

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI KHUẨN *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 CÓ HOẠT TÍNH PHÂN GIẢI LÂN

Hoa Trương Minh Hiếu^{1*}, Phạm Thị Duy Anh¹, Trần Chí Hiếu², Phan Mỹ Hạnh²

¹Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

²Phòng Công nghệ Vi sinh, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Phosphorus (P) là chất dinh dưỡng đa lượng cần thiết cho sự sinh trưởng của cây trồng nhưng phần lớn P trong đất ở dạng khó tan và cây trồng không thể sử dụng. Vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* là loài có khả năng phân giải lân khó tan thành dạng tan, nhưng chưa được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp. Từ vấn đề này, nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. Để tìm được môi trường và điều kiện tối ưu, phải tiến hành các khảo sát đơn yếu tố chọn ra khoảng ảnh hưởng. Sau đó tiến hành sàng lọc đa yếu tố bằng thiết kế Plackett-Burman. Kết quả cho thấy có 4 yếu tố ảnh hưởng nhất: pH, tốc độ lắc, nồng độ yeast extract, tỷ lệ nạc giống ($p < 0,05$), tiến hành tối ưu hóa bằng thiết kế Box-Behnken. Kết quả môi trường tối ưu cho vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 với thành phần dinh dưỡng (w/v): mannitol 2%; yeast extract 1%; $MgSO_4$ 0,01%; KH_2PO_4 0,025%; $FeCl_3$ 0,0001%; $CaCO_3$ 0,1% và điều kiện tối ưu nuôi cấy: pH 5; nhiệt độ 30°C; tốc độ lắc 180 vòng/phút; tỷ lệ nạc giống 5% (v/v); sau 30 giờ nuôi cấy đạt mật độ 9,690 log (CFU/mL), cao hơn 7,24 lần so với môi trường GECEB ban đầu 8,830 log (CFU/mL).

Từ khóa: Box-Behnken, *Nguyenibacter vanlangensis*, phân giải lân, Plackett-Burman, tối ưu hóa.

MỞ ĐẦU

Phosphorus (P) là chất dinh dưỡng đa lượng cần thiết cho sự sinh trưởng của cây trồng, nguyên tố chính trong sản xuất nông nghiệp toàn cầu. Phosphorus rất quan trọng đối với quá trình trao đổi chất của thực vật và thực hiện nhiều chức năng bao gồm phát triển rễ, làm tăng đáng kể năng suất cây trồng và có khả năng kháng các bệnh khác nhau của cây (Xu *et al.*, 2020). Theo thống kê của Yuan Wang và đồng tác giả (2011), ước tính đến hai tỷ hecta đất nông nghiệp trên toàn thế giới bị ảnh hưởng bởi lượng P thấp và thiếu P trực tiếp gây ra sự giảm đáng kể (5-15%) năng suất cây trồng. Theo số liệu của Bộ Công Thương năm 2020, mỗi năm Việt Nam tiêu thụ khoảng 11 triệu tấn phân hóa học để phục vụ cho ngành nông nghiệp. Việc sử dụng phân bón hóa học không đúng cách gây ra ô nhiễm nguồn nước, đất, thực phẩm, ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Bón phân lân hóa học làm đất tích lũy kim loại nặng cadmium (Cd). Dư thừa phosphorus trong các sản phẩm trồng trọt hoặc nguồn nước làm giảm khả năng hấp thu calcium, gây ra nhiều bệnh loãng xương. Trong đất, hầu hết đều có hàm lượng phosphorus tổng số cao nhưng ở dạng này cây trồng không thể hấp thụ được. Khai thác vi khuẩn phân giải phosphorus là một giải pháp sinh học mới được phát triển để tăng cường khả năng cung cấp P của vùng rễ; tuy nhiên, ảnh hưởng của những vi khuẩn này đến chất lượng đất và các giai đoạn phát triển khác nhau của thực vật vẫn chưa được biết rõ (Shen *et al.*, 2011). Từ thực tiễn trên, đề tài "Tối ưu hóa điều kiện và môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 có hoạt tính phân giải lân" cần được nghiên cứu sâu hướng đến sản phẩm sinh học hiệu quả cao nhằm giảm lượng phân hóa học, hóa chất xử lý ô nhiễm môi trường,... giúp tiết kiệm chi phí cho sản xuất nông nghiệp, bảo vệ sức khỏe con người và tài nguyên môi trường.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 từ bộ sưu tập giống vi sinh vật của Phòng Công nghệ Vi sinh-Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

Vi khuẩn được giữ giống trên môi trường thạch GECA và lên men trong môi trường GECEB lỏng. Thành phần môi trường GECA gồm 20 g/L glucose, 3 g/L yeast extract, 3 g/L peptone và 24 g/L agarose; GECEB gồm 20 g/L glucose, 3 g/L yeast extract và 3 g/L peptone.

