khoáng ở nhiệt độ phòng cho độ sống sót cao hơn ở nhiệt độ $4-10^{\circ}\text{C}$. Hoạt tính sinh học của các chủng giống không bị mất đi trong thời gian lưu giữ ở cả 2 phương pháp (kết quả bảng 4). Giữ dưới lớp dầu khoáng parafin có thể duy trì sự sống sót của các chủng giống từ 1-2 năm (1).

Cả hai phương pháp này đều có chi phí thấp, không cần trang thiết bị chính xác.

Kết quả bảng 3 cho thấy lưu giữ chủng giống vi sinh vật dạng đông khô cho phép duy trì lâu dài khả năng sống sót của tế bào (18 tháng) so với đối chứng (bảo quản trên môi trường thạch nghiêng là 6 tháng) và bảo giữ dưới lớp dầu khoáng là 12 tháng. Sau đông khô mật độ tế bào giảm ít, điều này phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây (3,4,5,7,8).

Bảng 2. Độ sống sót của vi sinh vật trong quá trình bảo quản dưới lớp dầu khoáng

Chủng vi vật	Thời gian bảo quản	Mật độ tế bào (TB/ml)			
		Bảo quản t° phòng		Bảo quản 4°C	
		Thạch nghiêng (Đối chứng)	Dầu khoáng	Thạch nghiêng (Đối chứng)	Dầu khoáng
Az.12	Trước BQ	$2,76 \times 10^9$	-	-	-
	1 tháng	$2,50 \times 10^8$	$3,42 \times 10^7$	$7,26 \times 10^8$	$<10^1$
	3 tháng	$7,20 \times 10^7$	-	$3,52 \times 10^6$	$<10^1$
	6 tháng	$9,86 \times 10^5$	$6,00 \times 10^6$	-	-
	9 tháng	khô, nhiễm	$5,00 \times 10^5$	-	0
	12 tháng	khô, nhiễm	$4,00 \times 10^5$	-	0
AT.18	Trước BQ	$4,53 \times 10^8$	-	-	-
	1 tháng	$3,00 \times 10^6$	$2,60 \times 10^6$	$6,20 \times 10^5$	$1,44 \times 10^7$
	3 tháng	$3,52 \times 10^6$	$1,32 \times 10^7$	$3,52 \times 10^6$	$7,57 \times 10^5$
	6 tháng	$8,40 \times 10^6$	$8,00 \times 10^7$	$1,40 \times 10^6$	$1,16 \times 10^6$
	9 tháng	khô, nhiễm	$7,00 \times 10^7$	$1,00 \times 10^4$	$1,69 \times 10^4$
	12 tháng	khô, nhiễm	$4,40 \times 10^5$	$<10^2$	$<10^2$
AT.19	Trước BQ	$2,02 \times 10^7$	-	-	-
	1 tháng	$2,26 \times 10^7$	$9,00 \times 10^6$	$1,40 \times 10^5$	$6,00 \times 10^5$
	3 tháng	$7,00 \times 10^6$	$1,28 \times 10^7$	$2,79 \times 10^6$	$3,27 \times 10^6$
	6 tháng	$3,02 \times 10^7$	$4,20 \times 10^7$	$8,00 \times 10^6$	$1,60 \times 10^8$
	9 tháng	khô, nhiễm	$7,56 \times 10^6$	$3,20 \times 10^4$	$3,60 \times 10^4$
	12 tháng	khô, nhiễm	$8,00 \times 10^5$	$<10^2$	$<10^2$
RG.57	Trước BQ	$2,72 \times 10^8$	-	-	-
	3 tháng	$3,77 \times 10^8$	$3,07 \times 10^8$	$1,44 \times 10^8$	$3,33 \times 10^8$
	6 tháng	$1,80 \times 10^9$	$1,92 \times 10^9$	$4,00 \times 10^8$	$5,00 \times 10^9$
	9 tháng	$1,34 \times 10^8$	$4,10 \times 10^8$	$6,45 \times 10^8$	$9,83 \times 10^8$
	12 tháng	khô, nhiễm	$5,02 \times 10^7$	$4,00 \times 10^8$	$6,80 \times 10^8$
	15 tháng	khô, nhiễm	nhiễm	$4,52 \times 10^8$	$9,45 \times 10^8$

Bảng 3. Độ sống sót của vi sinh vật trong quá trình bảo quản ở dạng đông khô

Chủng vi sinh vật	Thời gian bảo quản	Mật độ tế bào (TB/ml)	
		Bảo quản t° phòng	Bảo quản 4°C
Az. 12	Trước ĐK	$2,00 \times 10^8$	-
	Sau ĐK	$3,40 \times 10^7$	-
	1 tháng	$1,00 \times 10^6$	$3,00 \times 10^7$
	3 tháng	$2,08 \times 10^6$	$8,60 \times 10^6$
	8 tháng	$1,40 \times 10^6$	$1,74 \times 10^6$
	14 tháng	1×10^3	$3,54 \times 10^5$
	18 tháng	1×10^2	$3,00 \times 10^4$
AT. 18	Trước ĐK	$1,00 \times 10^8$	-
	Sau ĐK	$3,80 \times 10^7$	-
	1 tháng	$1,00 \times 10^7$	$3,00 \times 10^7$
	3 tháng	$4,56 \times 10^6$	$1,23 \times 10^7$
	8 tháng	$3,50 \times 10^5$	$5,4 \times 10^6$
	14 tháng	$3,20 \times 10^1$	$2,29 \times 10^5$
	18 tháng	$< 10^2$	$2,00 \times 10^4$
AT. 19	Trước ĐK	$5,00 \times 10^8$	-
	Sau ĐK	$3,60 \times 10^7$	-
	1 tháng	$9,00 \times 10^6$	$3,60 \times 10^7$
	3 tháng	$5,11 \times 10^5$	$3,00 \times 10^6$
	8 tháng	$4,00 \times 10^4$	$2,38 \times 10^5$
	14 tháng	$< 10^2$	$1,30 \times 10^5$
	18 tháng	-	$2,80 \times 10^4$
RG. 57	Trước ĐK	$1,00 \times 10^8$	-
	Sau ĐK	$9,0 \times 10^7$	-
	1 tháng	$5,56 \times 10^7$	$3,62 \times 10^7$
	3 tháng	$2,22 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$
	8 tháng	$3,86 \times 10^7$	$4,00 \times 10^6$
	14 tháng	$1,23 \times 10^7$	$1,00 \times 10^5$
	18 tháng	$1,00 \times 10^6$	-

Ghi chú: (-) không kiểm tra

Đối với các chủng với chủng Az12, AT18, AT19 bảo quản đông khô ở 4°C - 10°C cho độ sống sót cao hơn bảo quản ở nhiệt độ phòng; Riêng chủng RG 57 ở nhiệt độ phòng lại có độ sống sót tế bào cao hơn, điều này có thể do sự thích nghi của từng chủng giống ở điều kiện khác nhau là khác nhau. Các chủng vi sinh vật vẫn giữ được hoạt tính sinh học sau thời gian bảo quản (kết quả bảng 4).

Bảng 4. Hoạt tính sinh học của vi sinh vật sau bảo quản

Chủng vi sinh vật	Thời gian bảo quản	ARA (nmC ₂ H ₄ /ml/ngày)					
		Bảo quản t° phòng			Bảo quản 4°C		
		Thạch nghiêng (ĐC)	Dầu khoáng	Đông khô	Thạch nghiêng (ĐC)	Dầu khoáng	Đông khô
AT. 18	1 tháng	1744,60	1622,35	1630,22	1723,80	1694,70	1697,60
	3 tháng	-	-	1612,68	-	-	1747,20
	6 tháng	1749,97	1846,50	-	1738,88	-	-
	9 tháng	-	-	-	-	2346,24	-
	12 tháng	-	1655,68	-	-	-	-
	14 tháng	-	-	-	-	-	1622,40
AT. 19	1 tháng	1660,80	1690,00	1730,24	1643,95	1682,06	1630,24
	3 tháng	-	-	1655,06	-	-	-
	6 tháng	1705,60	1722,24	-	2138,24	-	-
	9 tháng	-	-	-	1431,04	2118,83	-
	12 tháng	-	1961,92	-	-	-	-
	14 tháng	-	-	-	-	-	1930,06
Az. 12	1 tháng	1258,24	1198,20	1272,24	-	-	1217,57
	3 tháng	-	-	1247,52	1213,32	-	-
	6 tháng	1210,60	-	-	-	-	-
	9 tháng	-	1219,44	-	-	-	-
	14 tháng	-	-	-	-	-	1209,17
		Khả năng hình thành nốt sần					
		Bảo quản t° phòng			Bảo quản 4°C		
		Thạch nghiêng (ĐC)	Dầu khoáng	Đông khô	Thạch nghiêng (ĐC)	Dầu khoáng	Đông khô
RG. 57	1 tháng	+	+	+	+	+	+
	6 tháng	+	+	+	+	+	+
	12 tháng	-	+	-	-	+	-
	14 tháng	-	-	+	-	+	+

Giữ chủng giống vi sinh vật ở dạng này có thể duy trì sự sống sót của các chủng giống từ 3-30 năm (1,2,4,5,7.)

IV. KẾT LUẬN

1. Giữ dưới lớp dầu khoáng đối với Az12, AT 18, AT19, RG 57 có thể duy trì khả năng sống sót của các chủng giống lâu hơn (12 tháng), hoạt tính sinh học ổn định. Giữ bằng phương pháp này chi phí thấp, không cần trạng thiết bị chính xác.
2. Giữ ở dạng đông khô đối với Az 12, AT18, AT 19 RG57 cho phép duy trì lâu dài khả năng sống sót của chủng giống (18 tháng), hoạt tính sinh học ổn định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lân Dũng, 1993.
Bảo tàng giống (tài liệu lưu hành nội bộ)
2. Nguyễn Thị Lan Phương, Hồng Huỳnh Ánh, 1995.
Giữ chủng thử thách ho gà 18323 trong nitor lỏng thay thế chủng đông khô.
Tạp chí vệ sinh phòng dịch, tậpV, số 2 (20), 1995
3. Malik K.A, 1988.
A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. Journal of Microbiological method 8 (1988) 259-271
4. Malik K.A, 1991.
Maintenance of microorganism by simple methods. In Maintenance of microorganism 2nd 122-131 Edn ISBN 012-4 10351-0
5. Rudge R.H, 1984.
Maintenance of bacteria by freeze drying In Maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods 24-44. Editor. B.E Kirsor and f.f.S, smell Academic press London 1984
6. Safronova V.I, N.T. Novikova, 1993.
Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation-lyophilization and liquid nitrogen freezing Research Institute for Agricultural Microbiology Russia. Tài liệu lưu hành nội bộ.

SOME METHODS FOR THE PRESEVATION OF NITROGEN- FIXING BACTERIA

Nguyen Kim Vu, et. al.

SUMMARY

The presevation of nitrogen-fixing bacteria by under mineral oil, lyophilization were compared at 4 or 25-30deg for 18 months. The result demonstrated that the survival rate of presevation of lyophilization were higher than that by under mineral oil. Lyophilizer was preferred method for nitrogen- fixing bacteria long term storage.

1.P.19

PHỐI HỢP CÁC CHỦNG VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITƠ VÀ VI KHUẨN HOÀ TAN PHOTPHAT ĐỂ NÂNG CAO HIỆU QUẢ CHẾ PHẨM PHÂN VI SINH VẬT

Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà,
Nguyễn Thị Thi, Hồ Kim Anh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Trên thế giới nhiều tác giả quan tâm đến sự phối hợp các chủng vi sinh vật có tác dụng khác nhau để tăng hiệu lực của chế phẩm phân bón vi sinh vật. Các công trình công bố cho thấy sự phối hợp giữa các chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và vi sinh vật hoà tan các hợp chất photphat thường cho hiệu quả tốt hơn khi dùng một chủng đơn lẻ. Thí dụ Puneet và cộng sự (7) nghiên cứu thấy nhiễm vi khuẩn cố định nitơ *Azotobacter* kèm với một số chủng nấm sợi có khả năng hoà tan photphat như *Asp. flavus* và *Asp. niger* đã tăng năng suất hạt 17,7%, trong khi nhiễm riêng *Azotobacter* chỉ tăng 9%. Kopoor và cộng sự (3) cũng đạt kết quả tương tự khi nghiên cứu sự phối hợp giữa các chủng *Azotobacter* với các vi khuẩn hoà tan photphat thuộc các chi *agrobacterium*, *Bacillus* và *Pseudomonas*. Kundu và Gaus (3) công bố hiệu quả tăng năng suất lúa và bông rõ hơn khi nhiễm cặp chủng *Pseudomonas striata* và *Asp. awamori* so với nhiễm từng chủng riêng rẽ.

Nhiều công trình đã thông báo hiệu quả phối hợp các nấm rễ (mycorrhizae) với các vi sinh vật phân giải photphat (1, 3, 9). Một số tác giả lại phối hợp vi khuẩn *Azotobacter* có khả năng cố định nitơ và sinh chất kích thích sinh trưởng cây- với vi khuẩn cố định nitơ hội sinh thuộc chi *Azospirillum* (2,8).

Tuy nhiên không phải cặp vi sinh vật có ích nào phối hợp với nhau cũng cho kết quả tốt hơn so với sử dụng chủng đơn lẻ. Thí dụ Belimov và cộng sự đã thông báo kết quả nhiễm hỗn hợp nấm rễ *G. introrhizales* 7 với từng chủng: *Azospirillum lipoferum* 137, *Flavobacter* L 30, *A. radiobacter* 10 lên lúa đại mạch không thấy tăng năng suất hơn so với khi nhiễm từng chủng riêng rẽ, mặc dù cả 4 chủng đều có tác dụng kích thích sinh trưởng và tăng năng suất cây rõ rệt so với đối chứng (1).

Vì vậy để có cơ sở khoa học cho việc phối hợp các cặp chủng vi sinh vật nhiễm cho cây trồng, cần phải nghiên cứu ảnh hưởng của sự phối hợp đó khi nhiễm vào cây so với đơn chủng.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

- Các chủng vi sinh vật lấy từ bộ sưu tập chủng của Phòng Vi sinh vật đất bao gồm: hai chủng vi khuẩn cố định nitơ có kí hiệu IIIe (mang những đặc điểm

phân loại theo API 20e của loài *Enterobacter aerogenes*) và chủng 4g (mang những đặc điểm của loài *E. cloacae*). Ba chủng vi khuẩn có khả năng hoà tan photphat khó tan : chủng RTL7 mang đặc điểm phân loại theo API 20E của loài *achromobacter* sp.; chủng RTL2.2, có đặc điểm của *Pseudomonas aeruginosa*, chủng DTL2.2, có đặc điểm của *Achromobacter* sp.

