

TUYỂN CHỌN CHẤT MANG VÀ CHẤT NỀN SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH CHỨA BA DÒNG VI KHUẨN CHỊU MẶN KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG CÂY TRỒNG (*BURKHOLDERIA CEPACIA* BL1-10, *BACILLUS MEGATERIUM* ST2-9 VÀ *BACILLUS AQUIMARIS* KG6-3)

Nguyễn Khởi Nghĩa, Nguyễn Thị Kiều Oanh

Đại học Cần Thơ

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nknghia@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 24.02.2017

Ngày nhận đăng: 20.6.2017

TÓM TẮT

Trong sản xuất phân bón sinh học, chất mang và chất nền có vai trò rất quan trọng trong việc duy trì hiệu lực của vi sinh vật được bổ sung vào trong chế phẩm phân bón sinh học. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu nhằm chọn ra loại vật liệu làm chất mang và chất nền cũng như ẩm độ phù hợp để duy trì mật độ của ba dòng vi khuẩn phân lập chịu mặn và có chức năng kích thích sinh trưởng cây trồng như vi khuẩn cố định đạm *Bacillus aquimaris* KG6-3 (KG6-1), vi khuẩn hòa tan lân *Burkholderia* sp. BL1-10 (BL1-10) và vi khuẩn tổng hợp hormone thực vật Indole-3-Acetic Acid (IAA) *Bacillus megaterium* ST2-9 (ST2-9), đồng thời, so sánh hiệu quả của hai phương pháp 3 dòng vi khuẩn vào chất nền: (1) dạng tự do và (2) dạng cố định trong chất mang. Các thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm. Bã cà phê và xỉ than tổ ong dùng làm chất mang. Bên cạnh đó, cám gạo, vỏ chuối, ruột chuối, mụn dừa và đường vàng phối hợp với nhau dùng làm chất nền cho chế phẩm vi sinh. Kết quả thí nghiệm cho thấy mật độ của hai dòng vi khuẩn ST2-9 và KG6-3 trong tổng số ba dòng vi khuẩn thử nghiệm đạt cao nhất ở trong chất mang xỉ than tổ ong sau 16 giờ thí nghiệm và hỗn hợp mật độ ba dòng vi khuẩn ở trong 3 chất mang thử nghiệm không khác biệt ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, mật độ vi khuẩn của cả ba dòng thử nghiệm riêng lẻ và hỗn hợp đạt cao nhất ở ẩm độ 50% của chất nền cám gạo. Mật độ của hỗn hợp 3 dòng vi khuẩn cao nhất và được duy trì trong 18 tuần tồn trữ ở hỗn hợp chất nền gồm cám gạo + đường vàng theo tỉ lệ (15:1) và khi kết hợp với phương pháp bổ sung vi khuẩn bằng xỉ than giúp mật độ cao hơn so với phương pháp bổ sung ở dạng tế bào tự do. Vì vậy, có thể kết luận rằng xỉ than tổ ong là chất mang tốt nhất giúp bổ sung 3 dòng vi khuẩn thử nghiệm và hỗn hợp gồm cám gạo và đường vàng (15:1) ở ẩm độ 50% và kết hợp phương pháp bổ sung vi khuẩn bằng chất mang là công thức chất nền tốt nhất dùng sản xuất chế phẩm vi sinh chứa 3 dòng vi khuẩn thử nghiệm giúp gia tăng và duy trì mật độ vi khuẩn trong thời gian bảo quản.

Từ khóa: *Bacillus aquimaris*, *Burkholderia* sp., cám gạo, mật độ vi khuẩn và xỉ than tổ ong

GIỚI THIỆU

Phân bón sinh học có khả năng giúp chuyển hóa dinh dưỡng thiết yếu và quan trọng cho cây trồng từ dạng không hữu dụng sang dạng hữu dụng cho cây trồng thông qua các tiến trình sinh học (Vessey, 2003). Một vài vi khuẩn có khả năng cố định đạm từ khí quyển, có khả năng hòa tan lân và tiết ra hormone thực vật IAA như *Bacillus* sp. và *Burkholderia* sp là những vi khuẩn háo khí, dị dưỡng và sống ở nhiều môi trường khác nhau như đất, nước và trầm tích (Palleroni, 1984). Có nhiều nghiên cứu chứng minh cho thấy việc bổ sung vi khuẩn nhóm *Bacillus* sp. và *Burkholderia* sp. giúp gia tăng năng

suất cho cây trồng do chúng có khả năng làm gia tăng khả năng cố định đạm trong đất (Joseph *et al.*, 2007) và do chúng tiết ra hormone kích thích sinh trưởng cây trồng như gibberellin, auxin và cytokinin. Ngoài ra, nhóm vi khuẩn nhóm *Bacillus* sp. và *Burkholderia* sp này còn thể hiện khả năng hòa tan lân (Canbolat *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008).

Có rất nhiều vật liệu hữu cơ có tiềm năng dùng làm chất mang để bổ sung vi khuẩn vào trong đất giúp gia tăng khả năng sống sót và gia tăng hiệu lực hoạt tính sinh học của chúng bằng cách bảo vệ vi khuẩn từ các điều kiện bất lợi và stress của nhân tố hữu sinh và phi sinh (Van Veen *et al.*, 1997). Chất mang phù hợp và bền vững phải rẻ tiền, dễ sử dụng,

có khả năng phối trộn, đóng gói và dễ tìm. Cũng như vậy, chất mang phải cho phép sự trao đổi khí dễ dàng, đặc biệt là khí oxy và có hàm lượng chất hữu cơ cao và có khả năng giữ nước tốt (Ben Rebah *et al.*, 2002). Theo Somasegaran và Hoben (1985) một vật liệu chất mang tốt bản thân nó không được chứa độc chất gây hại cho vi khuẩn và cây trồng. Thêm vào đó, Ferreira và Castro (2005) kết luận rằng chất mang nên có pH ở mức gần trung tính hoặc có khả năng sẵn sàng cho việc hiệu chỉnh pH, phải dễ tìm, với giá rẻ và có khả năng tiết trùng. Những đặc tính này chỉ đặc trưng cho các chất mang tiềm năng lý tưởng, trong khi đó việc chọn lựa cuối cùng chất mang phải dựa vào khả năng phát triển của vi sinh vật khi được bổ sung vào chất mang, khả năng sống sót của chúng trong quá trình tồn trữ, phương pháp bổ sung, thiết bị dùng để bổ sung và chi phí vừa phải. Trong số các vật liệu hữu cơ dùng làm chất mang có hiệu quả cao trong bổ sung vi sinh vật vào trong môi trường đất, than bùn được cho là vật liệu được sử dụng nhiều nhất dùng làm chất mang bổ sung vi sinh vật (Peterson, Loynachan, 1981) nhưng than bùn không dễ tìm (Tilak, Subba Rao, 1978). Thay vào đó, có rất nhiều vật liệu hữu cơ có thể dùng làm chất mang để bổ sung vi sinh vật như các phụ phẩm từ công nghiệp, chất thải hữu cơ, khoáng đất, sản phẩm từ thực vật, than đá, và chất thải công và nông nghiệp khác. Trong số các chất thải nông nghiệp và công nghiệp, xỉ than tổ ong và bã cà phê sau khi sử dụng là hai vật liệu có tiềm năng cao như là chất mang dùng để bổ sung vi sinh vật ra ngoài môi trường đất (Nguyễn Khởi Nghĩa *et al.*, 2015).