Phương pháp

Phương pháp phân tích

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tính toán bằng Microsoft Office Excel. Xử lý số liệu bằng phân tích ANOVA 1 nhân tố và phân hạng bằng phần mềm The SAS System for V8. Thiết kế thí nghiệm sàng lọc đa yếu tố bằng mô hình Plackett-Burman, thí nghiệm tối ưu hóa bằng mô hình Box-Behnken và xử lý số liệu phân tích ANOVA bằng phần mềm JMP 10.

Phương pháp xác định mật độ vi sinh vật

Sử dụng phương pháp pha loãng liên tục và phương pháp trải đĩa trên môi trường thạch GECA (Parker *et al.*, 2016). Kết quả thu được là mật độ vi khuẩn (CFU/mL) với Colony-forming unit là đơn vị hình thành khuẩn lạc.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 được khảo sát trên môi trường GECA. Có 9 yếu tố được lựa chọn để khảo sát là thời gian thu mẫu (16-44 giờ), nhiệt độ (20-40°C), tốc độ lắc (100-260 vòng/phút), tỷ lệ nạp giống (0,5-10%), pH (4-10) được thực hiện trên môi trường GECA. Các yếu tố còn lại là nguồn carbon được thực hiện bằng cách thay đổi lần lượt nguồn đường glucose thành các nguồn khác (glycerol, mannitol, sucrose, fructose và mật rỉ) và nguồn đạm yeast extract (YE), peptone được thay thế bởi nguồn khác (casein, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄, peptone và yeast extract). Kết quả của 2 yếu tố này là tiền đề để thực hiện khảo sát nồng độ (0,5-4%) nguồn carbon và nitrogen cho các thí nghiệm tiếp theo. Các thí nghiệm trên được thực hiện tuần tự, thay đổi từng yếu tố, các yếu tố không được khảo sát sẽ được cố định ở mức thời gian nuôi cấy 24 giờ, nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút và pH 5,5.

Sàng lọc đa yếu tố ảnh hưởng bằng thiết kế Plackett-Burman

Để xác định được các yếu tố ảnh hưởng và mức độ ảnh hưởng của từng yếu tố đến sinh trưởng của vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026, ma trận sàng lọc Plackett-Burman (Plackett and Burman, 1946) được thiết kế bằng phần mềm JMP 10, dựa trên kết quả khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 phía trên.

Trong ma trận Plackett-Burman, 12 yếu tố được nghiên cứu với 3 mức độ là thấp nhất (-1), trung tâm (0) và cao nhất (1) ứng với phạm vi khảo sát đơn yếu tố phía trên trình bày ở (Bảng 3). Mô hình được xây dựng để sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng nhất đến sinh khối vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026. Các yếu tố được sàng lọc có độ tin cậy (p<0,05) sẽ được chọn để đưa vào mô hình tối ưu hóa bằng thiết kế Box-Behnken. Những yếu tố có độ tin cậy (p>0,05) sẽ chọn ở mức thấp (-1) hoặc mức trung tâm (0) tùy vào dự đoán của Plackett-Burman để đưa vào Box-Behnken với giá trị không thay đổi.

Tối ưu hóa bằng thiết kế Box-Behnken

Sau khi sàng lọc bằng ma trận Plackett-Burman, các yếu tố có độ tin cậy p<0,05 được chọn để đưa vào thí nghiệm tối ưu hóa để tìm điểm cực trị cho từng yếu tố, nghiên cứu ở 3 mức độ là thấp nhất (-1), trung tâm (0) và cao nhất (1) trong Box-Behnken (Castillo, 2007) trên phần mềm JMP 10. Từ kết quả thực nghiệm, tiến hành phân tích trên phần mềm JMP 10 để xác định điểm tối ưu của các yếu tố cho sinh khối *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 đạt cực đại.

Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Theo mô hình do phần mềm JMP 10 dự đoán giá trị tối ưu của từng yếu tố làm hàm đáp ứng đạt cực đại đã được xác định. Để kiểm chứng mô hình, thí nghiệm với thành phần môi trường và điều kiện tối ưu được thực hiện 11 lần lặp lại.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026

Bảng 1. Kết quả khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026

Yếu tố	Mức tốt	Mật độ log (CFU/mL)	Yếu tố	Mức tốt	Mật độ log (CFU/mL)
Thời gian thu mẫu (giờ)	30	8,946	Nguồn carbon	Mannitol	9,090
Nhiệt độ (°C)	30	8,971	Nồng độ nguồn carbon (%)	3,5	9,038
Tốc độ lắc (vòng/phút)	180	9,099	Nguồn nitrogen	Yeast extract	8,962
pH	8	9,129	Nồng độ nguồn nitrogen (%)	2	8,924
Tỷ lệ nạp giống (%)	4	9,040			