- Chế phẩm phân vi sinh vật nuôi cấy trên môi trường xốp theo phương pháp đã trình bày trong bài trước (4), có cải tiến cho phù hợp với các chủng vi khuẩn. Chế phẩm đạt mật độ 10^9 tế bào/ gam.
- Thí nghiệm trong chậu vại có đường kính 24 cm, cao 25 cm, chứa đất phù sa sông Hồng. Mỗi mẫu thí nghiệm lập lại 5 chậu trong mỗi vụ lúa. Mỗi chậu nhiễm 1g chế phẩm khi gieo mầm mạ và khi hồ rẫy mạ trước lúc cấy.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1. Tác dụng của sự phối hợp chế phẩm phân giải photphat RTL7 với các chế phẩm 4g và IIIe lên sinh trưởng và năng suất lúa Nếp mới

Vụ mùa	% tăng các chỉ tiêu	Mẫu chế phẩm			
		IIIe	IIIe+ RTL7	4g	4g + RTL7
Vụ mùa 1997	Tăng chiều cao mạ(%)	32,25	15,42	13,42	16,93
	Tăng trọng lượng mạ (%)	34,83	33,96	18,01	31,77
	Tăng trọng lượng hạt(%)	12,24	21,28	2,05	13,39
Vụ xuân 1998	Tăng chiều cao mạ(%)	7,28	12,98	5,8	7,47
	Tăng trọng lượng mạ(%)	19,34	10,88	5,74	10,27
	Tăng trọng lượng hạt(%)	42,70	36,20	18,11	20,54
Vụ mùa 1998	Tăng chiều cao mạ(%)	14,94	8,26	14,94	7,48
	Tăng trọng lượng mạ(%)	87,10	56,96	19,35	87,10
	Tăng trọng lượng hạt(%)	82,38	49,60	29,20	55,85

Hai chủng IIIe và 4g có khả năng cố định nitơ cao (5). Riêng chủng IIIe, ngoài khả năng cố định nitơ còn có khả năng hoà tan photphat khá tốt. Đã nghiên cứu thử nghiệm chế phẩm phân vi sinh vật của hai chủng nói trên nhiễm cho lúa qua 5 vụ trong chậu vại và trên đồng ruộng. Kết quả đã làm tăng năng suất lúa từ 7,12% trở lên, tùy điều kiện canh tác và giống lúa (kết quả đang được đăng in trong cùng hội nghị). Ba chủng vi khuẩn có khả năng hoà tan photphat đã được lựa chọn trong bộ sưu tập chủng (6). Kết quả thử nghiệm phối hợp các chủng vi khuẩn cố định nitơ với chủng hoà tan

photphat *Achromobacter* RTL7 được trình bày trong bảng 1. Lúa được nhiễm phối hợp 2 chủng IIIe và RTL7 không tăng năng suất so với khi nhiễm đơn chủng IIIe, thậm chí còn giảm năng suất. Có lẽ chủng IIIe đã có khả năng phân giải hợp chất photphat khó tan nên chủng RTL7 không phát huy được hiệu quả của mình. Nhưng nhiễm phối hợp 2 chủng 4g và RTL7 đã giúp tăng sinh trưởng mạ và năng suất lúa hơn hẳn so với sử dụng đơn chủng 4g trong cả 3 vụ thí nghiệm trong chậu vại.

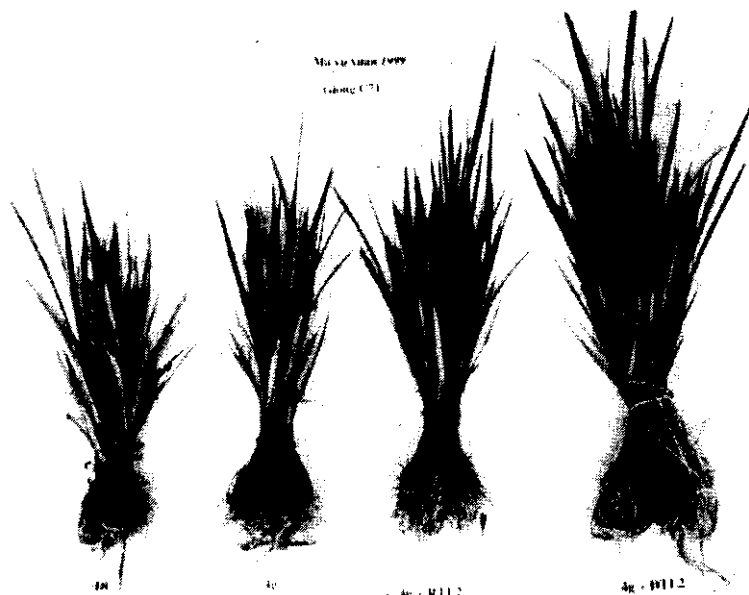
Trong 2 vụ lúa năm 1999, chúng tôi đã tiếp tục tuyển chọn cặp chủng giữa các chủng cố định nitơ nói trên và 2 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ tốt: RTL2.2 và ĐTL2.2. Kết quả trình bày trong bảng 2:

Bảng 2. Tác dụng của việc nhiễm phối hợp các chế phẩm phân giải photphat RTL2.2 và ĐTL2.2 với các chế phẩm cố định nitơ

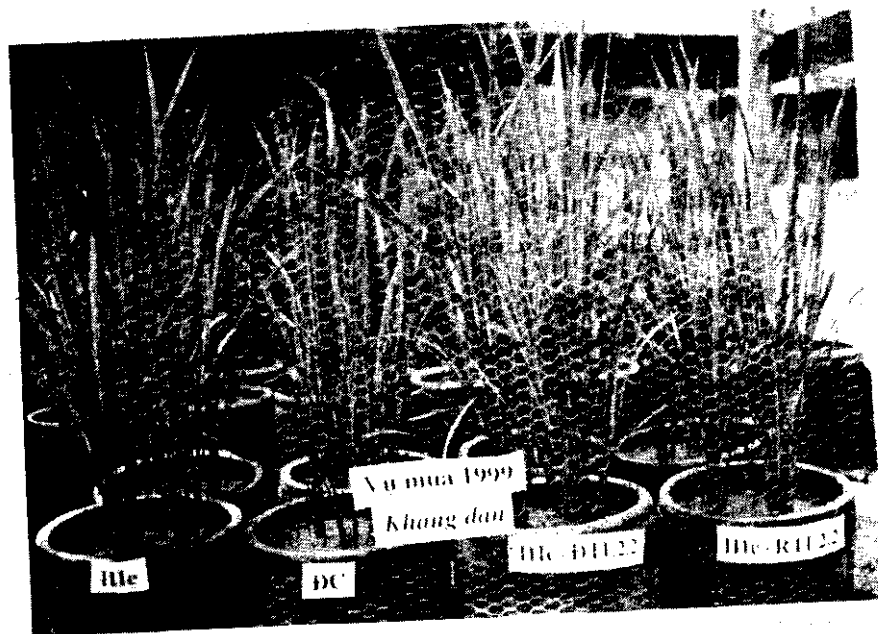
Chế phẩm	Vu Xuân 1999 (giống C 71)			Vu mùa 1999 (giống Khang Dân)	
	Tăng cao mạ (%)	Tăng trong mạ (%)	Tăng trong hạt (%)	Tăng cao mạ (%)	Tăng trong mạ (%)
IIIe	0,34	18,87	72,16	27,46	39,41
IIIe + RTL2.2	3,46	-2,83	74,15	28,88	31,82
IIIe + ĐTL2.2	4,91	23,58	121,31	28,00	47,96
4g	5,28	22,64	71,86	28,17	42,60
4g + RTL2.2	2,64	22,64	71,88	23,96	40,82
4g + ĐTL2.2	20,21	74,53	179,26	25,74	46,99

Kết quả trong bảng 2 cho thấy các thí nghiệm nhiễm hỗn hợp chủng 4g + RTL2.2 và IIIe + RTL2.2 đều không có hiệu quả hơn so với sử dụng các chủng 4g và IIIe riêng rẽ.

Nhưng chủng ĐTL2.2 nhiễm phối hợp với từng chủng 4g hoặc IIIe đều làm tăng sinh trưởng mạ và năng suất hạt hơn so với sử dụng đơn chủng cố định nitơ. Các cây mạ nhiễm hỗn hợp này đều mập hơn hẳn so với nhiễm riêng rẽ, thí dụ mạ C71 nhiễm hỗn hợp 4g + ĐTL2.2 tăng 74,53% trọng lượng mạ trong khi nhiễm riêng 4g chỉ tăng 22,64% trọng lượng so với đối chứng (xem ảnh 1). Những mẫu lúa được nhiễm hỗn hợp chủng cố định nitơ với ĐTL2.2 đều đẻ nhánh nhiều hơn so với nhiễm đơn chủng (xem ảnh 2 và 3). Vụ xuân 1999, lúa C71 thử nghiệm trong chậu, nhiễm hỗn hợp IIIe + ĐTL2.2 tăng 121,31% trọng lượng hạt so với đối chứng, còn nhiễm riêng IIIe tăng 72,16%; nhiễm hỗn hợp 4g + ĐTL2.2 tăng 179,26% so đối chứng còn nhiễm riêng 4g tăng 71,86%.



Ảnh 1. Mạ C71 - Vụ xuân 1999



Ảnh 2, 3. Lúa Khang Dân đang đẻ nhánh

II. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu ảnh hưởng của việc nhiễm phối hợp giữa các chủng vi khuẩn cố định nitơ với các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải hợp chất photphat khó tan lên lúa trong điều kiện trồng trong chậu vại. Kết quả bước đầu cho thấy:

- Phối hợp chủng phân giải photphat RTL2.2 với từng chủng IIIe hoặc 4g không tốt hơn khi nh.ễm riêng IIIe hoặc 4g.
- Phối hợp nhiễm chủng phân giải photphat RTL7 với chủng 4g làm tăng sinh trưởng và năng suất hạt lúa hơn so với dùng riêng chủng 4g. Còn cặp chủng RTL7 + IIIe lại có tác dụng kém hơn so với dùng riêng chủng IIIe.
- Chủng phân giải photphat ĐTL2.2. phối hợp với cả 2 chủng 4g và IIIe đều có tác dụng tốt đối với sinh trưởng mạ và lúa. làm tăng năng suất lúa hơn hẳn so với nhiễm riêng các chủng cố định nitơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Belimov A.A., Xêrêbrênhikôva N. V., Xtêpanôk., 1999.
Vzaimodeystvie axôtixiativnuk bakterii i endomikoriznovo griba x yatrmenhiem pri xovmextvoi inokuliatxii. Mikrob. 68 (1) (1999) 122- 126
2. Elshanshoury A.R., 1995.
Interactions of Azotobacter chroococcum, Azospirillum brasilense & Streptomyces mutabilis in relation to their effect on wheat development. J. Agron. & Crop. Scien. 175 (2) (1995) 119- 127
3. Kapoor K.K., 1996.
Phosphate mobilization through soil microorganisms. Plant Microb. Interaction in sustainable Agriculture. Eds: R.K. Behl, A.L.Khurana, R.C.Dogra. CCCHAU, Hisar&MMB, New Dehli, 46- 61
4. Nguyễn Thị Phương Chi, Lý Kim Bảng, 1989.
Sản xuất Rizôda- chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ cho đậu tương trên môi trường than bùn. Sinh học 11 (6) (1989) 26- 28
5. Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, Hà Hồng Thanh, Nguyễn Ngọc Dũng, 1996.
Tác dụng của các chủng *Enterobacter* lên sinh trưởng của cây ngô non và mạ lúa. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học 1995. NXB KH&KT, 92- 98
6. Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Phương Chi, 1997.
Phân loại và tìm hiểu khả năng sinh axit hữu cơ của một số chủng phân giải hợp chất photphat khó tan. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học 1996. NXB KH&KT, 107- 113

7. Puneet K. Sohal, R.P. Gupta, M.S. Pandher, 1998.

Effect of inoculation of *Azotobacter* and PSM on fertilizer economy, plant growth & yield of winter maizer. Nitrogen Fixation with Non- Legumes. Kluwer Academ. publishers. Eds: Kauser A. Malik, M. Sajjad Mirza, J.K. Ladha, 271- 273

8. Rashid A., M.R. Sajjad, M.A. Gill, M.S. Cheema, M. S. Sindhu, N.M. Nayyar, 1998.

Response of wheat to an associative diazotroph inoculum under different rates of nitrogen fertilizer. Nitrogen Fixation with Non- Legumes. Kluwer Academ. publishers. Eds: Kauser A. Malik, M. Sajjad Mirza, J.K. Ladha, 95- 97

9. Toro M., Azron R, Herrera R., 1996.

Effects on yield and nutrition of micorhizal and nodulated pueratia phaseoloides exerted by phosphate solubilizing rhizobacteria. Biol. & Fertil. Soils 21 (1996) 23- 29

COMBINE NITROGEN-FIXING BACTERIA WITH PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA TO INCREASE MICROFERTILIZER'S EFFECT

Nguyen Thi Phuong Chi, Pham Thanh Ha,
Nguyen Thi Thi, Ho Kim Anh, Nguyen Thi Quynh Mai

SUMMARY

The results of the pot experiments showed as follow:

- *When rice was inoculated with the nitrogen fixing bacteria E.cloacae 4g or E. aerogenes IIIe, the additional introduction of the phosphate solubilizing bacteria Pseudomonas aeruginosa RTL2.2 had not the better affect than single inoculation.*
- *Inoculation of rice with the phosphate solubilizing bacteria Achromobacter sp. RTL7 together E. cloacae 4g increased the growth and the grain yields by comparison with single. However no synergistic effect between fertilizer of strain RTL7 and IIIe over single culture of strain IIIe.*
- *Coinoculation phosphate solubilizing bacteria DTL2.2. and nitrogen fixing bacteria strains 4g or IIIe have the additive effects on the growth and grain yield of rice*

1.P.20

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC NGUỒN NITƠ LÊN KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI PHỐTPHÁT KHÓ TAN CỦA HAI CHỦNG NẤM SỢI MN1 VÀ ĐT1*

Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Phương Chi

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Vi sinh vật đất nói chung và nấm sợi nói riêng đóng vai trò quan trọng trong sự chuyển hóa photpho (P) để sử dụng cho cây từ nguồn P sẵn có trong đất cũng như P không tan bổ sung vào như quặng photphát

Vi sinh vật đất có thể phân giải photphát khó tan bởi những cơ chế có liên quan đến sự sản sinh axit hữu cơ hoặc axit vô cơ, sự tạo mùn hoặc những phản ứng trao đổi [3]

Theo tổng quan của Kapoor [2] nitơ được xem là một trong những nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phân giải photphát. Vi sinh vật có hoạt tính phân giải photphát khác nhau khi sử dụng những nguồn nitơ khác nhau. *Pseudomonas striata* được tìm thấy có khả năng sử dụng urea, asparagine, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , KNO_3 và $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ cho sự phân giải quặng photphát. Tuy nhiên nó không có khả năng sử dụng NaNO_3 . Còn NaNO_3 và peptone được phát hiện là nguồn nitơ tốt hơn $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hoặc urea cho sự phân giải photphát bởi *Bacillus megaterium var phosphaticum*. *Aspergillus awamori* phân giải photphát tối đa khi có mặt NH_4NO_3 , còn *Penicillium digitatum* lại có hoạt tính tốt nhất với nguồn nitơ trong môi trường là NaNO_3 [2]

Ảnh hưởng của một số nguồn nitơ lên hoạt tính phân giải P khó tan của nấm mốc được chúng tôi tìm hiểu để tìm những nguồn dinh dưỡng thích hợp cho sinh trưởng và khả năng phân giải photphát tối đa của chúng.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vi sinh vật

Hai chủng nấm mốc MN1 và ĐT1 được lấy từ bộ sưu tập các chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải photphát khó tan của phòng Vi sinh vật đất - Viện Công nghệ Sinh học. Hai chủng này đã được GS Bùi Xuân Đồng - Trường Đại học Dược Hà Nội phân loại, mang tên loài:

* Bài được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của chương trình nghiên cứu khoa học cơ bản trong KHTN Đề tài mã số 6.2.6

- + *Aspergillus awamori* Nakazawa MN1
- + *Penicillium cyaneofulvum* Biourge DT1

2. Nuôi cấy

Môi trường dịch thể được cấy đồng đều 2ml x 10^8 bào tử mốc / 50ml môi trường.