Ngoài ra, việc lựa chọn vật liệu hữu cơ làm chất nền để bổ sung vi khuẩn ra ngoài môi trường đất cũng rất quan trọng vì chúng quyết định đến khả năng tồn tại và sống sót lâu dài của vi khuẩn trong đất giúp hỗ trợ cho sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Bã cà phê, xỉ than, cám gạo, mụn dừa và chuối là những loại vật liệu có số lượng lớn, giá thành rẻ và vẫn chứa nhiều chất dinh dưỡng rất thích hợp dùng để làm chất mang và chất nền cho việc bổ sung vi sinh vật để sản xuất chế phẩm phân hữu cơ vi sinh. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu sử dụng các vật liệu này làm chế phẩm vi sinh. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm nghiên cứu hiệu quả và tuyển chọn một số vật liệu hữu cơ khác nhau dùng làm chất mang và chất nền cho việc sản xuất chế phẩm vi sinh từ ba dòng vi khuẩn *Burkholderia cepacia* BL1-10 (BL1-10), *Bacillus megaterium* ST2-9 (ST2-9) và *Bacillus aquimaris* KG6-3 (KG6-3), đồng thời, đánh giá hiệu quả của hai phương pháp bổ sung vi khuẩn vào chế phẩm vi

sinh ở dạng tự do và dạng cố định trong chất mang xỉ than tổ ong lên khả năng sống sót của chúng trong thời gian tồn trữ.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thí nghiệm 1: Đánh giá hiệu quả của bã cà phê (BCP) và xỉ than tổ ong (XTTO) dùng làm chất mang bổ sung ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3

Chuẩn bị chất mang

Vật liệu bã cà phê được thu thập từ shop cà phê ở quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ. Bã cà phê sau khi được thu về được rửa sạch và sau đó đem phơi khô ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Vật liệu xỉ than tổ ong cũng được thu thập trong khu vực thành phố Cần Thơ, sau đó phơi khô, tách nhỏ bằng chày và cối sứ. Hai vật liệu sau khi phơi khô được sàng qua rây có kích thước 2x2 mm và xác định ẩm độ trước khi bố trí thí nghiệm. Các loại chất mang bố trí trong thí nghiệm gồm: bã cà phê, xỉ than tổ ong và hỗn hợp gồm bã cà phê và xỉ than tổ ong (tỉ lệ 1:1, w/w). Sau đó ba loại chất mang được tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Chuẩn bị nguồn vi khuẩn

Nguồn vi khuẩn dùng trong bố trí thí nghiệm bao gồm 3 dòng vi khuẩn như sau: 1/ BL1-10 (vi khuẩn hòa tan lân), 2/ KG6-3 (vi khuẩn cố định đạm) và 3/ ST2-9 (vi khuẩn tổng hợp hormone thực vật IAA). Cả ba dòng vi khuẩn này được phân lập từ nền đất lúa trong mô hình canh tác lúa tôm lần lượt ở Bạc Liêu, Kiên Giang và Sóc Trăng. Các dòng vi khuẩn được nhân mật độ riêng lẻ trong bình tam giác 100 mL có chứa sẵn 30 mL môi trường dinh dưỡng TSB bổ sung 1% NaCl đã được tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Các bình tam giác chứa vi khuẩn được lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 90 vòng/phút, trong tối và trong 3 ngày. Sau đó, tiến hành thu sinh khối của từng dòng vi khuẩn bằng cách ly tâm thu sinh khối vi khuẩn trong ống Falcon 50 mL riêng biệt đã tiệt trùng trong 3 phút với tốc độ 6.000 vòng/phút. Loại bỏ phần nước ở bên trên, thu phần sinh khối ở phía dưới, tiếp tục cho 20 mL nước khử khoáng tiệt trùng vào ống Falcon chứa sinh khối vi khuẩn, vortex trong 2 phút, tiếp tục ly tâm trong 3 phút với tốc độ 6.000 vòng/phút¹. Toàn bộ quy trình này được lặp lại 4 lần nhằm loại bỏ nguồn dinh dưỡng từ môi trường nuôi cấy. Sau đó, hiệu chỉnh độ đục của dung dịch huyền phù chứa vi khuẩn với nước khử khoáng tiệt trùng trên máy đo quang phổ (Spectrometer Thermo

Scientific, Multiskan Spectrum) để đạt độ đục (optical density) $OD_{600\text{ nm}} = 0,7$. Xác định mật độ vi khuẩn ban đầu của từng dòng vi khuẩn trước khi bổ sung vào chất mang bằng phương pháp nhỏ giọt (Hoben và Somasegaran, 1982): Hút 50 μL dung dịch vi khuẩn của mỗi nồng độ pha loãng (hệ số pha loãng 10) và nhỏ 5 giọt dịch vi khuẩn của mỗi nồng độ lên trên bề mặt môi trường TSA có bổ sung 1% NaCl. Đối với hỗn hợp ba dòng vi khuẩn, mật độ vi khuẩn được xác định bằng cách trải lên trên đĩa môi trường TSA có bổ sung 1% NaCl bằng que chĩa. Sau đó, đặt các đĩa môi trường TSA chứa vi khuẩn trong tủ ủ ở nhiệt độ 35°C . Mật độ khuẩn lạc được xác định sau 3 ngày ủ.

Bố trí thí nghiệm

Quy trình bố trí thí nghiệm như sau: Cho 29 mL môi trường khoáng tối thiểu bổ sung 1% NaCl và 1 mL dung dịch vi khuẩn được chuẩn bị ở mục *chuẩn bị nguồn vi khuẩn* vào bình tam giác 150 mL chứa sẵn 1 g chất mang đã chuẩn bị ở mục *chuẩn bị chất mang*. Sau đó, đặt các bình tam giác lên máy lắc ngang với tốc độ 90 vòng.phút⁻¹, trong

16 giờ. Đối với thí nghiệm hỗn hợp 3 dòng vi khuẩn được tiến hành bằng cách cho 0,5 mL dung dịch mỗi dòng vi khuẩn vào bình tam giác chứa sẵn 28,5 mL môi trường khoáng tối thiểu bổ sung 1% NaCl. Thành phần môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 1 % NaCl trong 1 L dung dịch gồm: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,05 g, KH_2PO_4 0,2 g, NaCl 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,41 g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,13 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 mg.L⁻¹, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mg.L⁻¹, H_3BO_3 2,5 mg.L⁻¹. Các chất $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl, được pha riêng với các chất $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Môi trường được khử trùng ở 121°C kéo dài 20 phút trong nồi hấp tiệt trùng, sau đó bổ sung 10 mL dung dịch vi lượng có thành phần: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 mg.L⁻¹, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mg.L⁻¹, H_3BO_3 2,5 mg.L⁻¹ vào môi trường vừa mới tiệt trùng. Dung dịch vi lượng được lọc với màng lọc tiệt trùng (Minisart NY 25, Sartorius Stedim Biotech, GmHbH, Germany, đường kính 0,20 μm). Môi trường khoáng tối thiểu được hiệu chỉnh về pH = 7. Thí nghiệm có tổng cộng 12 nghiệm thức và 3 lần lặp lại. Các nghiệm thức được liệt kê như sau:

- NT1: Vi khuẩn BL1-10 (7×10^9 CFU.mL⁻¹) + 1 g bã cà phê.
- NT2: Vi khuẩn BL1-10 (7×10^9 CFU.mL⁻¹) + 1 g xỉ than tổ ong.
- NT3: Vi khuẩn BL1-10 (7×10^9 CFU.mL⁻¹) + 1 g hỗn hợp (bã cà phê + xỉ than tổ ong)
- NT4: Vi khuẩn ST2-9 (3×10^6 CFU.mL⁻¹) + 1 g bã cà phê.
- NT5: Vi khuẩn ST2-9 (3×10^6 CFU.mL⁻¹) + 1 g xỉ than tổ ong.
- NT6: Vi khuẩn ST2-9 (3×10^6 CFU.mL⁻¹) + 1 g hỗn hợp (bã cà phê + xỉ than tổ ong)
- NT7: Vi khuẩn KG6-3 (4×10^6 CFU.mL⁻¹) + 1 g bã cà phê.
- NT8: Vi khuẩn KG6-3 (4×10^6 CFU.mL⁻¹) + 1 g xỉ than tổ ong.
- NT9: Vi khuẩn KG6-3 (4×10^6 CFU.mL⁻¹) + 1 g hỗn hợp (bã cà phê + xỉ than tổ ong)
- NT10: Hỗn hợp ba dòng vi khuẩn (BL1-10; ST2-9 và KG6-3) (1×10^7 CFU.mL⁻¹) + 1 g bã cà phê.
- NT11: Hỗn hợp ba dòng vi khuẩn (BL1-10; ST2-9 và KG6-3) (1×10^7 CFU.mL⁻¹) + 1 g xỉ than tổ ong.
- NT12: Hỗn hợp ba dòng vi khuẩn (BL1-10; ST2-9 và KG6-3) (1×10^7 CFU.mL⁻¹) + 1 g hỗn hợp (bã cà phê + xỉ than tổ ong).

Chỉ tiêu theo dõi

Chỉ tiêu theo dõi trong suốt thời gian thí nghiệm gồm: mật độ dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9, KG6-3 và hỗn hợp ba dòng vi khuẩn cố định trong 1 g chất mang (trọng lượng khô) sau 16 giờ nuôi cấy. Mật độ vi khuẩn trong chất mang sau 16 giờ nuôi cấy được xác định như sau: thu chất mang trong bình tam giác 150 mL chứa vi khuẩn cho vào ống Falcon 50 mL chứa 30 mL nước khử khoáng tiệt trùng, lắc trên máy lắc với tốc độ 100 vòng.phút⁻¹, sau đó, loại bỏ phần nước. Lặp lại qui trình rửa này trong 3 lần. Sau đó, dùng đĩa thủy tinh tiệt trùng nghiền nhỏ chất mang. Tiếp theo, cho 20 mL

dung dịch đệm buffer phosphates vào, trộn đều bằng máy vortex ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 1 phút và lắc trên máy lắc ngang với tốc độ 180 vòng.phút⁻¹ trong 60 phút. Tham khảo mục *chuẩn bị nguồn vi khuẩn* cho phương pháp đếm mật độ vi khuẩn.

Thí nghiệm 2: Xác định âm độ thích hợp cho ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3 phát triển trong vật liệu chất nền cám gạo

Chuẩn bị vật liệu chất nền cám gạo

Cám gạo sau khi thu mua từ cửa hàng thức ăn

gia súc tại khu vực thành phố Cần Thơ được sản qua ray kích thước 2x2 mm và xác định ẩm độ trước khi bố trí thí nghiệm. Cân 35 g cám gạo (trọng lượng khô) vào các bình tam giác 250 mL, sau đó, tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút và tiệt trùng liên tục trong 3 lần, mỗi lần cách nhau 4 giờ. Đồng thời, một lượng mẫu 5 g cám (trọng lượng khô) sấy khô kiệt ở nhiệt độ 105°C trong 8 giờ, tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Chuẩn bị nguồn vi khuẩn

Chuẩn bị nguồn vi khuẩn tham khảo mục *chuẩn bị nguồn vi khuẩn ở phần trên*.

NT1: BL1-10 (2.1×10^{10} CFU.g⁻¹) + 20% ẩm độ

NT2: BL1-10 (2.1×10^{10} CFU.g⁻¹) + 30% ẩm độ

NT3: BL1-10 (2.1×10^{10} CFU.g⁻¹) + 40% ẩm độ

NT4: BL1-10 (2.1×10^{10} CFU.g⁻¹) + 50% ẩm độ

NT5: ST2-9 (5×10^6 CFU.g⁻¹) + 20% ẩm độ

NT6: ST2-9 (5×10^6 CFU.g⁻¹) + 30% ẩm độ

NT7: ST2-9 (5×10^6 CFU.g⁻¹) + 40% ẩm độ

NT8: ST2-9 (5×10^6 CFU.g⁻¹) + 50% ẩm độ

NT9: KG6-3 (1×10^7 CFU.g⁻¹) + 20% ẩm độ

NT10: KG6-3 (1×10^7 CFU.g⁻¹) + 30% ẩm độ

NT11: KG6-3 (1×10^7 CFU.g⁻¹) + 40% ẩm độ

NT12: KG6-3 (1×10^7 CFU.g⁻¹) + 50% ẩm độ

NT13: Hỗn hợp ba dòng vi khuẩn (1×10^9 CFU.g⁻¹) + 20% ẩm độ

NT14: Hỗn hợp ba dòng vi khuẩn (1×10^9 CFU.g⁻¹) + 30% ẩm độ

NT15: Hỗn hợp ba dòng vi khuẩn (1×10^9 CFU.g⁻¹) + 40% ẩm độ

NT16: Hỗn hợp ba dòng vi khuẩn (1×10^9 CFU.g⁻¹) + 50% ẩm độ

Chỉ tiêu theo dõi

Mật độ của ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9, KG6-3 và hỗn hợp ba dòng vi khuẩn này trong chất nền cám gạo tại các thời điểm 4, 8 và 15 ngày sau khi nuôi cấy. Quy trình xác định mật độ vi khuẩn như sau: Trước khi thu mẫu, cám được trộn đều và lấy 1 g cám (trọng lượng khô) cho vào ống falcon 50 mL, sau đó thêm 20 mL dung dịch đệm buffer phosphates (23,99 g NaH₂PO₄ và 15,59 g Na₂HPO₄ trong 1 L nước cất) vào ống falcon, vortex với tốc độ 2.000 vòng.phút⁻¹ trong 1 phút và lắc trên máy lắc ngang với tốc độ 180 vòng.phút⁻¹ trong 60 phút. Dung dịch vi khuẩn sau khi lắc được pha loãng với các nồng độ khác nhau (hệ số pha loãng 10). Tham khảo mục

Bố trí thí nghiệm

Cho 1 mL dung dịch vi khuẩn đã chuẩn bị mục *chuẩn bị nguồn vi khuẩn* vào 5 g cám khô kiệt đã được chuẩn bị ở mục *chuẩn bị vật liệu chất nền cám gạo*, dùng spatula trộn đều vi khuẩn vào trong cám, sau đó, cho tất cả hỗn hợp trên vào bình tam giác 250 mL chứa 35g cám đã chuẩn bị sẵn. Tiếp theo, thêm nước khử khoáng tiệt trùng vào trong cám để đạt các mức ẩm độ theo từng nghiệm thức: (1) 20%, (2) 30%, (3) 40% và (4) 50%, trộn đều trong 2 phút, sau đó dùng spatula chuyên biệt nén vật liệu cám về tỷ trọng 1.3 g.cm⁻³. Thí nghiệm gồm 16 nghiệm thức và 3 lặp lại cho mỗi nghiệm thức. Các nghiệm thức được liệt kê như sau:

chuẩn bị nguồn vi khuẩn cho phương pháp đếm mật độ vi khuẩn trong cám gạo. Trong quá trình thí nghiệm ẩm độ của chất nền cám gạo được kiểm tra và duy trì theo ẩm độ ban đầu của mỗi nghiệm thức.

Thí nghiệm 3: Chọn lọc chất nền phù hợp dùng làm chế phẩm vi sinh cho ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3

Chuẩn bị vật liệu hữu cơ gồm: cám gạo, vỏ chuối, ruột chuối và mụn dừa dùng làm chất nền

Cám gạo: được thu mua từ cửa hàng thức ăn gia súc tại khu vực thành phố Cần Thơ được sản qua ray kích thước 2x2 mm, sau đó được tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút và tiệt trùng liên tục trong 3 lần,

mỗi lần cách nhau 4 giờ. Cuối cùng trộn đều với đường vàng theo tỉ lệ 15:1 (w/w).

Vỏ chuối và ruột chuối chín: Chuối già chín được thu thập trong khu vực thành phố Cần Thơ, sau đó tách riêng phần vỏ và ruột chuối. Phần vỏ và ruột chuối được sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 105°C, trong 36 giờ. Sau đó, nghiền mịn phần vỏ chuối và ruột chuối đã sấy khô, sàng qua rây kích thước 2x2 mm và trộn đều từng phần riêng lẻ. Tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút và tiệt trùng liên tục trong 3 lần, mỗi lần cách nhau 4 giờ. Cuối cùng trộn đều vỏ chuối với cám gạo và đường vàng theo tỉ lệ (15:15:1) cũng như ruột chuối với cám gạo và đường vàng theo tỉ lệ (15:15:1).

Mụn dừa được thu mua trong khu vực thành phố Cần Thơ và rửa 4 lần với nước vòi, sau đó phơi khô ở nhiệt độ phòng. Tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút và tiệt trùng liên tục trong 3 lần, mỗi lần cách nhau 4 giờ. Cuối cùng trộn đều cám gạo, mụn dừa và đường vàng theo tỉ lệ (20:10:1).

Chuẩn bị nguồn vi khuẩn

Nguồn vi khuẩn được sử dụng cho thí nghiệm này là hỗn hợp của cả ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3.

Chuẩn bị nguồn vi khuẩn dạng tế bào tự do: tham khảo mục *chuẩn bị nguồn vi khuẩn*.