Thành phần môi trường dựa trên môi trường Czapek nhưng có cải tiến: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0,5% được dùng làm nguồn photphát khó tan trong tất cả các thí nghiệm. Các nguồn nitơ được sử dụng: KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , urea, peptone (nguồn N hữu cơ).

Các nuôi cấy được thực hiện ở 30°C ở trạng thái lắc với tốc độ lắc 200 vòng/phút và ở trạng thái tĩnh. Sau 3, 6, 9, 12, 15 ngày nuôi cấy, tiến hành phân tích dịch nuôi.

3. Phương pháp phân tích

Sinh trưởng của nấm được xác định bằng phương pháp xác định sinh khối [1]

Xác định khả năng sinh axit của chủng bằng 2 cách :

- pH dịch nuôi được xác định bằng máy đo pH - meter
- Chuẩn độ axit trong dịch nuôi bằng NaOH 0,1N [1].

Hàm lượng P tan trong dịch nuôi cấy được xác định bằng phương pháp so màu ở bước sóng $\lambda = 620$ nm dựa trên phản ứng hỗn hợp xanh molybđat [5]. Lượng P tan tính toán dựa vào đường chuẩn được thiết lập theo dung dịch KH_2PO_4 .

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hai chủng nấm mốc MN1 và DT1 được đi sâu nghiên cứu vì có hoạt tính phân giải photphát khó tan cao và có khả năng sử dụng nhiều nguồn quặng apatít và photphorit [4]. Các kết quả phân tích đã cho thấy khả năng hoà tan photphát của 2 chủng này không giống nhau khi sử dụng những nguồn nitơ khác nhau.

Lượng P tan tối đa trong môi trường được trình bày trong bảng 1.

Qua bảng 1 có thể thấy khi nuôi cấy trong 7 nguồn nitơ khác nhau thì chủng MN1 đều thể hiện hoạt tính phân giải photphát cao hơn chủng DT1 trong 6 nguồn, chỉ có trên nguồn peptone chủng DT1 mới thể hiện hoạt tính cao hơn.

Kết quả thu được cho thấy đối với chủng MN1, nguồn nitơ để thể hiện hoạt tính phân giải photphát tốt nhất là KNO_3 , NaNO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Khi sử dụng NH_4NO_3 và NH_4Cl hoạt tính phân giải photphát giảm. Nguồn urea không phù hợp lắm cho hoạt động phân giải photphát và nguồn peptone là kém nhất.

Đối với chủng DT1, nguồn nitơ tốt nhất cho phân giải photphát là NH_4Cl và đặc biệt khi ở chế độ nuôi cấy tĩnh lượng P hoà tan trong môi trường có thể đạt tới 1040 mg/l. Sau đó đến $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NH_4NO_3 . Đối với những nguồn nitrat: KNO_3 và NaNO_3 nó thể hiện hoạt tính phân giải photphát kém hơn. Khi dùng nguồn peptone và nguồn urea hoạt tính thể hiện kém nhất.

Bảng 1. Khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ tối đa của MN1 và ĐT1 trên môi trường sử dụng những nguồn nitơ khác nhau

Nguồn N	Chế độ nuôi cấy	MN1		ĐT1	
		Thời gian nuôi cấy (ngày)	P tan max (g/l)	Thời gian nuôi cấy (ngày)	P tan max (g/l)
KNO_3	Tĩnh	15	980,00	12	230,00
	Lắc	15	1082,50	15	307,00
NaNO_3	Tĩnh	15	1040,00	12	114,00
	Lắc	12	987,30	15	285,00
NH_4NO_3	Tĩnh	12	430,00	12	585,00
	Lắc	9	487,50	15	226,50
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Tĩnh	15	932,50	15	606,25
	Lắc	12	1025,00	15	280,00
NH_4Cl	Tĩnh	9	543,75	15	1040,00
	Lắc	6	852,50	15	436,00
Urea	Tĩnh	15	163,33	12	76,00
	Lắc	15	125,00	15	98,70
Peptone	Tĩnh	6	43,30	6	85,30
	Lắc	15	56,00	12	100,00

Như vậy là nguồn peptone và nguồn urea được coi là không phù hợp cho hoạt động phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của cả 2 chủng này.

Khi có mặt NO_3^- , chủng MN1 hoạt động phân giải photphát tốt hơn khi có mặt NH_4^+ còn ĐT1 thì ngược lại. Điều này có thể do 2 chủng này có những cơ chế phân giải photphát khó tan khác nhau.

Theo dõi sự biến động P tan trong quá trình nuôi cấy đã nhận thấy trên nguồn KNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và peptone lượng P hoà tan trong môi trường bởi chủng MN1 ở chế độ nuôi lắc cao hơn nuôi tĩnh. Ở những nguồn nitơ còn lại, chủng MN1 hoà tan photphát ở nuôi tĩnh cao hơn nuôi lắc. Còn chủng ĐT1 được nuôi trong môi trường chứa KNO_3 , NaNO_3 , urea và peptone lượng P tan khi nuôi lắc cao hơn nuôi tĩnh, nhưng đòi hỏi thời gian dài hơn. Với những nguồn nitơ còn lại thì P tan ở nuôi tĩnh cao hơn nuôi lắc. Như vậy khi sử dụng những nguồn nitơ khác nhau chế độ nuôi cấy ảnh hưởng khác nhau đến hoạt tính phân giải photphát của 2 chủng này. Nhìn chung chủng ĐT1 phân giải Ca_3PO_4 trong điều kiện nuôi cấy tĩnh tốt hơn so nuôi lắc với

các nguồn nitơ phù hợp (NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3). Từ đó đưa tới suy nghĩ chủng ĐT1 có thể sử dụng để phân giải hợp chất photphát khó tan trong những điều kiện không cần thông khí mạnh như chủng MN1.

Kết hợp số liệu của bảng 1 và bảng 2 có thể thấy sinh khối của cả 2 chủng đều đạt tối đa trước khi đạt hoạt tính phân giải photphát cao nhất khi nuôi cấy trong các nguồn nitơ khác nhau. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của E. Nahas và cộng sự [3].

Các kết quả về sự sinh trưởng tối đa của 2 chủng nấm mốc được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của những nguồn nitơ khác nhau lên sinh trưởng tối đa của MN1 và ĐT1

Nguồn N	Chế độ nuôi cấy	MN1		ĐT1	
		Thời gian nuôi cấy (ngày)	TLK* của sợi nấm max (g/l)	Thời gian nuôi cấy (ngày)	TLK* của sợi nấm max (g/l)
KNO_3	Tĩnh	9	13,21	3	10,69
	Lắc	6	13,78	3	13,44
NaNO_3	Tĩnh	9	14,19	6	12,10
	Lắc	12	17,25	9	16,04
NH_4NO_3	Tĩnh	9	11,90	6	11,25
	Lắc	6	12,69	9	13,66
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Tĩnh	12	15,68	15	15,28
	Lắc	6	17,42	15	15,49
NH_4Cl	Tĩnh	6	9,63	9	11,72
	Lắc	9	14,59	9	11,89
Urea	Tĩnh	15	11,08	12	1,64
	Lắc	6	13,56	3	2,70
Peptone	Tĩnh	3	12,71	15	9,76
	Lắc	3	18,99	15	9,85

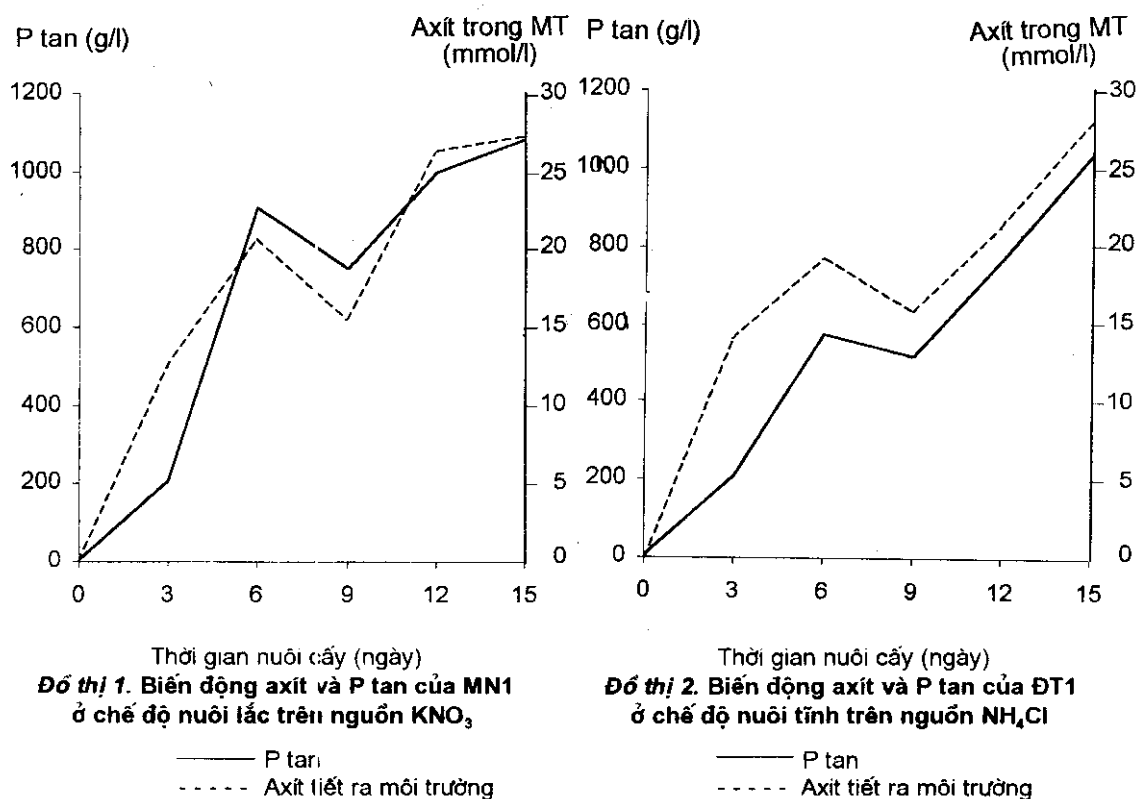
TLK*: Trọng lượng khô tuyệt đối

Bảng 2 cho thấy chủng MN1 nói chung có thể sử dụng cả 7 nguồn nitơ cho sinh trưởng. Còn chủng ĐT1 chỉ sinh trưởng tốt trên 5 nguồn nitơ, nguồn peptone thể hiện sinh trưởng yếu hơn và không thích hợp với việc sử dụng nguồn urea cho sinh trưởng.

Nuôi cấy cả 2 chủng MN1 và ĐT1 ở chế độ nuôi lác thường thu được sinh khối nhiều hơn khi nuôi tĩnh. Hiện tượng này có thể do trong quá trình sinh trưởng sợi nấm thường có nhu cầu cao về ôxy.

Nhiều tác giả: Kapoor[2], Cunningham & Kuiack[1], Cerezine và cộng sự [3] đều cho rằng phần lớn các chủng nấm sợi có khả năng phân giải mạnh các hợp chất photphat khó tan là nhờ axit hoá môi trường. Vì vậy đồng thời với việc đo sự phân giải photphat và sinh trưởng nấm theo thời gian chúng tôi tìm hiểu sự thay đổi pH môi trường và lượng axit tiết ra.

Đồ thị 1,2 minh hoạ cho mối tương quan giữa khả năng sinh axit trong môi trường và lượng P tan của MN1 và ĐT1 trên nguồn nitơ tốt nhất, ở chế độ nuôi cấy tốt nhất cho quá trình phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.



Chủng MN1 trên nguồn KNO_3 thể hiện hoạt tính phân giải photphat cao nhất khi ở chế độ nuôi lác. Còn chủng ĐT1 lại thể hiện hoạt tính phân giải photphat cao nhất trên nguồn NH_4Cl khi ở chế độ nuôi tĩnh. Như vậy là nhu cầu về ôxy cho hoạt động phân giải photphat của chủng ĐT1 không cao, điều này rất có ý nghĩa trong việc đưa chủng này trở lại môi trường đất.

Cả 2 đồ thị đều cho thấy luôn có sự tương quan tỉ lệ thuận giữa lượng axit sản ra môi trường và sự phân giải photphat. Mối tương quan này luôn thể hiện trong mọi thí nghiệm của cả 2 chủng với các nguồn nitơ khác nhau.

III. KẾT LUẬN

Nghiên cứu ảnh hưởng của 7 nguồn nitơ: KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , urea và peptone lên khả năng phân giải photphát của *A. awamori* Nakazawa MN1 và *P. Cyaneofulvum* Biourge DT1 đã thu được những kết quả sau:

- Peptone và urea không phù hợp cho hoạt động phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của cả 2 chủng MN1 và DT1.
- KNO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là những nguồn nitơ tốt nhất cho môi trường nuôi chủng MN1 tạo khả năng phân giải photphát cao. Còn đối với chủng DT1 là NH_4Cl .
- Nói chung khi nuôi cấy ở các nguồn nitơ thích hợp, cả 2 chủng đều có sinh khối tối đa trước khi đạt hoạt tính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cao nhất.
- Động thái phân giải của cả 2 chủng có mối tương quan thuận với sự axit hoá của môi trường nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. James E., 1992.

Cunningham and Cathy Kuiack. Production of citric and oxalic acids and solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilaii*. Applied & environ. Microbiol. 58,(5), 1451-1458

2. Kapoor K. K., 1996.

Phosphate mobilization through soil microorganisms. Plant Microbe Interaction in Sustainable Agriculture. CCS HAU, Hisar & MMB, New Delhi, 46-61.

3. Nahas. E, Banzatto. D.A, Assis L.C., 1990.

Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. Soil Biol. Biochem. 22, (8), 1097-1101.

4. Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, Hà Hồng Thanh, 1997.

Khả năng chuyển hoá các hợp chất photphát khó tan của chủng *Aspergillus awamori* Nakazawa MN1. Tạp chí Sinh học. 19,(2), 68-73.

5. Phương pháp phân tích nước thiên nhiên (tiếng Nga). NXB "Nauka", Maxkôva.

THE INFLUENCE OF NITROGEN RESOURCES ON THE PHOSPHATE DISSOLVING ABILITY OF TWO FUNGI STRAINS MN1 AND ĐT1

Pham Thanh Ha, Nguyen Thi Phuong Chi

SUMMARY

*The influence of 7 nitrogen resources: KNO_3 , $NaNO_3$, NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl , urea and peptone on the phosphate dissolving of *Aspergillus awamori* Nakazawa MN1 and *Penicillium cyaneofulvum* Biourge ĐT1 have been studied. The results showed that: peptone and urea are not suitable with phosphate dissolving activity of the strains MN1 and ĐT1. The best nitrogen resources of strain MN1 to phosphate solubilization are KNO_3 , $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$; but of strain ĐT1 is NH_4Cl . The dynamic of phosphate solubilizing activity of both strains is related with the acidosis of culture supernate.*

Địa chỉ liên hệ: Phạm Thanh Hà

Phòng Vi sinh vật đất - Viện Công nghệ Sinh học

Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia

Đường Hoàng Quốc Việt - Cầu Giấy - Hà Nội.

1.P.21

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG VÀ KHẢ NĂNG TÍCH TỤ SINH HỌC CỦA Cr VÀ V TRÊN PHA NẤM MEN CÁC LOÀI TUYẾT NHỈ *Tremella* spp. BẰNG KỸ THUẬT HẠT NHÂN

Lê Thị Đình, Phan Thị Thu Hương,

Nguyễn Văn Toàn, Nguyễn Giảng, Lê Xuân Thám

PHÒNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC, VIỆN NGHIÊN CỨU HẠT NHÂN, ĐÀ LẠT

Theo Anderson et al. (1978), cách nay gần 150 năm, Herepath (1854) đã dùng nấm men bia (Brewers Yeasts) như một nguồn Cr hữu cơ phong phú, có hiệu quả trong điều trị bệnh tiểu đường (Diabetes). Tuy nhiên mãi đến 1959, thành phần hoạt chất cơ bản trong nấm men, có hiệu quả đối với bệnh tiểu đường, chính là một hợp chất hữu cơ của Cr, mới được xác định (Mertz & Schwarz, 1959). Doisy et al. (1976) đã nghiên cứu hiệu lực của chất chiết nấm men bia *Saccharomyces carlsbergensis*, có hoạt tính tiềm tàng kiểu insulin, với 14 đối tượng trên 65 tuổi có mức dung nạp glucose bất thường. Liu et al. (1977) cũng báo cáo rằng bổ sung cao nấm men vào chế độ ăn kiêng cho 15 phụ nữ cao đường huyết cho thấy kết quả cải thiện mức dung nạp glucose. Đáng chú ý là trong cả hai thực nghiệm nêu trên, mức giải phóng insulin nội sinh và mức thiếu hụt cholesterol và triglycerides huyết thanh đều giảm xuống. Do vậy, Toepfer et al. (1977), Anderson et al. (1978),... đã nghiên cứu làm giàu sinh học Cr vào sinh khối nấm men (lên men dịch thể), để thu nhận các hoạt chất hữu cơ chứa Cr có hiệu quả, đặc biệt đã áp dụng đồng vị phóng xạ ^{51}Cr , xác định chính xác quá trình tích tụ Cr.

Nhiều loài nấm men, chẳng hạn như *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, nấm *Neurospora crassa*,... còn được dùng để nghiên cứu tác dụng sinh học Vanadium, do đặc tính tương tác mạnh của V với các hệ enzyme trao đổi DNA, RNA, ATPases (Bowman & Slayman, 1978; Cantley et al., 1978; Sakurai et al., 1980; Sabbioni et al., 1983). Đã có những báo cáo về tương tác của các hợp chất V với hệ enzyme sao chép HIV, tương tác glycolytic kiểu insulin và không insulin (Hori & Oka, 1980; Bosch et al., 1987; Barbeau et al., 1997), để hướng tới bào chế biệt dược. Tuy nhiên, nấm men, tự chúng chưa phải là nguồn dược liệu, dù rất giàu dinh dưỡng, thêm nữa quá nhạy cảm với V.

Chúng tôi đã kiểm tra khả năng làm giàu Cr và V vào nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Karst., bằng phân tích kích hoạt neutron, ICP và đánh dấu đồng vị phóng xạ ^{51}Cr trên Lò Phản ứng hạt nhân Đà Lạt, ^{48}V trên máy gia tốc Cyclotron AVF Takasaki, Nhật Bản (Lê Xuân Thám, Tamikazu Kume, 1997; Lê Xuân Thám, 1998; Le Xuan Tham et al, 1999). Do đó, trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu thử nghiệm công nghệ làm giàu sinh học Cr và V vào sinh khối lên men các loài

nấm Tuyết nhĩ (Ngân nhĩ) *Tremella* spp., nhằm tăng cường hơn nữa giá trị dược liệu của các loài nấm quý giá này.

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tám loài nấm Tuyết nhĩ (ở miền Bắc thường gọi là Ngân nhĩ) nhận được từ Viện Công nghệ lên men Osaka, Nhật Bản (do Dr. Tamikazu Kume, Trung tâm Nghiên cứu Hóa phóng xạ Takasaki, cung cấp), ở pha nấm men (Yeast Phase), đã được khảo sát:

Tremella aurantia Schweinitz: Fr., *T. brasiliensis* (Moeller) Lloyd, *T. encephala* Per., *T. foliacea* Fr., *T. fuciformis* Berk., *T. mesenterica* Fr., *T. samoensis* Lloyd, *T. subanomala* Coker.

Tái thuần khiết trên môi trường PDA, nhân giống trên môi trường PGA, lưu giữ trong lạnh 8°C (từ 3 đến 6 tháng tiến hành cấy truyền định kỳ sang môi trường mới).

2. Phương pháp

- Kiểm tra tốc độ lên men sinh khối trên môi trường PGA và môi trường lỏng cải tiến từ môi trường của Viện Lên men Osaka IFO (1984). Từ đó chọn ra 4 loài có khả năng tạo sinh khối mạnh nhất.
- Kiểm tra tác động của Cr và V lên sinh trưởng của pha nấm men 4 loài Tuyết nhĩ đã chọn lọc, xác định trị số LG 50, từ đó chọn tiếp ra loài có triển vọng nhất, theo kỹ thuật chúng tôi đã áp dụng cho nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* (Lê Xuân Thám, 1998).
- Kiểm tra khả năng tích tụ sinh học Cr và trong lên men dịch thể *T. encephala*, với môi trường bổ sung 50 ppm Cr (dạng $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$), và 10 ppm V (dạng NH_4VO_3), trong vòng 15 ngày, bằng kỹ thuật phân tích kích hoạt neutron trên Lò Phản ứng hạt nhân Đà Lạt, theo qui trình chuẩn của IAEA (L'Annunziata, 1979; Czauderna et al., 1996a,b). Chiếu xạ tại mâm quay 6 giờ, để nguội 7-10 ngày (cho xác định Cr) và trên kênh tiếp tuyến (đo tức thời cho xác định V) trên Lò phản ứng, ghi và phân tích phổ (bằng hệ Multichannel với Detector Ge siêu tinh khiết. Từ đó tính ra hiệu suất làm giàu sinh học.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đặc điểm pha nấm men của các loài Tuyết nhĩ *Tremella* spp.

1. Đặc điểm hình thái tế bào

Các loài Tuyết nhĩ ở pha nấm men được đặc trưng đơn bào hình cầu-hình trứng, màng khá mỏng, trong suốt, đôi khi có các hạt nội chất lớn nhỏ, và đều có sinh sản vô tính nảy chồi điển hình: các pha nhú chồi, chuẩn bị tách tế bào,...

Pha nấm men (Yeast state) thể hiện phong phú ở nhiều nhóm nấm thượng đẳng. Sugiyama & Su (1994), Sjamsuridzal et al. (1997) và đặc biệt Sugiyama (1998), dựa trên các dẫn liệu phân tử DNA (cấu trúc gene ribosom) có so sánh với đặc điểm cấu trúc của nấm và vách ngăn tế bào, chỉ ra quan hệ chủng loại phát sinh của các nhóm nấm nang và nấm đảm có pha nấm men, trong đó có các loài Tuyệt nhĩ (Ascomycetous, Basidiomycetous Yeasts). Sự chuyển hoá giữa pha nấm men và pha nấm đảm của các loài Tuyệt nhĩ được quyết định bởi hệ mycohormon đặc biệt: hormon sinh sản Tremorgen A-10 và a-13, và bởi các yếu tố giới tính của tản (Sakagami et al., 1981; Fox & Wong, 1989).

Mới gần đây nhất, Sjamsuridzal et al. (1999) đã chứng tỏ mối quan hệ rất gần gũi giữa nấm rỉ (Rust fungi) với nhiều nhóm nấm đảm có pha nấm men: *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp., *Sporidiobolus* spp., *Mixia* spp., *Bensingtonia* spp., *Agricostilbum* spp., *Sakaguchia* spp., *Ustilago* spp.,.... Tính thống nhất của giới nấm là hoàn toàn rõ ràng.

2. Sinh trưởng của các loài Tuyệt nhĩ

Kiểm tra khả năng sinh trưởng trong nuôi cấy thuần khiết cho thấy trong 8 loài nghiên cứu có 4 loài tỏ ra tăng trưởng khá mạnh (bảng 1), đặc biệt là *T. encephala* và *T. fuciformis*.

Từ kết quả trên đây, chúng tôi chọn ra 4 loài có khả năng sinh trưởng tốt và rất tốt cho các thử nghiệm tiếp theo. Kiểm tra tốc độ mọc của khuẩn lạc trên môi trường PGA bằng phương pháp đo đường kính khuẩn lạc và đặc biệt kết quả xác định sự gia tăng sinh khối trong lên men dịch thể được trình bày trên bảng 2.

Bảng 1. Khả năng tăng trưởng của các loài Tuyệt nhĩ *Tremella* spp.

Loài	Mức tăng trưởng tương đối
1. <i>T. aurantia</i> Schweinitz: Fr	+ trung bình
2. <i>T. brasiliensis</i> (Moeller) Lloyd	+++ rất tốt
3. <i>T. encephala</i> Per	+++ rất tốt
4. <i>T. foliacea</i> Fr.	+ trung bình
5. <i>T. fuciformis</i> Berk.	+++ rất tốt
6. <i>T. mesenterica</i> Fr	++ tốt
7. <i>T. samoensis</i> Lloyd	-- rất yếu
8. <i>T. subanomala</i> Coker	- yếu

Bảng 2. Sinh trưởng của 4 loài Tuyến nhĩ chọn lọc
(sinh khối lên men trong 100 ml: mg chất khô, tính trung bình trên 5 mẫu lặp lại)

Loài	Thời gian lên men tính (ngày)			
	5	10	15	20
<i>T. encephala</i>	53.1	88.3	240.6	317.1
<i>T. brasiliensis</i>	52.3	87.2	180.3	254.5
<i>T. fuciformis</i>	41.5	83.2	172.3	216.4
<i>T. mesenterica</i>	30.1	79.4	143.4	185.0

Như vậy, *T. encephala* có khả năng tăng trưởng trong lên men dịch thể mạnh hơn cả. Do đó, chúng tôi chọn *T. encephala* làm đối tượng chính cho lên men tích tụ Cr.

2. Tác động của Chromium và Vanadium trên pha nấm men các loài Tuyến nhĩ

Khảo sát tác động của Cr trên 4 loài Tuyến nhĩ chọn lọc trên đây cho thấy phản ứng rất giống nhau: mức ức chế sinh trưởng khoảng 50% (LG 50) khá đồng nhất giữa các loài ở 1000 ppm Cr; mức bắt đầu gây ức chế là vào khoảng 200 ppm; to 100 ppm trở xuống không thấy ức chế. Bảng 3 trình bày kết quả đánh giá trên *T. encephala*.

Bảng 3. Tác động của Cr lên pha nấm men Tuyến nhĩ *T. encephala*
(đường kính khuẩn lạc: mm, trắc nghiệm Student, P = 0.05)

Nồng độ Cr (ppm)	Thời gian lên men trên môi trường PGA (ngày)		
	5	10	15
0 (control)	25.0 ± 1.2	38.0 ± 1.5	40.5 ± 1.9
50	25.0 ± 1.5	37.5 ± 1.4	40.5 ± 2.8
100	25.0 ± 1.3	38.0 ± 1.6	40.5 ± 1.8
200	24.5 ± 1.7	35.0 ± 0.7	ức chế nhẹ
500	21.4 ± 1.6	31.5 ± 0.5	ức chế rõ
1000	19.0 ± 1.0	34.5 ± 0.8	ức chế nặng

Mức độc tính của V được xác định trên bảng 4, trị số LG 50 đạt vào khoảng 100 ppm.

Bảng 4. Tác động của V lên pha nấm men Tuyến nhĩ *T. encephala*
(sinh khối khô: mg/100ml)

Nồng độ V (ppm)	0	10	20	50	100
Trọng lượng	42.83	41.90	40.02	38.12	28.58
% so với đối chứng	100	97.83	93.44	89.00	66.73

Cho đến nay, còn ít công trình về hấp thu và độc tính kim loại trên nấm men. Chỉ mới có báo cáo về kim loại nặng: Cu, Cd, V, Zn, Th, Te, Co, Sb,... trên *Neurospora crassa*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* (Bowman & Slayman, 1979; Ulaszewski et al., 1987; Czauderna et al., 1996a,b; Howlett & Avery, 1997) chưa thấy có báo cáo về tác động của Cr lên nấm nói chung và nấm men nói riêng. Những công trình về lên men *Saccharomyces cerevisiae* và *S. carlsbergensis* trên môi trường bổ sung Cr còn chưa được đầy đủ. Nhìn chung mức độc tính của Cr trên pha nấm men Tuyết nhĩ *Tremella spp.* cao hơn so với hệ sợi nuôi cấy thuần khiết của nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* (trị số LG 50 ở vào khoảng 2000 ppm Cr ở dạng cation, gấp đôi so với *Tremella*, Lê Xuân Thám, 1998). Mức độc của V tỏ ra cao hơn (LG50 $\geq$ 100 ppm). Dưới 200 ppm Cr và 50 ppm V không thể hiện độc tính, do đó chúng tôi chọn mức an toàn 50 ppm Cr và 10ppm V cho lên men tích tụ Cr và V vào pha nấm men của *T. encephala*.

3. Khả năng tích tụ sinh học Cr và V trong lên men dịch thể Tuyết nhĩ

Sinh khối đơn bào *T. encephala* tăng liên tục trong 15 ngày lên men dịch thể. Bảng 5 cho thấy mức tích tụ Cr trong sinh khối thu hoạch cũng gia tăng rất cao ngay từ thời điểm đầu.

Bảng 5. Khả năng tích tụ Cr trong lên men dịch thể đơn bào *T. encephala*
(a: sinh khối khô, mg; b: hàm lượng Cr, ppm)

Nồng độ Cr bổ sung (ppm)	Thời gian lên men dịch thể (ngày)					
	5		10		15	
	a	b	a	b	a	b
0 (control)	53.0	Vết	88.0	Vết	210.0	3.3
50	51.5	8.08	82.8	5.20	200.0	4.81

Như vậy hiệu suất hấp thu-tích tụ Cr của nấm men Tuyết nhĩ *T. encephala* đạt khá cao, đặc biệt là trong 5 ngày đầu lên men, độ tập trung đạt tới 10-16 so với nồng độ trong môi trường, cao gấp 180-290 lần so với đối chứng, sau đó có xu hướng giảm dần. Kết quả này khá phù hợp với Anderson et al. (1978) khi xác định mức hấp thu tích tụ Cr cực đại ở *S. carlsbergensis* vào ngày thứ 5 sau khi lên men. Đặc tính trị liệu của nấm Tuyết nhĩ đã được báo cáo và tổng kết (Lin, 1993), hiệu quả điều trị bệnh tiểu đường của nấm men tích tụ Cr đã được xác nhận, nay cần phải xét đến giá trị y dược của các chế phẩm lên men giàu Cr của các loài nấm quý này.

Mức tích tụ V cũng đạt cực đại vào ngày thứ 5, sau đó giảm từ từ. Mức tích tụ thấp hơn so với Cr, điều đó liên quan đến độc tính cao hơn của V. Người ta đã chứng minh hiệu quả của V ức chế enzyme sinh tổng hợp Squalene, có vai trò trong quá trình tích đọng Cholesterol trên thành mạch máu, liên quan đến các chứng bệnh cao huyết áp, xơ cứng động mạch. Những kết quả khảo cứu hoạt tính kiểu insulin của các hợp chất V cho thấy mối liên hệ với bệnh tiểu đường. Do đó hoạt tính dược lý của nấm men Tuyết nhĩ làm giàu V sẽ được nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 6. Khả năng tích tụ V trong lên men dịch thể đơn bào *T. encephala*

(a: sinh khối khô, mg; b: hàm lượng V, ppm)

Nồng độ V bổ sung (ppm)	Thời gian lên men dịch thể (ngày)							
	3		5		7		10	
	a	b	a	b	a	b	a	b
0 (control)	28.5	-	52.0	-	57.0	-	96.4	-
10	32.3	30.2	58.5	76.4	69.8	68.3	97.6	50.3

Phương pháp phân tích kích hoạt neutron trên Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt cho kết quả rất đáng tin cậy vì độ nhạy (sensitivity) và độ chính xác (accuracy) xác định. Nói chung mẫu không cần phải phá hủy. Trên phổ phát xạ của mẫu, đỉnh (peaks) năng lượng phóng xạ của đồng vị ^{51}Cr (320 KeV) và ^{59}V (1434 Kev) tạo thành nổi bật lên trên nền năng phổ hạt nhân, đặc biệt là các mẫu sinh khối thu được trên môi trường có bổ sung Cr và từ đó dễ dàng tính toán định lượng với sai số chấp nhận được (hình 1,2,3,4,5,6).

So với kết quả áp dụng ^{51}Cr đánh dấu trong nghiên cứu làm giàu Cr vào nấm men bia *S.carlsbergensis* (Anderson et al., 1978), sinh khối nấm Tuyết nhĩ *T. encephala* có độ giàu Cr cao, và cao hơn nhiều nếu so với hiệu suất hấp thu-tích tụ Cr ở thể quả nấm Linh chi *G.lucidum* nuôi trồng trên cơ chất bổ sung Cr (cỡ 15 ppm), đánh dấu với ^{51}Cr (hiệu suất hấp thu đạt cỡ 7%), có thể so sánh với mức tích tụ Ge, Se xác định bằng INAA và đánh dấu ^{77}Ge và ^{75}Se (Lê Xuân Thám, 1998; Le Xuan Tham et al., 1999a,b). Đặc biệt, mức tích tụ V cũng cao hơn rõ rệt so với nấm Linh chi (gấp 5 lần). Song cũng như Anderson et al. (1978), Toepfer et al. (1977), hiện nay chưa xác định được tỷ lệ Cr và V tích tụ trong nội bào, đặc biệt là trong các phức có hoạt tính.

III. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Những đặc trưng pha nấm men đơn bào của 8 loài nấm Tuyết nhĩ (nấm Dâm) đã được xác định về hình thái tế bào, khả năng lên men rắn và dịch thể. Có thể triển khai công nghệ lên men dịch thể thu sinh khối đơn bào làm thực phẩm và dược liệu. Trong đó: *T. encephala* và *T. fuciformis* tỏ ra có triển vọng nhất.
2. Phản ứng của pha nấm men Tuyết nhĩ đơn bào với Cr dạng cation và V dạng anion đã được xác định, chứng tỏ độc tính Cr khá thấp (trị số LG 50 khoảng 1000 ppm) và V khá cao (LG 50 khoảng 100 ppm). Dưới 100 ppm Cr hoặc 50 ppm V không thể hiện độc tính.
3. Lên men dịch thể *T. encephala* với Cr bổ sung ở mức 50 ppm hoặc với V ở mức 10 ppm cho hiệu suất tích tụ sinh học cao: đạt tới hơn 800 ppm Cr và 70 ppm V sau 5 ngày. Các kỹ thuật phân tích hạt nhân cho thấy khả năng xác định rất chọn lọc Cr và V trong nấm men. Có thể ứng dụng qui trình này cho các loài nấm men khác. Cần tiến tới xác định tỷ lệ Cr và V tích tụ trong các phức hữu cơ cao hoạt tính sinh học cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anderson R.A., Polansky M.M., Roginski E.E. and Mertz M., 1978.
Factors affecting the retention and extraction of Yeast chromium. J. Agric. Food Chem. Vol. 26, No. 4: 858-861.
2. Barbeau B., Bernier R., Dumais N., Briland G., Olivier M., Faure R., Posner I.B., and Trembley M., 1997.
Activation of HIV-1 long terminal repeat transcription and virus replication via NF- κ B-dependent and -independent pathways by potent phosphotyrosine phosphate inhibitors, the peroxovanadium compounds. J. Biol. Chem. 272 (20): 12968-12977.
3. Bosch F., Arinos J., Gamez-Foix M.A. and Guinovart J.J., 1987.
Glycogenolytic, noninsulin-like effects of vanadate on rat hepatocyte glycogen synthase and phosphorylase. J. Biol. Chem. 262 (1): 218-222.
4. Bowman B.J. and Slayman C.W., 1979.
The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 254: 2928-2934
5. Cantley L.C.Jr., Cantley L.G. and Josephson L., 1978.
A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications. J. Biol. Chem. 253 (20): 7361-7368.
6. Czauderna M., Turska M. and Sitowska B., 1996a.
Use of INAA to study the determination of Se, Th, Zn, Co and Fe levels of Yeast cells. Appl. Radiat. Isot. Vol. 47, No. 1: 105-110.
7. Czauderna M., Turska M., Sierakowska S. and Smolinski S., 1996b.
Use of INAA to study the interaction between Se and Te in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Radiat. Isot. Vol. 47, No. 2: 153-157.
8. Fox R.D. and Wong G.J., 1989.
Homothallism and heterothallism in *Tremella fuciformis*. Can. J. Bot. 68: 107-111.
9. Hori C. and Oka T., 1980.
Vanadate enhances the stimulatory action of insulin on DNA synthesis in cultured mouse mammary gland. Biochim. Biophys. Acta, 610: 235-240.
10. Howlett N.G. and Avery S.V., 1997.
Induction of lipid peroxydation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. Appl. Envir. Microbiol. Vol. 63, No. 8: 2971-2976.
11. Lin Z.B., 1993.
Advances in the pharmacology of *Tremella* polysaccharides. In: Mushroom Biology and Mushroom Products. Eds. by S.T. Chang, J.A. Buswell and S.W. Chiu, pp: 293-299. The Chinese University Press. Hongkong.

12. Sakagami Y., Yoshida M., Isogai A. and Suzuki A., 1981.
Structure of Tremmerogen a-13, a peptidal sex hormone of Tremella mesenterica. Agric. Biol. Chem. 45 (4): 1045-1047.
13. Sakurai H., S. Shinomura, K. Fukuzawa and K. Ishizu, 1980.
Detection of oxovanadium (IV) and characterization of its ligand environment in subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium (V). Biochem. Biophys. Res. Comm. 96 (1): 293-298.
14. Sjamsuridzal W., Tajiri Y., Nishida H., Thuan T.B., Kawasaki H., Hirata A., Yokota A. and Sugiyama J., 1997.
Evolutionary relationships of members of the genera Taphrina, Protomyces, Schizosaccharomyces, and related taxa within the archiascomycetes: Integrated analysis of genotypic and phenotypic characters. Mycoscience 38: 267-280.
15. Sjamsuridzal W., Nishida H., Ogawa H., Kakishima and Sugiyama J., 1999.
Phylogenetic positions of rust fungi parasitic on ferns: Evidence from 18S rDNA sequence analysis. Mycoscience 40: 21-27.
16. Sugiyama J. and Su S.O., 1993.
Phylogenetic analysis of basidiomycetous yeasts by means of 18S ribosomal RNA sequences: relationship of Erythrobasidium hasegawianum and other basidiomycetous yeast taxa. Antonie van Leeuwenhoek 63: 201-209.
17. Sugiyama J., 1998.
Relatedness, phylogeny, and evolution of the fungi. Mycoscience: 487-511.
18. Lê Xuân Thám, Tamikazu Kume, 1997.
Nghiên cứu tác dụng của Vanadium lên nấm Linh chi. Tạp chí Dược học, Số 9. Hà Nội.
19. Lê Xuân Thám, 1998.
Nấm Linh chi. Những vấn đề sinh lý dinh dưỡng trong nuôi trồng chất lượng cao. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Tp. Hồ Chí Minh.
20. Le Xuan Tham, Shinpei Matsushashi and Tamikazu Kume, 1999.
Growth and fruitbody formation of Ganoderma lucidum on media supplemented with vanadium, selenium and germanium. Mycoscience 40: 87-92.
21. Toepfer E.W., Mertz W., Polansky M.M., Roginski E.E. and Wolf W.R., 1977.
Preparation of chromium-containing material of glucose tolerance factor activity from Brewer's Yeast extracts and by synthesis. J. Agric. Food Chem. Vol. 25, No. 1: 162-166.
22. Ulaszewski S., Van Herck J.C., Dufour J.P., Kulpa J., Nieuwenhuis B. and Goffeau, A. 1987.
A single mutation confers vanadate resistance to the plasma membrane H⁺-ATPase from the yeast Schizosaccharomyces pombe. J. Biol. Chem. 262 (1): 223-228.

**STUDY OF EFFECTS AND BIOACCUMULATION OF Cr AND V IN THE
YEAST PHASE OF JELLY FUNGI *Tremella* SPP.
BY USING NUCLEAR TECHNIQUES**

**Le Thi Dinh, Phan Thi Thu Huong,
Nguyen Van Toan, Nguyen Giang, Le Xuan Tham**

SUMMARY

*The fermentation of 8 species Jelly fungi Tremella spp., traditionally utilized in folk medicine as precious materia medica at their yeast phases was maintained on media supplemented with chromium in cation form ($\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$) and vanadium in anion form (NH_4VO_3) over a wide range of 10-1000 ppm, very low toxicity of Cr and higher of V were revealed. Their LG 50 values (limit of growth by 50%) were determined to be ca. 1000ppm Cr and 100 ppm V, respectively. Under 100 ppm Cr or 50 ppm V, the yeasts grow well. In the liquid media with 50 ppm Cr or 10 ppm V added, yeasts of *T. encephala* grew well and accumulated Cr at considerably high levels (808, 520 and 480 ppm in dry biomass harvested after 5, 10 and 15 days), and V at lower ones (30, 76, 58 and 50 ppm after 3, 5, 7, 10 days), under stationary fermentations, respectively, as determined by Instrumental Neutron Activation Analysis in the Nuclear Reactor of Dalat, Vietnam. The fermented biomass of Tremella fungi, enriched with Cr and V would be promising new preparations for treatments of diabetes and cardiovascular disorders.*

1.P.22

TÁC DỤNG ỨC CHẾ NẤM MỐC VÀ AFLATOXIN CỦA INTURIN A VÀ *Bacillus subtilis*

Lê Hữu Hiếu, Nguyễn Hương Trà,

Nguyễn Ngọc Huyền, Nguyễn Thuỳ Châu

BỘ MÔN VI SINH, VIỆN CÔNG NGHỆ SAU THU HOẠCH

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiều hoá chất có thể ức chế sự phát triển của nấm mốc, phá huỷ aflatoxin tinh khiết hay aflatoxin trong các nguyên liệu tự nhiên tự nhiên như: chlorin, axit hydrochloric, amoniac.... Đáng tiếc, các hoá chất này mặc dù phá huỷ các aflatoxin nhưng lại làm giảm đáng kể giá trị dinh dưỡng của nguyên liệu xử lý, gây nên sự ô nhiễm môi trường và các tác dụng độc hại đối với người và động vật kinh tế. Do đó việc sử dụng các tác nhân phòng chống sinh học để phòng trừ dịch hại, trong đó có các nấm mốc và độc tố của chúng đã thu hút sự chú ý của nhiều nhà khoa học. Vi khuẩn gram dương như các loài *Bacillus subtilis* được xem như là tác nhân phòng chống sinh học an toàn. Trong những năm gần đây nhiều công trình nghiên cứu của một số nước như Nhật Bản, Hàn Quốc, Pháp, Mỹ đã nghiên cứu khả năng ức chế của Inturin A và *Bacillus subtilis* tới sự phát triển của nấm mốc và quá trình sinh tổng hợp aflatoxin của chúng. Iturin A là lipopeptid mạch vòng gồm gốc aminoacid L- Asp-D-Tyr-D-Asp-L-Gln-L-Pro-D-Asp-L-Ser và một gốc β -aminoacid. Hoạt tính kháng sinh của Iturin A rất mạnh [8]. Nghiên cứu này của chúng tôi nhằm tìm hiểu tác dụng ức chế nấm mốc nhiễm trên nông sản, nấm gây bệnh trên cây trồng và tác dụng giảm aflatoxin của Iturin A được tạo thành từ *Bacillus subtilis* 61s phân lập ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

1. Các chủng vi sinh vật nghiên cứu gồm

<i>Aspergillus flavus</i>	Viện Công nghệ sau thu hoạch phân lập
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Viện Công nghệ sau thu hoạch phân lập
<i>Fusarium moliforme</i>	Viện Công nghệ sau thu hoạch phân lập
<i>Pyricularia oryzae</i>	Viện Bảo vệ Thực vật phân lập
<i>Rhizoctonia solani</i>	Viện Bảo vệ Thực vật phân lập
<i>Aspergillus flavus</i>	Viện Công nghệ sau thu hoạch phân lập, là chủng có khả năng sinh độc tố aflatoxin.