Nguồn vi khuẩn cố định trong chất mang xi than tổ ong: Vi khuẩn dạng cố định trong chất mang xi

than cũng được chuẩn bị tương tự dạng tự do (mục *chuẩn bị nguồn vi khuẩn*). Xi than tổ ong được phơi khô, nghiền nhỏ, sàng qua rây có kích thước 2x2 mm và xác định ẩm độ. Xi than tổ ong cho vào bình tam giác 150 mL và tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, sau đó, bổ sung ba dòng vi khuẩn vào và mật độ vi khuẩn trong chất mang được xác định.

Bố trí thí nghiệm

Đối với nghiệm thức chứa vi khuẩn tự do trong chất nền: Bổ sung 1 mL dung dịch vi khuẩn đã chuẩn bị sẵn vào 5 g của từng loại chất nền đã chuẩn bị sẵn, trộn đều và chuyển 5 g chứa vi khuẩn vào 25 g chất nền chứa sẵn trong bình tam giác 250ml. Sau đó hiệu chỉnh ẩm độ chất mang về ẩm độ 50% (ẩm độ tối ưu cho vi khuẩn phát triển tốt trong chất nền cám gạo), trộn đều trong 2 phút và nén vật liệu chất nền về tỷ trọng 1,3 g.cm⁻³.

Đối với các nghiệm thức chứa vi khuẩn được cố định trong chất mang xi than tổ ong bổ sung vào trong chất nền: Bổ sung 4% (trọng lượng khô kiệt của chất nền) xi than đã chuẩn bị trước vào trong 5 g vật liệu chất nền (trọng lượng khô), trộn đều trong 1 phút, sau đó, chuyển vào bình tam giác chứa 20 g chất nền, trộn đều trong 2 phút. Cuối cùng hiệu chỉnh ẩm độ chất mang về ẩm độ 50% và nén vật liệu chất nền về tỷ trọng 1.3 g.cm³. Thí nghiệm có tất cả 8 nghiệm thức với 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức. Các nghiệm thức được liệt kê như sau:

NT1: Cám gạo + đường vàng (15:1) + hỗn hợp vi khuẩn tự do (1,6x10⁸ CFU.g⁻¹).

NT2: Cám gạo + đường vàng (15:1) + hỗn hợp vi khuẩn cố định trong xi than (1,7 x 10⁸ CFU.g⁻¹).

NT3: Cám gạo + vỏ chuối + đường vàng (15:15:1) + hỗn hợp vi khuẩn tự do (1,6x10⁸ CFU.g⁻¹).

NT4: Cám gạo + vỏ chuối + đường vàng (15:15:1) + hỗn hợp vi khuẩn cố định sẵn trong xi than (1,7 x 10⁸ CFU.g⁻¹).

NT5: Cám gạo + ruột chuối + đường vàng (15:15:1) + hỗn hợp vi khuẩn tự do (1,6x10⁸ CFU.g⁻¹).

NT6: Cám gạo + ruột chuối + đường vàng (15:15:1) + hỗn hợp vi khuẩn cố định trong xi than (1,7 x 10⁸ CFU.g⁻¹).

NT7: Cám gạo + mụn dừa + đường vàng (20:10:1) + hỗn hợp vi khuẩn tự do (1,6x10⁸ CFU.g⁻¹).

NT8: Cám gạo + mụn dừa + đường vàng (20:10:1) + hỗn hợp vi khuẩn cố định trong xi than (1,7 x 10⁸ CFU.g⁻¹).

Chỉ tiêu theo dõi

Mật độ vi khuẩn ở các nghiệm thức tại các thời điểm 1, 3, 6, 9, 11 và 18 tuần sau khi bổ sung vi khuẩn vào chất nền. Đồng thời, ẩm độ của chất nền cũng được kiểm tra và duy trì trong suốt thời gian bố trí thí nghiệm.

Xử lý số liệu

Các số liệu trong các thí nghiệm được tính toán

bằng phần mềm Microsoft excel 2013 và kiểm định thống kê với ANOVA bằng phần mềm Minitab 17.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thành phần hóa học của vật liệu bã cà phê và xi than tổ ong dùng làm chất mang

Thành phần hóa học của bã cà phê và xi than tổ ong được thể hiện trong bảng 1. Nhìn chung độ ẩm và

hàm lượng của đa số các thành phần dinh dưỡng trong vật liệu bã cà phê cao hơn so với xỉ than tổ ong, cụ thể như sau: ẩm độ của bã cà phê là 22,54% trong khi xỉ than tổ là 1,33%. Hàm lượng chất hữu cơ, carbon và đạm tổng số trong bã cà phê lần lượt là 73,96%, 12,67% và 2,99% và đều cao hơn rất nhiều so với xỉ than tổ ong (các thành phần này lần lượt 12,67%, 1,52% và 0,07%). Đồng thời, bã cà phê có hàm lượng P, Ca và Mg tổng số lần lượt 0,51%, 0,25% và 0,78% cao hơn so với xỉ than tổ ong (các thành phần này lần lượt chiếm 0,35%, 0,01% và 0,69%). Ngược lại, xỉ than tổ ong có hàm lượng K và Na tổng số chiếm 1,53% và 0,65%, cao hơn so với bã cà phê (1,16% và 0,44%). pH của bã cà phê (5,90) thấp hơn so với xỉ than tổ ong (6,30), trong khi đó, EC của bã cà phê (7,40 mS.cm⁻¹) cao hơn so với xỉ than tổ ong (1,83 mS.cm⁻¹). Từ các phân tích trên cho thấy bã cà phê và xỉ than có thể dùng làm chất mang để cố định vi sinh vật.

Bảng 1. Thành phần hóa học của chất mang bã cà phê và xỉ than tổ ong.

Thành phần hóa học	Vật liệu	
	Bã cà phê	Xỉ than tổ ong
Ẩm độ (%)	22,54	1,33
pH	5,90	6,30
EC (mS.cm ⁻¹)	7,40	1,83
CHC (%)	73,96	12,67
C (%)	45,08	1,52
N _{is} (%)	2,99	0,07
P _{is} (%)	0,51	0,35
K _{is} (%)	1,16	1,53
CaO (%)	0,25	0,01
MgO (%)	0,78	0,69
Na ₂ O (%)	0,44	0,65

Ghi chú: *ts là tổng số.*

Thí nghiệm 1: Chọn lọc chất mang phù hợp để bổ sung ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3

Bảng 2 trình bày mật độ ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3 cố định trong các vật liệu chất mang thử nghiệm cho thấy mật độ của ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9, KG6-3 và hỗn hợp của chúng trong các chất mang đều tăng lên so với mật độ vi khuẩn ban đầu sau 16 giờ nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu. Điều đó cho thấy các dòng vi khuẩn đều có khả năng bị cố định trong các loại chất mang thử nghiệm, sau đó, sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường nuôi cấy. Mật độ vi khuẩn

BL1-10 sau 16 giờ nuôi cấy trong các loại chất mang đều tăng cao hơn so với mật độ vi khuẩn ban đầu (9,85 log CFU.g⁻¹ chất mang) trong đó mật độ vi khuẩn trong hỗn hợp hai loại chất mang gồm: bã cà phê và xỉ than tổ ong là 13,0 log CFU.g⁻¹ chất khô, cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05%) so với các loại chất mang còn lại (bã cà phê và xỉ than tổ ong riêng lẻ lần lượt 12,09 và 10,94 log CFU.g⁻¹ chất khô). Như vậy khi kết hợp hai loại vật liệu bã cà phê và xỉ than tổ ong làm chất mang sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho dòng vi khuẩn BL1-10 sinh trưởng, và phát triển tốt hơn. Điều này có thể giải thích là do thành phần các chất dinh dưỡng của hai loại vật liệu này khi kết hợp sẽ bổ sung cho nhau dẫn đến dinh dưỡng thiết yếu cho vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy được cải thiện vì bã cà phê có hàm lượng chất hữu cơ, carbon, đạm, lân và Mg tổng số cao, trong khi xỉ than tổ ong có hàm lượng kali và natri tổng số cao hơn bã cà phê. Do đó, việc lựa chọn chất mang phù hợp giúp kéo dài thời gian sống sót của vi sinh vật cũng như giúp duy trì mật độ cao của vi sinh vật được bổ sung ngoài thực tế đồng ruộng là rất quan trọng. Ngoài ra, các đặc tính về vật lý và hóa học của chất mang cũng quyết định đến sự thành công của chất mang vì các chất mang có vật liệu khác nhau luôn khác nhau về đặc tính lý và hóa học.

Mật độ dòng vi khuẩn ST2-9 trong xỉ than tổ ong cao nhất đạt 10,24 log CFU.g⁻¹ chất khô và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với hai loại chất mang còn lại (bã cà phê và hỗn hợp gồm bã cà phê và xỉ than). Trong khi đó, mật độ vi khuẩn trong bã cà phê đạt 9,32 log CFU.g⁻¹ chất khô không khác biệt ý nghĩa thống kê (p>0,05) so với mật độ vi khuẩn trong hỗn hợp hai chất mang bã cà phê và xỉ than tổ ong (8,88 log CFU.g⁻¹ chất khô), điều đó cho thấy khả năng sinh trưởng của dòng vi khuẩn ST2-9 trong chất mang xỉ than tốt hơn so với chất mang bã cà phê có thể là do các đặc tính của bã cà phê như pH thấp (5,90), và một số thành phần hóa học trong bã cà phê không thích hợp cho các yêu cầu về sinh trưởng và phát triển của dòng vi khuẩn ST2-9 nên dẫn đến tốc độ nhân mật độ vi khuẩn ST2-9 trong bã cà phê chậm hơn so với xỉ than tổ ong. Như vậy, dòng vi khuẩn ST2-9 cố định tốt nhất và nhân mật độ vi khuẩn tốt nhất trong vật liệu xỉ than tổ ong.

Tương tự như dòng vi khuẩn ST2-9, dòng vi khuẩn KG6-3 cố định trong chất mang xỉ than cao nhất, đạt 9,29 log CFU.g⁻¹ chất khô và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với hai loại chất mang còn lại sau 16 giờ nuôi cấy. Mật độ vi khuẩn trong bã cà phê và hỗn hợp bã cà phê với xỉ than đạt lần

lượt 7,91 và 8,28 log CFU.g⁻¹ chất khô, không khác biệt ý nghĩa thống kê (p>0,05) khi so sánh với nhau. Như vậy, dòng vi khuẩn KG6-3 cố định tốt nhất trong xỉ than tổ ong có thể là do xỉ than tổ ong có pH và dinh dưỡng phù hợp cho sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn KG6-3, ngoài ra cũng có thể là do vi khuẩn KG6-3 có cấu trúc màng và vách tế bào có ái lực mạnh với xỉ than tổ ong nên mật độ vi khuẩn KG6-3 được cố định trong chất mang xỉ than tổ ong cao hơn các vật liệu khác.

Bên cạnh đó, mật độ vi khuẩn cố định trong 3 chất mang đều tăng cao hơn so với mật độ vi khuẩn ban đầu (7,11 log CFU.g⁻¹ chất khô) và không khác biệt ý nghĩa thống kê so với nhau (p>0,05). Cụ thể như sau: mật độ vi khuẩn cố định trong bã cà phê đạt 9,06 log CFU.g⁻¹ chất khô; xỉ than tổ ong đạt 9,38 log CFU.g⁻¹ chất khô và hỗn hợp hai loại vật liệu gồm xỉ than và bã cà phê đạt 9,24 log CFU.g⁻¹ chất khô. Do đó, cả ba loại chất mang thử nghiệm đều thích hợp làm chất mang giúp cố định ba dòng vi khuẩn thử nghiệm. Việc mật độ vi khuẩn cố định trong 3 chất mang thử nghiệm tăng lên ở nghiệm thức chứa hỗn hợp 3 dòng vi khuẩn có thể giải thích là do có sự hỗ trợ dinh dưỡng thể hiện mối quan hệ hiệp đồng giữa hai hoặc trên hai nhóm loài vi sinh vật cung cấp dinh

dưỡng cho nhau, mỗi quan hệ này không mang tính chuyên biệt, tức là các nhóm loài đó vẫn có thể tồn tại độc lập trong môi trường thiên nhiên, do đó tạo nên sự không khác biệt giữa mật độ vi khuẩn cố định trong các loại chất mang ba dòng vi khuẩn được cho vào một môi trường nuôi cấy và do mối quan hệ hỗ trợ dinh dưỡng cho nhau mà chúng đều sinh trưởng tốt trong ba loại chất mang thử nghiệm (Nguyễn Lâm Dũng *et al.*, 2012). Tóm lại, kết quả thí nghiệm chọn lọc chất mang phù hợp nhất để bổ sung ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3 cho thấy dòng vi khuẩn BL1-10 được cố định tốt nhất trong chất mang chứa hỗn hợp gồm bã cà phê và xỉ than tổ ong, trong khi đó xỉ than tổ ong là loại chất mang cố định tốt nhất cho cả hai dòng vi khuẩn ST2-9 và KG6-3. Bên cạnh đó, cả ba chất mang này đều thích hợp cho việc cố định hỗn hợp ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3. Như vậy, việc sử dụng vật liệu chất mang (bã cà phê và xỉ than) để bổ sung vi sinh vật giúp bảo vệ vi sinh vật sống sót trong thời gian dài hơn trong điều kiện môi trường thực tế là thật sự cần thiết (Ardakani *et al.*, 2010). Trong đó, vật liệu xỉ than là loại vật liệu dễ tìm, dễ sử dụng cũng như dễ xử lý, do đó, xỉ than được sử dụng như là chất mang dùng để bổ sung 3 dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3 trong các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Mật độ vi khuẩn dòng BL1-10, ST2-9, KG6-3 và hỗn hợp 3 dòng vi khuẩn cố định trong các loại chất mang thử nghiệm sau 16 giờ nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu (n=3, độ lệch chuẩn).

Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn ban đầu	Chất mang		
		Bã cà phê	Xỉ than tổ ong	Bã cà phê + xỉ than tổ ong (1:1)
BL1-10	9,85d	12,39b	10,94c	13,00a
ST2-9	6,48c	8,87b	10,24a	8,88b
KG6-3	6,66c	8,15b	9,29a	8,28b
BL1-10, ST2-9 và KG6-3	7,11b	9,06a	9,38a	9,24a

Ghi chú: Các chữ số hiển thị khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% trong bảng chỉ dùng để so sánh các số liệu giữa các chất mang với nhau trong cùng một vi khuẩn, không so sánh các dòng vi khuẩn khác nhau trong cùng một vật liệu chất mang (n=4).

Thí nghiệm 2: Xác định ẩm độ thích hợp cho ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3 phát triển trong vật liệu cám gạo