2. Phương pháp

1. Phương pháp thử khả năng ức chế của Iturin A lên sự phát triển của nấm mốc

Để thử khả năng ức chế của Iturin A lên sự phát triển của nấm mốc chúng tôi tiến hành theo phương pháp của Kimura, N., và Ono, M. [8].

Cụ thể như sau: Cho vào mỗi đĩa petri (đường kính 11cm) 20ml môi trường PDA có chứa 5% dịch lên men Iturin A. Lấy một vòng que cấy chứa khoảng 10^8 bào tử/ml của một chủng nấm muốn thử cấy vào giữa đĩa petri. Đặt vào tủ ẩm 30°C . Theo dõi sự phát triển của nấm từ 1 đến 7 ngày. Đĩa đối chứng không có Iturin A. Ghi nhận kết quả bằng cách đo đường kính khuẩn lạc ở các thời điểm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy.

2. Phương pháp thử tác dụng ức chế của Iturin A lên sự sản sinh aflatoxin của *A. flavus*

Để thử tác dụng ức chế của Iturin A lên sự sản sinh aflatoxin chúng tôi dựa theo phương pháp của Kimura, N. và Ono, M. [8], cụ thể như sau:

Cho 20g ngô hạt đã xác định là không có aflatoxin vào bình tam giác 500ml. Bình thí nghiệm cho vào 2ml dung dịch Iturin A; bình đối chứng cho vào 2ml nước cất vô trùng. Lắc đều. Cấy vào mỗi bình khoảng 1000 bào tử *A. flavus*. Nuôi cấy ở 25°C trong 10 ngày.

Aflatoxin được xác định theo phương pháp Doronia và Makshinenko [5].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Hoạt tính ức chế của Iturin A lên sự phát triển của *A. flavus*.

Bảng 1. Hoạt tính ức chế của Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s

Số ngày thí nghiệm	Đường kính khuẩn lạc <i>A. flavus</i> (cm)		
	3 ngày	5 ngày	7 ngày
Công thức thí nghiệm			
Mẫu đối chứng	3,7	6	8
61s	0	0	0

Bảng 1 cho thấy trên môi trường PDA không bổ sung Iturin A, đường kính khuẩn lạc của nấm *A. flavus* là 3,7cm, 6,0cm và 8,0 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Trên môi trường PDA có bổ sung 5% dung dịch Iturin A sinh ra từ chủng *Bacillus subtilis* 61s, đường kính khuẩn lạc của *A. flavus* là 0 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Có thể thấy rằng, ở các thí nghiệm có bổ sung 5% dung dịch Iturin A, đường kính khuẩn lạc *A. flavus* nhỏ đi rất nhiều tùy thuộc vào hiệu quả ức chế của Iturin A.

Hiệu quả ức chế của Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s đến sự phát triển của *A. flavus* là 100%, đường kính khuẩn lạc của *A. flavus* sau 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày nuôi cấy là 0 cm.

2. Hoạt tính ức chế của Iturin A lên sự phát triển của *A. parasiticus*

Bảng 2. Hoạt tính ức chế của Iturin A từ *Bacillus subtilis* 61s lên sự phát triển của *A. parasiticus*

Số ngày thí nghiệm	Đường kính khuẩn lạc <i>A. parasiticus</i> (cm)		
	3 ngày	5 ngày	7 ngày
Công thức thí nghiệm			
Mẫu đối chứng	3,5	5,5	8
61s	0	0	0

Bảng 2 cho thấy trên môi trường PDA không bổ sung Iturin A, đường kính khuẩn lạc của *A. parasiticus* là 3,5cm; 5,5cm và 8,0cm sau 3ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Trên môi trường PLA có bổ sung 5% dung dịch Iturin A sinh ra từ chủng *Bacillus subtilis* 61s, đường kính khuẩn lạc *A. parasiticus* là 0 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Ta có thể nhận thấy: hiệu quả ức chế của Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s đến sự phát triển của *A. parasiticus* là 100%, đường kính khuẩn lạc của *A. flavus* sau 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày nuôi cấy là 0 cm.

3. Hoạt tính ức chế của Iturin A lên sự phát triển của *Fusarium moniliforme*

Bảng 3. Hoạt tính ức chế của Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s lên sự phát triển của *Fusarium moniliforme*

Số ngày thí nghiệm	Đường kính khuẩn lạc <i>Fusarium moniliforme</i> (cm)		
	3 ngày	5 ngày	7 ngày
Công thức thí nghiệm			
Mẫu đối chứng	2,2	4,0	4,9
61s	0	0	0

Bảng 3 cho thấy trên môi trường PDA không bổ sung Iturin A, đường kính khuẩn lạc của *Fusarium moniliforme* là 2,2 cm; 4,0 cm và 4,9 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Trên môi trường PDA có bổ sung 5% dung dịch Inturin A sinh ra từ chủng *Bacillus subtilis* 61s, đường kính khuẩn lạc của *Fusarium moniliforme* là 0 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Điều này cho thấy, hiệu quả ức chế của Inturin A sản sinh từ chủng *Bacillus subtilis* 61s đã ức chế 100% lên sự phát triển của *Fusarium moniliforme*, đường kính khuẩn lạc của *Fusarium moniliforme* là 0 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Những kết quả trên cho thấy rằng, Inturin A sản sinh từ *Bacillus subtilis* 61s đã ức chế mạnh sự nảy mầm và phát triển của *A. flavus*, *A. parasiticus* và *F. moniliforme*, là những loại nấm mốc chính thường nhiễm trên nông sản, đồng thời chúng còn sinh ra độc tố aflatoxin, fumonisin và các trichothecen gây nguy hiểm cho sức khỏe của người và động vật kinh tế.

3. Hoạt tính ức chế của Iturin A lên sự phát triển của nấm *Pyricularia oryzae*

Bảng 4. Hoạt tính ức chế của Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s lên sự phát triển của *Pyricularia oryzae*

Số ngày thí nghiệm	Đường kính khuẩn lạc <i>Pyricularia oryzae</i> (cm)		
	3 ngày	5 ngày	7 ngày
Công thức thí nghiệm			
Mẫu đối chứng	3,4	6,8	9 (mọc kín đĩa)
61s	0	0	0

Bảng 4 cho thấy trên môi trường PDA không bổ sung Inturin A, đường kính khuẩn lạc của *Pyricularia oryzae* là 3,4 cm; 6,8 cm và 9 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Trên môi trường PDA có bổ sung 5% dịch Iturin A sinh ra từ chủng *Bacillus subtilis* 61s, đường kính khuẩn lạc của *Pyricularia oryzae* là 0 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Ta có thể nhận thấy rằng khi bổ sung Iturin A sản sinh từ chủng *Bacillus subtilis* 61s vào môi trường nuôi cấy thì sự phát triển của nấm bị ức chế rõ rệt.

Hiệu quả ức chế của Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s lên sự phát triển của *Pyricularia oryzae* là 100%, đường kính khuẩn lạc *Pyricularia oryzae* là 0 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

5. Hoạt tính ức chế của Iturin A lên sự phát triển của *Rhizoctonia solani*

Bảng 5. Hoạt tính ức chế của Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s lên sự phát triển của *Rhizoctonia solani*

Số ngày thí nghiệm	Đường kính khuẩn lạc <i>Rhizoctonia solani</i> (cm)		
	3 ngày	5 ngày	7 ngày
Mẫu đối chứng	1,4	2,5	3,9
61s	0	0	0

Bảng 5 cho thấy trên môi trường PDA không bổ sung Iturin A, đường kính khuẩn lạc của *Rhizotonia solani* là 1,4 cm; 2,5 cm và 3,9 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Trên môi trường PDA có bổ sung 5% dung dịch Iturin A sinh ra từ chủng *Bacillus subtilis* 61s, đường kính khuẩn lạc của *Rhizotonia solani* là 0 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

Điều này cho thấy, khi bổ sung Iturin A sản sinh từ chủng *Bacillus subtilis* 61s đã ức chế mạnh sự nảy mầm và phát triển của *Rhizoctonia solani*.

Hiệu quả ức chế của Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s lên sự phát triển của *Rhizoctonia solani* là 100%, đường kính khuẩn lạc *Rhizoctonia solani* là 0 cm sau 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, theo thứ tự.

6. Hoạt tính ức chế của Iturin A tới sự sản sinh aflatoxin của *A. flavus*

Bảng 6. Hoạt tính ức chế của Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s tới sự sản sinh aflatoxin của *A. flavus*.

Thí nghiệm	Sản lượng aflatoxin B ₁ sau 10 ngày nuôi cấy (ppb)
Không bổ sung Iturin A	740
Có bổ sung 10% Iturin A	Không phát hiện được

Bảng 6 cho thấy sản lượng aflatoxin B₁ tạo bởi chủng *A. flavus* trên môi trường ngô không bổ sung Iturin A, sau 10 ngày nuôi cấy là 740ppb.

Trong khi đó, trên môi trường ngô có bổ sung 10% khối lượng dung dịch Iturin A (từ chủng *Bacillus subtilis* 61s), sau 10 ngày nuôi cấy chúng tôi không phát hiện thấy aflatoxin. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Kimura, N., Ono, M. [8] khi nghiên cứu tác dụng ức chế quá trình tổng hợp aflatoxin từ *A. flavus* và *A. parasiticus*.

Điều này cho thấy Iturin A sản sinh từ chủng *Bacillus subtilis* 61s đã ức chế mạnh sự phát triển của *A. flavus* và quá trình sinh tổng hợp aflatoxin của chúng. Kết quả nghiên cứu trên của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Kimura, N. và Ono, M. [8].

Việc sử dụng Iturin A từ chủng *Bacillus subtilis* 61s, là chủng vi khuẩn không gây hại cho người và gia súc là một biện pháp lý tưởng trong việc ngăn chặn sự nhiễm aflatoxin trong ngũ cốc và thực phẩm.

Iturin A có thể được coi như là thuốc diệt nấm sinh học, có hiệu quả trong nông nghiệp và có triển vọng thực tế.

7. Tác dụng đối kháng của chủng *Bacillus subtilis* 61s đối với *A. flavus* và *A. parasiticus*

Bảng 7. Tác dụng đối kháng của chủng *Bacillus subtilis* 61s đối với *A. flavus*.

Thí nghiệm	Sự phát triển của <i>A. flavus</i> sau 7 ngày nuôi cấy
200 bào tử <i>A. flavus</i>	<i>flavus</i> mọc kín đĩa
200 bào tử <i>A. flavus</i> + 200 bào tử <i>Bacillus subtilis</i> 61s	Không phát hiện thấy sự phát triển của <i>A. flavus</i>

Bảng 7 cho thấy trên môi trường PDA cấy 200 bào tử của *A. flavus*, sau 7 ngày nuôi cấy *A. flavus* phát triển kín đĩa.

Trong khi đó, trên môi trường PDA cấy 200 bào tử của chủng *Bacillus subtilis* 61s cùng với 200 bào tử của *A. flavus*, kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy *Bacillus subtilis* 61s đã ức chế mạnh sự nảy mầm và phát triển của *A. flavus*.

Bảng 8. Tác dụng đối kháng của chủng *Bacillus subtilis* 61s đối với *A. parasiticus*

Thí nghiệm	Sự phát triển của <i>A. parasiticus</i> sau 7 ngày nuôi cấy
200 bào tử <i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i> mọc kín đĩa
200 bào tử <i>A. parasiticus</i> + 200 bào tử <i>Bacillus subtilis</i> 61s	Không phát hiện thấy sự phát triển của <i>A. parasiticus</i>

Bảng 8 cho thấy trên môi trường PDA cấy 200 bào tử của *A. parasiticus*, sau 7 ngày nuôi cấy *A. parasiticus* phát triển kín đĩa.

Trong khi đó, trên môi trường PDA cấy 200 bào tử của chủng *Bacillus subtilis* 61s cùng với 200 bào tử của *A. parasiticus*, kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy *Bacillus subtilis* 61s đã ức chế mạnh sự nảy mầm và phát triển của nấm *A. parasiticus*.

Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của Kimura, N., Ono, M. [8] và Phae, C. G. [11] về nghiên cứu tính đối kháng của các chủng *Bacillus subtilis* đối với *A. flavus*, *A. parasiticus*.

Kimura, N., và Ono, M., 1990 [8], Phae, C. G., [12], Winkelmann, G., và cộng sự, 1983 [13] hay Asaka, O., và Shoda, M. [1] cho thấy các chủng *Bacillus subtilis* NB22,

Bacillus subtilis UB24, *Bacillus subtilis* M1113, *Bacillus subtilis* RB14, *Bacillus subtilis* ATCC 10744 và *Bacillus subtilis* NE 330 ... có khả năng sản sinh ra Iturin A với mức độ khác nhau. Chúng đều có khả năng ức chế sự phát triển của nấm và vi khuẩn. Phae, C. G. và cộng sự [12] thấy chủng *Bacillus subtilis* NB22 có khả năng ức chế sự phát triển của 19 loại nấm và 8 loại vi khuẩn.

Lần đầu tiên ở Việt Nam, Bộ môn Vi sinh của Viện Công nghệ sau thu hoạch đã phân lập từ hàng trăm mẫu đất, lá cây ở Việt Nam và tuyển chọn ra một số chủng *Bacillus subtilis*, đặc biệt là *Bacillus subtilis* 61s có khả năng sản sinh ra Iturin A với sản lượng cao. Iturin A do *Bacillus subtilis* 61s sản sinh ra có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme*, là những nấm mốc hay nhiễm trên nông sản, lương thực và tạo ra nhiều loại độc tố nguy hiểm đến sức khỏe của người và động vật kinh tế. Những kết quả trên đã cho thấy Iturin A còn có tác dụng ức chế nhiều loại nấm gây bệnh cho cây trồng như bệnh khô vằn trên ngô và lúa, bệnh đạo ôn, bệnh bạc lá lúa do các nấm *P. oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas oryzae* gây ra. Iturin A do *Bacillus subtilis* 61s sản sinh ra cũng có khả năng ngăn cản *A. flavus* hình thành aflatoxin trên ngô. Nghiên cứu trên đây có thể mở ra một hướng mới đầy triển vọng cho công tác bảo vệ cây trồng cũng như bảo quản nông sản thực phẩm của Việt Nam.