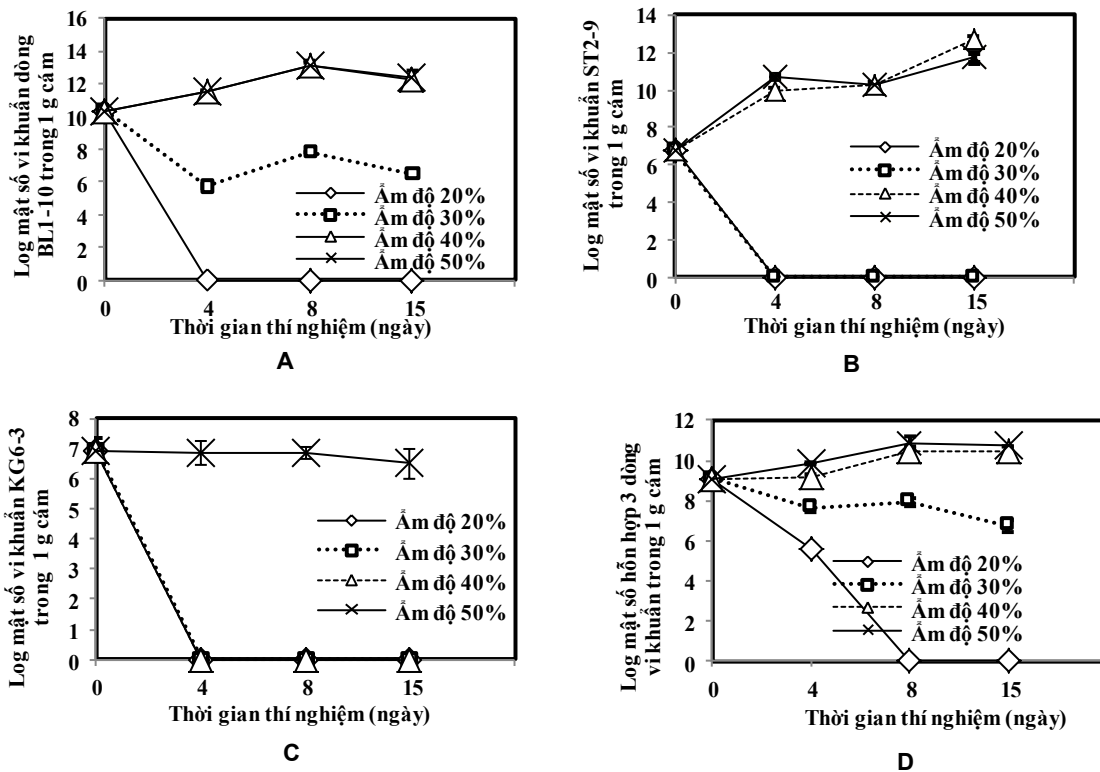
Hình 1 hiển thị mật độ vi khuẩn BL1-10, ST2-9, KG6-3 và hỗn hợp gồm ba dòng vi khuẩn trong chất nền cám gạo ở các mức ẩm độ khác nhau cho thấy mật độ ba dòng vi khuẩn thử nghiệm trong chất nền cám gạo có xu hướng tăng lên cao hơn so với mật độ ban đầu ở hai nghiệm thức bổ sung 40 và 50% ẩm độ, trong khi các nghiệm thức có ẩm độ khác (20 và 30%) mật độ vi khuẩn giảm mạnh. Các nghiệm thức trong cùng một vi khuẩn có sự khác biệt ý nghĩa

thống kê khi so sánh với nhau.

Hai nghiệm thức ẩm độ 40 và 50% ở thí nghiệm với dòng vi khuẩn BL1-10 có mật độ vi khuẩn không khác biệt ý nghĩa thống kê (p>0,05) vào các thời điểm thu mẫu khi so sánh với nhau, cả hai nghiệm thức này đều có mật độ vi khuẩn cao hơn 10 log CFU.g⁻¹ chất nền và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (ẩm độ 20 và 30%). Mật độ vi khuẩn tăng rất nhanh sau 15 ngày thí nghiệm. Tuy nhiên, nghiệm thức có ẩm độ 30% mật độ vi khuẩn BL1-10 trong chất nền vẫn còn cao (> 6 log CFU.g⁻¹) (Hình 1a). Tương tự như vi khuẩn BL1-10, dòng vi khuẩn ST2-9 phát triển

mật độ cao nhất và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác ở nghiệm thức có ẩm độ 40 và 50% và cả hai nghiệm thức này không khác biệt thống kê khi so sánh với nhau. Hai nghiệm thức có ẩm độ 20 và 30% mật độ vi khuẩn không được phát hiện sau 4 ngày thí nghiệm. Mật độ vi khuẩn ST2-9 của hai nghiệm thức có ẩm độ 40 và 50% có mật độ tăng rất nhanh và mạnh sau 15 ngày thí nghiệm (Hình 1b). Riêng đối với dòng vi khuẩn KG6-3, dòng vi khuẩn KG6-3 chỉ phát triển mật độ cao nhất và khác biệt thống kê so với các nghiệm thức còn lại ở ẩm độ 50%, các nghiệm thức có ẩm độ thấp hơn (20, 30 và 40%) mật độ vi khuẩn dòng KG6-3 đã không được phát hiện sau 4 ngày thí nghiệm, tuy nhiên, mật độ vi khuẩn KG6-3 hầu như không phát triển trong suốt 15 ngày thí nghiệm, chỉ duy trì mật độ ban đầu khi được bổ sung vào và mật độ giảm xuống nhẹ vào ngày 15 (Hình 1c). Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự kết quả của các nghiên cứu trước đây cho thấy ẩm độ chất nền phù hợp cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển tốt dao động trong khoảng từ 30-85% (Gangadharan *et al.*, 2006). Ẩm độ là nhân tố quan trọng trong chất nền dùng để sản xuất phân bón sinh học vì ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật cũng như sản lượng của một số enzyme chuyên biệt do vi sinh vật tạo ra

(Sivaramakrishnan *et al.*, 2006). Thông thường vi khuẩn cần lượng nước hữu dụng cao cho tiến trình sinh trưởng và phát triển của chúng, lượng ẩm độ cần thiết trong chất nền thường tồn tại dưới dạng hấp phụ và phức hợp, khi đó tiến trình vận chuyển oxy trong chất nền được diễn ra tốt giúp vi khuẩn sinh trưởng và phát triển tối ưu (Gangadharan *et al.*, 2006). Ngược lại khi ẩm độ của chất nền giảm xuống sẽ gây ra tình trạng lượng dinh dưỡng của chất nền hòa tan vào trong nước thấp và khả năng trương nở và cầm giữ nước của chất nền giảm xuống (Balkan, Ertan, 2007). Tuy nhiên, khi ẩm độ cao sẽ làm giảm sự thoáng khí, thay đổi cấu trúc hạt của chất nền, vật liệu chất nền bị dính chặt lại với nhau, làm giảm thể tích dạng khí và làm giảm sự khuếch tán và kết quả dẫn đến sự vận chuyển oxy trong chất nền bị giảm xuống. Như vậy mức ẩm độ 50% là mức ẩm độ phù hợp nhất cho sự thích nghi, sinh trưởng và phát triển của ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9, KG6-3 và hỗn hợp ba dòng vi khuẩn này khi được phát triển trên chất nền làm từ cám gạo và cám gạo có khả năng cung cấp dinh dưỡng hỗ trợ cho sự sinh trưởng và phát triển của ba dòng vi khuẩn thử nghiệm và là nguồn dinh dưỡng duy nhất trong trong chất nền. Do đó, 50 % là ẩm độ chất nền được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Diễn biến mật độ vi khuẩn của ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9, KG6-3 và hỗn hợp của chúng trong vật liệu cám gạo ở các mức ẩm độ 20%, 30%, 40% và 50% theo thời gian thí nghiệm (n = 4, độ lệch chuẩn).

Thí nghiệm 3: Chọn lọc chất nền phù hợp dùng làm chế phẩm vi sinh cho ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3

Thành phần hóa học của các vật liệu hữu cơ dùng làm chất nền

Kết quả phân tích thành phần hóa học của các vật liệu hữu cơ dùng làm chất nền gồm: cám, mụn dứa, cám + vỏ chuối, cám + ruột chuối được trình bày ở bảng 3. Nhìn chung các vật liệu cám, mụn dứa, cám + vỏ chuối, cám + ruột chuối có hàm lượng chất hữu cơ và carbon khá cao, trong đó hàm lượng carbon đạt từ 88,66% đến 93,47% ứng với vật liệu cám và mụn dứa, hàm lượng chất hữu cơ trong vật liệu cám + vỏ chuối thấp nhất là 57,49% và giá trị này đạt cao nhất trong vật liệu cám + ruột chuối (60,44%). Hàm lượng đạm tổng số thấp nhất trong vật liệu mụn dứa (0,23%) và cao nhất trong vật liệu

cám (1,48%). Bên cạnh đó, vật liệu cám + ruột chuối có hàm lượng đạm hữu dụng cao nhất (3,30 g.kg⁻¹), trong khi vật liệu mụn dứa có hàm lượng đạm hữu dụng thấp nhất (1,90 g.kg⁻¹). Hàm lượng lân tổng số cao nhất trong vật liệu cám (2,71%), thấp nhất trong vật liệu mụn dứa (0,981%). Ngược lại, hàm lượng lân hữu dụng cao nhất trong vật liệu mụn dứa (3,38 g.kg⁻¹) và thấp nhất trong vật liệu cám (2,50 g.kg⁻¹). Hàm lượng kali tổng số cao nhất trong vật liệu cám + vỏ chuối (4,25%) nhưng lại thấp nhất trong vật liệu cám (1,24%). Đồng thời hàm lượng kali hòa tan trong vật liệu cám + vỏ chuối cao nhất (2,872%) và thấp nhất trong vật liệu cám (0,795%). Từ các phân tích trên, cho thấy các vật liệu cám, mụn dứa, cám + vỏ chuối, cám + ruột chuối có chứa nhiều chất dinh dưỡng với hàm lượng chất hữu cơ khá cao và do đó, rất thích hợp làm chất nền để bổ sung vi sinh vật.

Bảng 3. Thành phần hóa học của cám, mụn dứa, cám + vỏ chuối và cám + ruột chuối dùng làm chất nền trong thí nghiệm.

Thành phần hóa học	Vật liệu			
	Cám	Mụn dứa	Cám + vỏ chuối	Cám + ruột chuối
CHC (%)	88,66	93,47	89,10	89,78
C (%)	59,73	57,69	57,49	60,44
Nts (%N)	1,48	0,73	1,36	1,20
C/N	40,35	78,99	42,27	50,36
Pts (%P ₂ O ₅)	2,71	0,98	1,58	1,77
Kts (%K ₂ O)	1,24	1,97	4,25	1,41
P hữu dụng (g.kg ⁻¹)	2,50	3,38	2,56	2,38
K hòa tan (%K ₂ O)	0,80	2,30	2,87	1,55
NH ₄ ⁺ hữu dụng (g.kg ⁻¹)	3,03	1,90	2,47	3,30

Ghi chú: ts là tổng số.

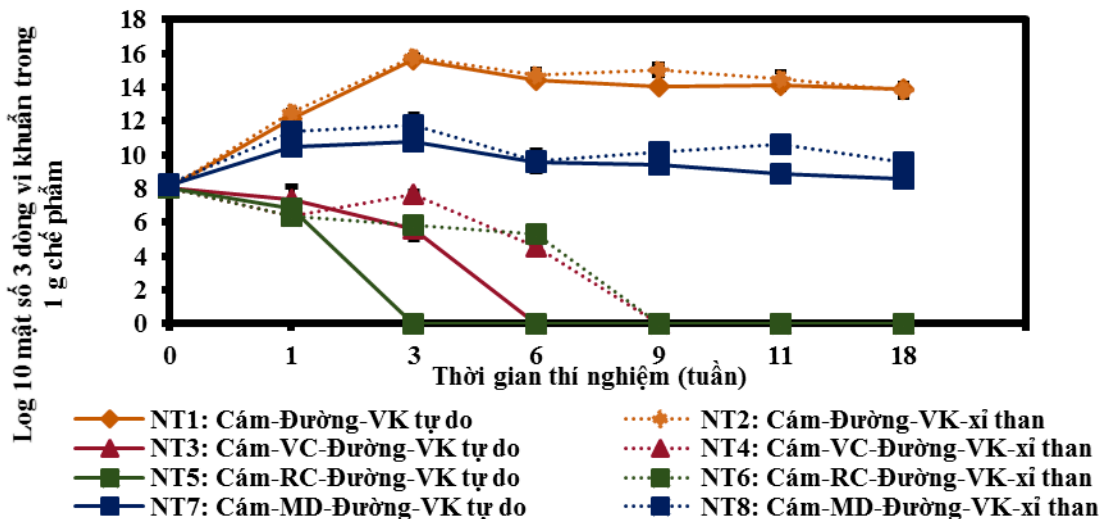
Mật độ vi khuẩn trong chất nền

Tuyển chọn chất nền dùng làm chế phẩm vi sinh là một bước rất quan trọng vì quyết định sự thành công của vi khuẩn bổ sung vào trong đất. Việc tuyển chọn một chất nền phù hợp và bền vững cho tiến trình nuôi cấy vi sinh vật làm chế phẩm sinh học là một nhân tố rất quan trọng và vì vậy việc chọn lọc một lượng lớn vật liệu từ nông nghiệp phục vụ công nghiệp cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển tốt là cần thiết. Khả năng sinh trưởng, phát triển và duy trì mật độ của hỗn hợp ba dòng vi khuẩn khi được bổ sung vào các loại chất nền khác nhau dưới dạng cố định trong chất mang xi than và dạng tự do được thể hiện qua hình 2. Nhìn chung, các nghiệm thức có chất nền từ hỗn hợp gồm vật liệu hữu cơ cám + đường

(NT1 và 2) có mật độ vi khuẩn cao nhất ở tất cả các thời điểm thu mẫu và kể đến là mật độ vi khuẩn ở hai nghiệm thức 7 và 8 có chất nền chứa hỗn hợp gồm cám + mụn dứa + đường. Cả 4 nghiệm thức đều giúp gia tăng mật độ ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3 và cao hơn so với mật độ vi khuẩn ở thời điểm ban đầu, tuy nhiên, sau 3 tuần nuôi cấy cho đến kết thúc thí nghiệm (18 tuần) mật độ vi khuẩn trong 4 nghiệm thức này (NT1, 2, 7 và 8) có xu hướng giảm nhẹ nhưng mật độ vẫn cao hơn 8 log CFU.g⁻¹. Trong khi đó, mật độ vi khuẩn ở các nghiệm thức có chất nền chứa hỗn hợp cám + vỏ chuối hoặc ruột chuối + đường (NT 3, 4, 5 và 6) giảm dần sau khi bổ sung vi khuẩn vào trong chất nền. Đến thời điểm 3, 6 và 9 tuần thí nghiệm, mật độ vi khuẩn ở 4 nghiệm thức này không được phát hiện, tức là vi khuẩn không còn sống

sốt trong chất nền thí nghiệm. Kết quả này cho thấy chất nền chứa hỗn hợp gồm cám + đường và chất nền từ cám gạo + mụn dừa + đường vàng là hai chất nền phù hợp nhất để bổ sung hỗn hợp ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9, KG6-3 cố định trong xỉ than tổ ong làm chế phẩm sinh học và chất nền chứa hỗn hợp gồm cám + vỏ chuối hoặc ruột chuối + đường không thích hợp để bổ sung 3 dòng vi khuẩn làm chế phẩm sinh học. Như vậy rõ ràng kết quả này cho thấy cám gạo kết hợp với đường vàng với tỉ lệ 15:1 cho hiệu quả chất nền cao nhất trong việc duy trì và gia tăng mật độ của 3 dòng vi khuẩn thử nghiệm, có thể là do ở nghiệm thức 1 và 2, cám gạo kết hợp với đường vàng theo tỉ lệ (15:1) cho ra công thức có sự tối ưu về dinh dưỡng hữu dụng cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển, trong khi các công thức chất nền khác (NT3, 4, 5 và 6) như cám gạo + vỏ chuối/ruột chuối + đường vàng với tỉ lệ (15:15:1), với việc bổ sung hàm lượng đường từ vỏ chuối hoặc ruột chuối cao làm ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn vì theo Chirife *et al.*, (1983) cho thấy khi lượng đường gia tăng sẽ làm giảm sự hoạt động của nước, và từ đó dẫn đến việc tiếp xúc với nước của vi sinh vật bị giới hạn và do đó mật độ vi sinh vật bị giảm xuống. Riêng nghiệm thức 7 và 8 có chất nền gồm cám gạo + mụn dừa + đường vàng theo tỉ lệ 20:10:1 mặc dù không bổ sung lượng đường vào chất nền nhưng việc bổ sung mụn dừa có chức năng giúp chất nền thoáng khí, và điều này giúp duy trì mật độ vi khuẩn ở hai nghiệm thức này cao hơn 8 log CFU.g⁻¹ chất nền.