IV. KẾT LUẬN

1. Iturin A do *Bacillus subtilis* 61s sản sinh ra có khả năng ức chế sự phát triển của *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme*, *Pyricularia oryzae* và *Rhizoctonia solani*.
2. Iturin A do *Bacillus subtilis* 61s sản sinh có khả năng ức chế sự tạo aflatoxin bởi *A. flavus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aldrich J. and Baker R., 1970.
Biological control of *Fusarium roseum* f. sp. *dianthi* by *Bacillus subtilis*. Plant Disease Reporter, 54, 446-448.
2. Asaka O. and Shoda M., 1996.
Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl. and Environ. Microbiol, Nov.1996, p.4081-4085.
3. Bok S. H., Kim S. U., Son K. H., Kim S. K., Young K. Kim, Hang W. Lee, Jee W. Lee., 1992.
Culture of *Bacillus subtilis* (patent number:5,115,041).
4. Chang, J-Pin and Kommedahl T., 1968.
Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. Phytophthology, 58, 1395-1410.
5. Doronia O. and Makshimenko K.
Analytical methods of detection, identification and quatitative determination of aflatoxin in foodstuffs and fodder, FAO/UNEP/USSR.

6. Hiraoka H., Asaka O., Ano T. and Shoda M., 1992.
Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics Inturin A and surfactin. J. Gen. Appl. Microbiol., 38, 635-640.
7. Isogai A., Takayama S., Murakoshi S. and Suzuki A., 1982.
Structure of β -amino acids in antibiotics inturin. Tetrahedron Lett., 23, 3065-3068.
8. Kimura N., Ono M., 1989.
Prevention of aflatoxin contamination in cereals and nuts by applying Iturin A there to. Australian patent office. AU-A-39235.
9. Peypoux F., Guinand M., Michel G., Delcambe L., Das B. C. and Lederer E., 1978.
Structure of Inturin a, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. Biochemistry, 17, 3992-3996.
10. Phae C. G., Sasaki M., Shoda M. and Kubota H., 1990.
Characteristics of *Bacillus subtilis* isolated from composts suppressing phytophthogenic microorganisms. Soil. Sci. Plant Nutr., 36, 575-586.
11. Phae C. G., Shoda M. and Kubota H., 1990.
Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. J. Ferment. Bioeng., 69, 1-7.
12. Phae C. G., Shoda M., Kita N., Nakano M. and Ushiyama K., 1992.
Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 58, 329-339 (1992).
13. Winkelmann G., Allgair H., Lupp R. and Jung G., 1983.
Inturin A – a new long chain inturin A possessing an unusual high content of C_{16} - β amino acids. J. Antibiotics, 36, 1451-1457.

THE INHIBITION EFFECT OF FUNGI AND AFLATOXIN OF ITURIN A AND *Bacillus subtilis*

Le Huu Hieu, Nguyen Huong Tra,
Nguyen Ngoc Huyen, Nguyen Thuy Chau

SUMMARY

The antifungal effect of Iturin A produced by *Bacillus subtilis* 61s was investigated. Iturin A gave high antifungal activity to *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*. In the PDA medium containing 1% of Iturin A, the above fungi did not grow after 3 days of treatment. We also found that Iturin A also inhibited the aflatoxin formation of *A. flavus*. In the maize substrate containing 1% of Iturin A, the aflatoxin content produced by *A. flavus* contaminated in maize substrate was 0 ppb compared with 740 ppb in the control sample.

1.P.23

HIỆU LỰC DIỆT SÂU CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM *Bacillus thuringiensis* SẢN XUẤT Ở VIỆT NAM

Nguyễn Quỳnh Châu, Ngô Đình Quang Bình, Nguyễn Văn Thường
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Ngày nay thuốc hoá học ngày càng được dùng nhiều trong phòng trừ sâu hại cây trồng ở Việt Nam. Điều đó làm môi trường bị ô nhiễm, các sinh vật có ích bị huỷ diệt, làm mất cân bằng sinh thái trong tự nhiên. Nguy hiểm hơn nữa dư lượng thuốc hoá học trong đất, trong cây trồng gây ảnh hưởng xấu đến sức khoẻ con người và động vật. Chính vì thế các chế phẩm sinh học, sử dụng an toàn hơn ngày càng được dùng rộng rãi, trong đó thuốc trừ sâu vi sinh vật BT là loại được dùng rộng rãi nhất. Những năm này, BT đạt đỉnh cao tương tự như những năm hoàng kim của kháng sinh vào những năm 1950 và 1960 (2, 3, 13).

Chế phẩm này được thu nhận từ *Bacillus thuringiensis*. Đây là một loại vi khuẩn đất, Gram dương, trong quá trình hình thành bào tử nó tạo nên các tinh thể. Các tinh thể này có bản chất protein, không gây ô nhiễm môi trường, không diệt sinh vật có ích, không làm hại sức khoẻ con người và động vật. Các tinh thể này lại có khả năng diệt các loại côn trùng như: Lepidoptera (cánh vẩy), Coleoptera (cánh cứng), Diptera (2 cánh) (9, 4, 6). Các tinh thể này xâm nhập vào côn trùng theo đường tiêu hoá, dưới tác động của môi trường kiềm và protease trong ruột côn trùng, tinh thể protein bị phân giải thành tinh thể protein có độc tính. Các tinh thể có độc tính này bám vào các thụ thể trên bề mặt tế bào thượng bì ruột, tạo nên các lỗ dò, làm rối loạn cân bằng thẩm thấu. Các tế bào mất khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu, sau đó tế bào bị phồng lên do nước về dòng ion tràn vào. Kết quả tế bào bị phân giải, côn trùng bị chết (4, 11, 12).

Ở Việt Nam hiệu lực diệt sâu của thuốc BT nhập nội đã được khảo nghiệm từ những năm 1973. Sau đó đến 1974 đã được triển khai sản xuất theo phương pháp thủ công về bán công nghiệp. Đến 1982, BT đã được nghiên cứu, sản xuất theo phương pháp lên men chìm (7, 8). Tuy nhiên chế phẩm thường ở dạng dịch thể, không bảo quản được lâu, phổ diệt sâu lại hẹp. Hơn nữa gần đây xuất hiện hiện tượng một số côn trùng kháng BT. Vì thế, việc tìm chủng *Bacillus thuringiensis* mới có hoạt tính diệt sâu cao là rất cần thiết, gắn liền với nó là việc xác định hiệu lực diệt sâu của chế phẩm. Từ năm 1996, Phòng Di truyền Vi sinh - Viện CNSH đã nghiên cứu tìm chủng *Bacillus thuringiensis* có hiệu lực diệt sâu cao, đồng thời nghiên cứu sản xuất theo phương pháp công nghiệp, sử dụng nổi lên men 80L của Mỹ (Hãng New Brunswick).

Trong nội dung bài này chúng tôi chỉ xin đề cập đến một vấn đề: hiệu lực diệt sâu của một số chế phẩm BT sản xuất tại Phòng Di truyền Vi sinh - Viện CNSH.

I. VẬT LIỆU

Chế phẩm (Do Phòng Di truyền Vi sinh - Viện CNSH sản xuất): BT1, BT2, BT11, BT21, BT22

- Chế phẩm BT - MN (của Miền Nam), BT - TQ (của Trung Quốc)
- Sâu tơ
- Lá cải xanh nuôi sâu tơ
- Chậu thủy tinh đường kính 15cm
- Bình bơm tay 10L.
- Panh, ống đồng...
- Ruộng su hào cũ đang lớn, diện tích 360m² của HTX Tiên Phong Mê Linh - Vĩnh Phú.

II. PHƯƠNG PHÁP

1. Trong phòng thí nghiệm

Sử dụng sâu tuổi 2, tuổi 3. Chế phẩm lắc đều rồi pha theo tỷ lệ 2% - 4%. Lá nuôi sâu được rửa sạch để ráo nước, cắt thành miếng có diện tích bằng nhau. Sau đó nhúng lá vào thuốc, để ráo rồi đặt vào chậu thủy tinh, thả sâu cho ăn. Lô đối chứng là nhúng lá vào nước lã. Sau 1, 2, 3 ngày kiểm tra số sâu sống, số sâu chết. Tỷ lệ sâu chết bệnh tính theo công thức Abbott (1):

$$M = \frac{C - t}{C} \times 100$$

M: là tỷ lệ sâu chế bệnh

C: là số sâu còn lại ở lô đối chứng

t: là số sâu sống sót ở lô thí nghiệm

2. Khảo nghiệm ngoài đồng ruộng

Hiệu lực diệt sâu được khảo nghiệm tại HTX Tiên Phong - Mê Linh - Vĩnh Phú (khảo nghiệm đối với sâu tơ hại su hào).

Mỗi chế phẩm được thử nghiệm trên diện tích 20m², thí nghiệm được nhắc lại 3 lần. Mỗi lần thí nghiệm điều tra ở 3 điểm cố định. Mỗi điểm 5 cây. Điều tra mật độ sâu trước và sau phun thuốc. Dùng bình bơm tay để phun, mỗi chế phẩm một bình riêng. Liều lượng thuốc sử dụng là 1L/1 ha. Phun thuốc vào chiều mát sau 16g. Hiệu quả diệt sâu tính theo công thức của Henderson Tillton:

$$E = 100 \times \left[1 - \frac{O_2 \times K_1}{O_1 \times K_2 \times O_1} \right]$$

O₁: Sâu sống ở lô thí nghiệm trước thí nghiệm

O₂: Sâu sống ở lô thí nghiệm sau thí nghiệm

K₁: Sâu sống ở lô đối chứng trước thí nghiệm

K₂: Sâu sống ở lô đối chứng sau thí nghiệm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Hiệu quả diệt sâu trong phòng thí nghiệm

Bảng 1. Hiệu quả diệt sâu tơ (*Plutella xylostella*) của chế phẩm BT

Chế phẩm	Liều lượng sử dụng (ml/ha)	Tỷ lệ sâu chết qua các ngày			Ghi chú
		1	2	3	
BT1	1000	28,05	73,05	86,59	t° = 25° - 26° A° = 80-90%
BT2	1000	33,26	40,24	57,29	
BT2 ₁	1000	61,65	85,19	85,19	
BT1 ₁	1000	48,47	73,42	80,96	
BT2 ₂	1000	67,53	95,52	95,52	
Bt - Lx	1000	89,41	100	-	
V - Bt - TQ	1000	84,63	100	-	
ĐC	Nước lã	0	0	0	0

Kết quả ở bảng 1 cho thấy hiệu lực diệt sâu tơ hại rau của các chế phẩm BT thể hiện rất rõ ràng. Sau ngày thứ 1 tỷ lệ sâu chết của chế phẩm BT2₁, BT2₂ đạt cao hơn so với các chế phẩm khác (đạt 61 và 67%), trong khi các chế phẩm khác đạt 28%, 33%, 48%. Sau 2 ngày tỷ lệ sâu chết của chế phẩm Bt1 và BT11 tăng cao lên đạt 73% gần bằng tỷ lệ sâu chết của chế phẩm Bt2₁ và BT2₂ (85 và 95%). Sau 3 ngày tỷ lệ sâu chết của các chế phẩm (BT11, BT1, BT21, BT22) đạt ở mức tương đối cao (81%, 86,5%, 85%, 95,6%) và không thua kém mấy so với chế phẩm của Liên Xô và Trung Quốc. Chế phẩm Bt2 có tỷ lệ sâu chết thấp nhất (57%).

Các chế phẩm Bt1, BT2, BT22 được đưa ra khảo nghiệm ngoài đồng ruộng.

2. Hiệu quả diệt sâu ngoài đồng ruộng

- Tuổi và mật độ sâu trước khi phun thuốc

Sâu tuổi 1- 3 chiếm 26,25%

Sâu tuổi 4 - 5 chiếm 36,25%

Nhộng chiếm 37,5%

Bảng 2. Hiệu quả diệt sâu tơ hại su hào tại HTX Tiến Phong - Mê Linh - Vĩnh Phúc

Chế phẩm	Liều lượng sử dụng (ml/ha)	Tỷ lệ sâu chết qua các ngày (%)					Ghi chú
		1	2	3	4	7	
BT1	1000	3,46	32,44	57,21	77,72	67,48	T° = 26-27°
BT2 ₁	1000	24,39	50,00	53,34	50,00	76,93	
BT2 ₂	1000	29,36	30,27	60,25	57,41	77,29	
V - Bt - TQ	1000	30,36	62,67	76,42	77,89	72,70	
ĐC	phun nước lã	0	0	0			

Kết quả ở bảng 2 cho thấy tỷ lệ sâu chết chưa thật cao lắm. Sau 1 ngày phun thuốc tỷ lệ sâu chết đạt từ 3,5 - 29%. Sau 2 ngày tỷ lệ diệt sâu có tăng lên đạt từ 30 - 50%. Sau ngày thứ 3 đạt từ 53 - 60%. Hiệu lực diệt sâu còn kéo dài đến ngày thứ 7 (Đạt từ 67,5 - 77%).

Hiệu quả diệt sâu của các chế phẩm khi mang ra ngoài đồng ruộng có thấp hơn so với kết quả trong phòng thí nghiệm. Nguyên nhân do tỷ lệ chết của sâu còn phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của cá thể (tuổi sâu). Sâu ở lứa tuổi hoạt động mạnh và ăn khoẻ thì khi xử lý thuốc tỷ lệ sâu chết đạt cao hơn (7). ở thí nghiệm ngoài đồng ruộng này, sâu tuổi lớn (4 - 5) và nặng chiếm đa số (hơn 70%). Hơn nữa chế phẩm khi sử dụng ngoài đồng ruộng thì hiệu lực diệt sâu của nó còn chịu tác động của nhiều yếu tố bên ngoài làm giảm hiệu lực diệt sâu. Thí dụ: ánh nắng mặt trời, mưa gió, bản chất bề mặt lá v.v... (5, 10, 13). Tuy vậy, hiệu quả diệt sâu tới ngày thứ bảy cũng đạt tới trên 70%. Vì vậy với các chế phẩm này có thể sử dụng để bảo vệ cây trồng, nhưng để thật an toàn nên tăng số lần phun thuốc trong từng đợt phòng trừ.

IV. KẾT LUẬN

1. Hiệu lực diệt sâu tơ trong phòng thí nghiệm đạt tương đối cao. Sau 3 ngày phun thuốc các chế phẩm Bt11, BT2₁, BT1, BT2₂ đạt từ 81 - 95,6%.
2. Hiệu lực diệt sâu ngoài đồng ruộng của các chế phẩm này sau 3 ngày đạt thấp hơn so với thí nghiệm trong phòng (đạt 53 - 60%). Nhưng hiệu lực diệt sâu còn kéo dài đến ngày thứ 7, đạt tới trên 70%.
3. Các chế phẩm này có thể sử dụng để bảo vệ cây trồng được, nhưng khi mật độ sâu cao thì phải tăng số lần phun thuốc.

Chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu để nâng cao hiệu lực diệt sâu của các chế phẩm này ngay trong những ngày đầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abbott W.S., 1925.
A. Method of computing the effectiveness of an insecticide. J. econ. entomol 18. 265 - 267.
2. Bruce C., 1993.
Carlton, genetic improvement of bioinsecticides based on the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Proceeding of the 2nd Canberra. *Bacillus thuringiensis* meeting 9/1993.
3. Bruce C., 1993.
Carton and Cynthia gawron - Bruce genetic improvement of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide development. Advanced engineered pesticides. Leo Kim.
4. Barbara H., Knowles, 1913.
Does the structure of *Bacillus thuringiensis* toxins explain their insecticidal mechanism? Proceeding of 2nd canberra *Bacillus thuringiensis* Meeting 1913, p. 17 - 21.
5. Brian W.Young.
Spray application technology and relevance to the optimal use of *Bacillus thuringiensis* products. Proceeding of the 2nd canberra *Bacillus thuringiensis* Meeting p. 103 - 107.
6. Hofte H. and H.R. Witeley, 1989.
Insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*, Microbiol. Rew, 53: 242 - 255.
7. Nguyễn Công Bình, Lê Xuân Thiện và cộng sự, 1978.
Hiệu lực diệt sâu của chế phẩm *Bacillus thuringiensis* sản xuất trong điều kiện phòng thí nghiệm. Báo cáo nghiên cứu khoa học. Viện Sinh vật.
8. Nguyễn Công Bình. Phạm Bá Nhạ và cộng sự, 1982.
Kết quả nghiên cứu phương pháp sản xuất chế phẩm vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* diệt sâu. Báo cáo nghiên cứu khoa học. Viện Sinh vật.
9. Takashi Ymamamoto and Gary K.
Powel *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: recent Advances in understanding its insecticidal activity. Advanced engineered pesticides. LeoKim p. 4 - 8.
10. Victor Ragakulendren use of *Bacillus thuringiensis* on vegetable crops in Australia. Proceeding of the 2nd Canberre *Bacillus thuringiensis* meeting p.121.
11. Van Rie, J. M, H, Mc Gaughey, D.E. Johnson, J.D. Barnett and H. Van Mellaert, 1990.
Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide of *Bacillus thuringiensis* Science 247: 72 - 74.

12. VanRie.

Biochemical mechanisms of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*.
Proceeding of the 2nd canberra *Bacillus thuringiensis* Meeting. P.31.

13. Jerald S.

Feiteison The *Bacillus thuringiensis* tree. Advanced engineered desticides
LeoKim P. 63 - 67.

**INSECTICIDE EFFECT OF *Bacillus thuringiensis* PREPARATION
PRODUCTED IN VIETNAM**

*Nguyen Quynh Chau,
Ngo Dinh Quang Binh, Nguyen Van Thuong*

SUMMARY

*The mortalities that the productions of *Bacillus thuringiensis* cause in *Plutella xylostela* were hight. 3 days after treatment with BT the mortalities were from 81% to 95,6%. In the field, the mortality was lower 70%. But these productions can be used to protect vegetables against *Plutella xylostela*.*

1.P.24

QUY TRÌNH SỬ DỤNG CHẾ PHẨM VI NẤM MA PHÒNG TRỪ MỐI (TERMITIDAE) HẠI CÂY TRỒNG

Tạ Kim Chính, Hà Thị Quyến, Hoa Thị Minh Tú
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I. MỞ ĐẦU

Nước ta là một nước nhiệt đới ẩm cùng với những yếu tố sinh thái đặc biệt đã tạo điều kiện tốt cho các loài mối sinh sản và phát triển. Mức độ phá hại của mối đã có trường hợp trở nên khốc liệt, gây nhiều tổn phí cho các công trình kiến trúc, đê đập và cây trồng.

Các biện pháp phòng chống mối phổ biến hiện nay là dùng hàng rào bằng hoá chất như dieldrex-6, pentaclo tenolat natri, creozot, DDT và HCH... để phòng trừ công trình kiến trúc và kho tàng. Phun trực tiếp các hoá chất như acetat chì, dieldrin hoặc các chất có chứa acsenic như xanh paris, ascu và các chất có chứa As_2O_3 ... để phòng trừ mối hại cây trồng. Các loại hoá chất trên có tác dụng diệt trừ mối khá nhanh, nhưng chúng lại là những hoá chất gây độc hại cho người, gia súc, làm ô nhiễm nguồn nước và môi trường xung quanh nơi sử dụng thuốc. Các loại hoá chất này thường có mặt trong các thuốc chống mối hoá học hiện nay.

Ngày nay phòng trừ côn trùng hại mùa màng và các loài mối bằng biện pháp sinh học đã được thế giới nghiên cứu và ứng dụng từ thế kỷ thứ 18. Cơ sở khoa học của biện pháp là sử dụng các tác nhân sinh học như vi khuẩn (*Bacillus thuringiensis*), vi nấm (*Beauveria*, *Metarhizium*, *Paeicillomyces*, ...) gây bệnh tự nhiên làm côn trùng chết từ từ, tạo ổ dịch lây lan và tồn lưu trong môi trường. Các chế phẩm sản xuất từ vi sinh vật thường không gây độc hại cho người và gia súc.

Chúng tôi đã nghiên cứu tuyển chọn được 18 chủng vi nấm diệt côn trùng gây hại. Trong đó chọn được một số chủng có khả năng diệt mối hại nhà cửa, đê đập và cây trồng với hiệu lực cao nhất.

Chế phẩm MA đã được khảo nghiệm phòng trừ mối hại cây vải thiều ở Nam Thanh - Thanh Hà - Hải Hưng (1994, 1995, 1997); mối hại cây thông ở Cố đô Huế (1995); mối hại cây bạch đàn ở Hà Trung - Thanh Hoá (1996); mối hại cây chè ở Bắc Quang - Hà Giang (1998) và ở Công ty chè Yên Bái (1998, 1999); mối hại cây cảnh và cây bóng mát ở Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh (1998, 1999).

Trên cơ sở những kết quả nghiên cứu cơ bản và quá trình khảo nghiệm chế phẩm MA tại một số địa điểm trên, chúng tôi xin giới thiệu quy trình ứng dụng như sau:

II. NỘI DUNG QUY TRÌNH

1. Thành phần và tác dụng

- Chế phẩm MA sản xuất từ vi nấm *Metarhizium anisopliae* Ma.82C là chủng nhận từ bộ sưu tập vi nấm của Phòng Các chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật - Viện Công nghệ sinh học - Trung tâm KHTN và CNQG. Chủng Ma.82C được xác định là có hoạt tính diệt côn trùng cao và được sử dụng làm chủng sản trong quy trình sản xuất chế phẩm MA

Chế phẩm MA có 2 dạng:

- Chế phẩm dịch: Là sản phẩm thu nhận sau thời gian lên men vi nấm trong môi trường dịch thể và phối hợp với một số chất hoạt tính sinh học từ vi sinh vật. Thành phần gồm 90% sinh khối vi nấm và 10% chất có hoạt tính sinh học

Tác dụng của chế phẩm dịch: Khi phun chế phẩm sẽ ngấm đều xuống đất quanh gốc cây nơi phân bố của bộ rễ. Diệt và phòng mối không sống được ở khu vực này, đồng thời có tác dụng bồi dưỡng cho cây, giúp cây phục hồi nhanh chóng sau thu hoạch sản phẩm

- Chế phẩm bột: Là sản phẩm thu nhận sau thời gian nuôi cấy (lên men) vi nấm trên môi trường xốp. Thành phần gồm 85% bào tử vi nấm, 10% cơ chất nền và 5% chất giữ ẩm.

Tác dụng của chế phẩm bột: MA được bón cho cây phối hợp với các loại phân bón, có tác dụng phòng trừ lâu dài các loài mối và diệt các ấu trùng, côn trùng sống trong đất ăn hại rễ cây

2. Lượng sử dụng

- Chế phẩm dịch:
 - + Đối với các loại cây vừa và nhỏ như mía, chè, cà phê, cam, chanh và rau màu (ngô, đậu, lạc,...) và cây cảnh... sử dụng 10lít/ha, pha với 400-500lít nước
 - + Đối với cây gỗ nhỏ và to như thông, bạch đàn, sao đen, phượng vĩ, vải, nhãn và bưởi... sử dụng từ 1/2 - 1lít/cây, pha với 25 - 30lít nước.
- Chế phẩm bột: Bổ sung 5% chế phẩm MA với lượng phân bón hữu cơ phù hợp cho mỗi loại cây trồng.

Ví dụ: -Nếu bón từ 600-700kg phân cho 1ha cây trồng thì bổ sung từ 30-35kg MA.

- Với cây gỗ to đang bị mối hại thì lượng chế phẩm phải sử dụng là 0,5-1kg/cây (chưa kể phân bón thường)

3. Cách tiến hành: Có 5 bước cơ bản:

Bước 1: Điều tra mức độ phá hại của mối nhằm mục đích xác định diện tích và số lượng cây đang bị mối hại, đồng thời hạn chế lượng chế phẩm sử dụng tràn lan, phải tập trung chế phẩm vào diện tích và những cây đang bị mối phá hại

Bước 2: Vệ sinh thân cây đang bị mối hại (mối thường làm tổ quanh gốc cây và từ đó leo lên thân cây tạo những đường mui đắp bằng đất trên thân cây) bằng cách rung cây hoặc dùng que phá vỡ các đường mui làm cho mối mất đường đi lại

Bước 3: Tạo thành những hố nhỏ quanh gốc cây nhằm đưa chế phẩm dịch lan rộng và sâu, ngấm đều xuống đất. Các hố nhỏ này chứa một lượng chế phẩm dịch sẽ tiêu diệt và xua đuổi mối

- Đối với các cây gỗ to có thể dùng khoan máy, khoan từ 3-5 hố sát quanh gốc cây (tùy theo mức độ phá hại của mối và độ lớn của tán cây mà tạo thành các vòng hố quanh gốc cây). Mỗi hố sâu từ 20-25cm, rộng từ 5-10cm
- Đối với cây gỗ nhỏ có thể dùng thuổng hoặc gậy có đầu nhọn để tạo lỗ quanh gốc cây, mỗi cây tạo từ 1-3 lỗ, mỗi lỗ sâu từ 10-15cm, rộng từ 5-7cm

Bước 4: Xử lý bằng chế phẩm dịch

Pha chế phẩm dịch vào thùng có chứa sẵn nước, khuấy đều rồi tưới thẳng từ trên thân cây (chủ yếu tưới vào các đường mui của mối trên thân cây) và tưới đầy các lỗ khoan. Cần tưới từ từ để dịch ngấm đều.

Bước 5: Xử lý bằng chế phẩm bột

Chế phẩm vi nấm MA dạng phân bón cũng được rắc vào các rãnh quanh gốc cây rồi lấp đất như khi bón các loại phân khác

Mỗi cây có thể xới káo quanh gốc từ 1-3 vòng rãnh. Mỗi rãnh rộng từ 25-30cm, sâu từ 15-20cm

4. Kiểm tra

1. Sau khi xử lý MA phải kiểm tra kết quả theo các đợt:

- + Sau 1/2 tháng
- + Sau 3 tháng
- + Sau 6 tháng
- + Sau 9 tháng
- + Sau 12 tháng

2. Quan sát: Quan sát hiện tượng đắp lại đường mui trên thân cây. Nếu mối tiếp tục hoạt động, đắp lại đường mui thì điểm mút (điểm cuối cùng) của đường mui đất sẽ bị ỉn ứot khoảng 1,5-2cm, phần còn lại của đường mui vằn khô

Mỗi đợt kiểm tra nếu vẫn thấy mối còn hoạt động phải tiếp tục xử lý bổ xung MA theo mức độ xuất hiện lại của mối.

5. Thời gian sử dụng và bảo quản chế phẩm

- Mối hại cây trồng thường xuất hiện vào cuối mùa xuân và hoạt động trong suốt mùa hạ. Do đó phải sử dụng MA ngay từ tháng 3 dương lịch hoặc sau tết nguyên đán

- Sử dụng và bảo quản chế phẩm vi nấm cũng giống như các chế phẩm sinh học khác, chúng thường mất hoạt tính ở nhiệt độ cao (trên 40°C và) tránh ánh nắng trực tiếp của mặt trời. Vì vậy phải bảo quản và xử lý ở các điều kiện và thời gian sau:
 - + Phun và bón chế phẩm vào buổi sáng, tránh những ngày mưa. Nếu sau khi xử lý (sau 1-2 giờ) gặp mưa rào thì phải xử lý lại
 - + Bảo quản chế phẩm nơi thoáng mát, khô ráo. Thời gian sử dụng chế phẩm từ 6 tháng đến 1 năm

6. An toàn

Chế phẩm vi nấm MA bản chất là sản phẩm sinh học, an toàn với cây trồng, không gây ô nhiễm môi trường, ít độc hại với người, động vật nuôi và ký sinh, côn trùng có ích. Tuy nhiên khi sử dụng chế phẩm MA vẫn phải có dụng cụ và trang bị bảo hộ lao động vì trong thành phần của MA có chứa một lượng khá lớn bào tử vi nấm. Vì vậy chế phẩm có mùi hắc và gây bụi cho người sử dụng

III. KẾT LUẬN

1. Bản quy trình là kết quả của những đợt khảo nghiệm chế phẩm MA tại những địa điểm đã nêu trên
2. Nội dung và các bước tiến hành của quy trình là cơ sở khoa học kỹ thuật và thực tế để MA trở thành chế phẩm sinh học có tên trong danh mục thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam
3. Với các bước tiến hành rõ ràng, cụ thể và đơn giản trong quy trình, người nông dân có thể sử dụng chế phẩm MA một cách dễ dàng

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jones W.E., Grace J.K., Tamashiro M., 1996.
Virulence of seven isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) Environmental Entomology 25 (2) 481-487.
2. Moore D., Morley-Davies J., 1994.
The effects of temperature and ultra-violet irradiation on conidia of *Metarhizium flavoviridae*. In Proceedings-brighton crop protection conference, pest and diseases, 1994, vol.3.
3. Moore D., Higgins P.M., Lomer, 1996.
Effects of simulated and natural sunlight on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviridae* gams and rozsygal and interactions with temperature. Biocontrol science and technology 6(1) 63-76.

4. Morley-Davies J., Moore D., Prior C., 1996.

Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. Mycological research 100 (1) 31-38

5. Richard J. Milner, 1991.

The selection of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of Australian sugar-cane white grubs. Use of pathogens in scarab pest management 209-215.

6. Wu G.Y., Sun J.D., 1994.

A study and application of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill in the control of the tea brown weevil. China tea 16(1) 30-31 [ch].

THE PROCESS USING PREPARATION MA TO PREVENT AND TO AGAINST TERMITE AND SOIL LIVING AND ROOF EATING INSECT

Ta Kim Chinh, Ha Thi Quyen, Hoa Thi Minh Tu

SUMMARY

The process includes 5 steps:

1. Inquire level of termite's harmfulness
2. Clean stem before using preparation MA
3. Dig small holes and drains surrounding foot of tree
4. Irrigate liquid preparation MA into the holes
5. Sprinkle ponder preparation MA into the drains

These above steps are very easy to understand concrete and simple for peasant to carry out anti-termite process.