Ngoài ra, khi so sánh các nghiệm thức có cùng chất nền nhưng khác nhau về cách bổ sung vi khuẩn (dạng tự do và dạng cố định trong xỉ than tổ ong) cho thấy mật độ vi khuẩn ở nghiệm thức vi khuẩn được cố định trong xỉ than tổ ong cao hơn so với một số vi khuẩn ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn dạng tế bào tự do. Như vậy việc cố định vi khuẩn trong xỉ than tổ ong giúp kéo dài thời gian sống sót của vi khuẩn, đồng thời tạo điều kiện cho vi khuẩn thích nghi, sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường mới bởi chất mang xỉ than tổ ong bảo vệ và hạn chế các tác động bất lợi của môi trường sống bên ngoài lên đời sống vi khuẩn. Kết quả này tương tự như kết quả nghiên cứu của Nguyễn Khởi Nghĩa *et al.*, (2015) cho thấy hiệu quả phân hủy sinh học hoạt chất Propoxur trong đất bởi dòng vi khuẩn phân lập *Paracoccus* sp.P23-7 cố định trong biochar cao hơn so với khi bổ sung vi khuẩn dạng tự do và điều này cũng được giải thích là do chất mang biochar giúp bảo vệ vi khuẩn cố định bên trong sống sót trong điều kiện bất lợi của môi trường và một số vi khuẩn có thể phóng thích và du nhập ra ngoài môi trường đất từ biochar để thích nghi, sinh trưởng, phát triển và tham gia vào chức năng phân hủy Propoxur trong đất. Như vậy hỗn hợp ba dòng vi khuẩn sinh trưởng và phát triển tốt nhất trong chất nền cám + đường vàng (15:1) và chất nền cám gạo + mụn dừa + đường vàng (20:10:1), đồng thời với phương pháp bổ sung vi khuẩn vào chất nền dạng cố định trong chất mang xỉ than tổ ong sẽ giúp tăng khả năng sống sót của vi khuẩn trong thời gian dài hơn.



Hình 2. Diễn biến mật độ vi khuẩn của hỗn hợp ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9 và KG6-3 trong các loại chất nền với phương pháp bổ sung vi khuẩn dạng tự do và dạng cố định trong xỉ than tổ ong theo thời gian thí nghiệm (n=3 và độ lệch chuẩn). VC: vỏ chuối, RC: Ruột chuối, MD: Mụn dừa, VK: Vi khuẩn.

KẾT LUẬN

Xi than tổ ong là vật liệu tốt nhất dùng làm chất mang để cố định tốt nhất ba dòng vi khuẩn thử nghiệm gồm 1/ BL1-10 (vi khuẩn hòa tan lân), 2/ KG6-3 (vi khuẩn cố định đạm) và 3/ ST2-9 (vi khuẩn tổng hợp hormone thực vật IAA). Âm độ chất nền cám gạo 50% là âm độ thích hợp nhất để ba dòng vi khuẩn thử nghiệm nhân mật độ cao nhất và loại chất nền dùng làm chế phẩm vi sinh giúp cung cấp dinh dưỡng thích hợp nhất để duy trì mật độ hỗn hợp của ba dòng vi khuẩn BL1-10, ST2-9, KG6-3 trong thời gian dài nhất là hỗn hợp cám gạo + đường vàng (tỉ lệ 15:1) và hỗn hợp cám gạo + mùn dừa + đường vàng (20:10:1).

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo Việt Nam năm 2014: "Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi khuẩn chịu mặn làm tăng năng suất lúa ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long". Các thí nghiệm được tiến hành có sự dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Sinh học đất, Bộ môn Khoa học đất, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Đại học Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ardakani SS, Heydari A, Tayebi L, Mohammadi M (2010) Promotion of cotton seedling growth characteristics by development and use of new bioformulation. *Int J Bot* 6: 95:100.
- Balkan B, Ertan (2007) Production of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* under solid-state fermentation by using some agricultural by-products. *Food Technol Biotechnol* 45: 439-442.
- Ben Rebah FB, Tyagi RD, Prevost D (2002) Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: the effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresour Technol* 83: 145-151.
- Canbolat MY, Bilen S, Cakmakc R, Sahin F, Aydın A (2006) Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol Fertil Soils* 42: 350-357.
- Chirife J, Herszage L, Joseph A, Kohn ES (1983) In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for the use of sugar in treating infected wounds. *Antimicro b Agents Chemother* 23: 766-773.
- Ferreira EM, Castro IV (2005) Residues of the cork industry as carriers for the production of legumes inoculants. *Silva Lusit* 13 (2): 159-167.
- Gangadharan D, Sivaramakrishnan S, Nampoothiri KM, Pandey A (2006) Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. *Food Technol Biotechnol* 44: 269-274.
- Jiang C, Sheng X, Qian M, Wang Q (2008) Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* 72 (2): 157-164.
- Joseph B, Patra RR, Lawrence R (2007) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int J Plant Prod* 2: 141-152.
- Nguyễn Khởi Nghĩa, Dương Minh Viễn, Đỗ Hoàng Sang, Nguyễn Thị Kiều Oanh, Nguyễn Thị Tô Quyên, Lâm Từ Lăng (2015) Hiệu quả phân hủy sinh học hoạt chất propoxur trong đất bồi đồng vi khuẩn phân lập *Paracoccus* sp.P23-7 cố định trong biochar. *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ*. Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học: 40 (2015) (2): 90 - 98.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyên, Phạm Văn Ty (2012) Vi sinh vật học. Hà Nội: Giáo dục Việt Nam, Tr 142 - 401.
- Palleroni NJ (1984) Gram-negative aerobic rods and cocci, p. 140-178. In N. R. Krieg (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Peterson HL, Loynachan T.E (1981). The significance and application of *Rhizobium* in agriculture. In: Giles, K.L., Atherly, G., (Eds.). *Biology of Rhizobiaceae*, Academic Press, NY, pp. 311-331.
- Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri KM, Soccol CR, Pandey A (2006) Amylases from microbial sources - An overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol* 44: 173-184.
- Somasegaran P, Hoben HJ (1985) Methods in legume-Rhizobium technology. Hawaii: Niftal Project. Mircen.
- Tilak KVB, Subba Rao NS (1978) Carriers for legume (*Rhizobium*) inoculants. *Fertilizer News* 23: pp 25-28.
- Van Veen BD, van Drongelen W, Yuchtman M, A Suzuki (1997) Localization of brain electrical activity via linearly constrained minimum variance spatial filtering. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 44 (9): 867-880.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.

SELECION OF CARRIER MATERIAL AND SUBSTRATE FOR BIOFERTILIZER BY-PRODUCT CONTAINING THREE HALOPHILIC PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA (*BURKHOLDERIA CEPACIA* BL1-10, *BACILLUS MEGATERIUM* ST2-9 AND *BACILLUS AQUIMARIS* KG6-3)

Nguyen Khoi Nghia, Nguyen Thi Kieu Oanh

Cantho University

SUMMARY

In biofertilizer production, carriers and substrates have an important role in maintaining an efficacy of the commercial biofertilizer by-product. The aim of this study was to select the best carrier material and substrate and as well substrate's moisture to sustainably store biofertilizer by-product containing three halophilic plant growth promoting bacterial strains. They are *Bacillus aquimaris* KG6-3 (KG6-1), *Burkholderia* sp. BL1-10 (BL1-10) and *Bacillus megaterium* ST2-9 (ST2-9) with a function of non-symbiotic nitrogen fixer, phosphorous solubilizing bacteria and IAA producing bacteria, respectively. All the experiments in this study were conducted under the laboratory conditions. Spent coffee ground and domestic coal ash were used as carrier materials. Besides that, rice bran, banana peel, banana flesh, cocopeat and brown sugar were used as substrate materials. The results showed that the domestic coal ash was able to sustain the highest viable cell number of ST2-9 and KG6-3 strains after 16 incubation hours whilst BL1-10 was found to be highest viable cell number in carrier material of spent coffee ground and the viable cell number of mixed inoculum including three bacterial strains was shown to be not significantly different among the three tested carrier materials. Moreover, the viable cell number of all three bacterial strains regardless of single or mixed inoculation was found to be highest during 15 weeks in rice bran substrate with 50% of moisture content. The mixed viable cell number of bacterial consortium achieved highest in the substrate containing rice bran + brown sugar (15:1, w/w) and when taking into account a comparison between two inoculation means, it was shown that the viable cell number in treatments with bacteria immobilized in domestic coal ash was always higher than that in treatments with free cell bacteria inoculation method. Thus, it was concluded that domestic coal ash and rice bran + brown sugar mixture (15:1) was the best carrier material type and substrate for biofertilizer by-product containing the three halophilic plant growth promoting bacteria and the immobilization technique to inoculate bacteria via carrier material was the best option for microbial inoculation.

Keywords: *Bacillus aquimaris*, *Burkholderia* sp, domestic coal ash, rice bran, viable cell number