Kết quả sinh khối vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 thu được sau từng thí nghiệm khảo sát cho thấy tất cả các yếu tố khảo sát đều có ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi sinh vật, phụ thuộc rất lớn vào các yếu tố dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy. Do đó, các yếu tố này được đưa vào nghiên cứu sàng lọc bằng mô hình Plackett-Burman. Ngoài các yếu tố trên, các nguồn khoáng như KH₂PO₄ được thêm vào để duy trì độ ổn định pH, FeCl₃ để làm cofactor cho enzyme tế bào, MgSO₄ để cung cấp nguồn lưu huỳnh cho tế bào, NaCl để duy trì ổn định áp suất thẩm thấu màng tế bào với các mức theo môi trường nghiên cứu trước đó (Difco & BBL Manual, 2009).

Kết quả sàng lọc đa yếu tố ảnh hưởng bằng thiết kế Plackett-Burman

Bảng 2. Kết quả sàng lọc thực nghiệm Plackett-Burman

Pattern	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	Y
	Nhiệt độ	Tốc độ lắc	Thời gian nuôi	Tỷ lệ nạp giống	Mannitol (%)	YE (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	MgSO ₄ (%)	NaCl (%)	FeCl ₃ (%)	CaCO ₃ (%)	pH	log (CFU/mL)
NT 1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	0,000
NT 2	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	8,869
NT 3	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	8,079
NT 4	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	8,708
NT 5	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	9,021
NT 6	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	8,919
NT 7	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	0,000
NT 8	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	8,820
NT 9	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	0,000
NT 10	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	9,602
NT 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,394
NT 12	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	8,845
NT 13	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	8,332
NT 14	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	9,312
NT 15	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,000
NT 16	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	9,253
NT 17	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	8,556
NT 18	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	3,439
NT 19	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	0,000
NT 20	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	8,438
NT 21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,000

Bảng 3. Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố trong mô hình Plackett-Burman

Ký hiệu	Mức		Giá trị	
	Thấp (-1)	Cao (+1)	t Ratio	Prob> t
X1	25	35	-0,82	0,4355
X2	180	260	-3,18	0,0130*
X3	16	44	-1,68	0,1306
X4	0,5	10	4,34	0,0025*
X5	2	5	-1,26	0,2433
X6	0,5	3,5	-3,36	0,0099*
X7	0	0,05	0,76	0,4697
X8	0	0,02	0,31	0,7616
X9	0	0,02	-1,80	0,1101
X10	0	0,0002	0,69	0,5126
X11	0	0,2	1,70	0,1282
X12	6	10	-8,36	<,0001*

*mức ý nghĩa $\alpha=0,05$
 $p=0,0014$
 $R^2=0,939$

CÔNG NGHỆ SINH HỌC NÔNG NGHIỆP

Kết quả phân tích ANOVA (Bảng 3) cho thấy mô hình sàng lọc có ý nghĩa thống kê ($p=0,0014<0,05$), hệ số hồi quy R^2 đạt 0,939, cho thấy số liệu thực nghiệm tương thích với mô hình 93,9%. Từ đó, 12 yếu tố được nghiên cứu đều có tác động nhất định đến sinh trưởng của vi khuẩn. Các yếu tố có ảnh hưởng có ý nghĩa về mặt thống kê ($p<0,05$), sắp xếp theo thứ tự ảnh hưởng giảm dần như sau: pH, tỷ lệ nạc giống, nồng độ yeast extract và tốc độ lắc. Các yếu tố này được đưa vào mô hình tối ưu hóa Box-Behnken và lần lượt ký hiệu là X1, X2, X3, X4.

Các yếu tố có ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) được chọn cố định đưa vào mô hình Box-Behnken như sau: mannitol 2%; $MgSO_4$ 0,01%; KH_2PO_4 0,025%; $FeCl_3$ 0,0001%; $CaCO_3$ 0,1% (w/v); nhiệt độ 30°C; thời gian thu mẫu 30 giờ.

Kết quả tối ưu hóa bằng thiết kế Box-Behnken

Mô hình Box-Behnken giúp xác định điểm tối ưu cho giá trị sinh khối vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 đạt cực đại.

Bảng 4. Kết quả mô hình tối ưu Box-Behnken

Pattern	X1	X2	X3	X4	Y thực nghiệm	Y mô hình
	pH	Tỷ lệ nạc giống (%)	Nồng độ YE (%)	Tốc độ lắc (vòng/phút)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)
NT 1	7	5	0,6	150	9,201	9,146
NT 2	7	5	0,2	180	9,408	9,323
NT 3	5	5	0,6	180	9,568	9,540
NT 4	9	5	0,6	180	8,000	8,159
NT 5	7	5	1	180	9,140	8,929
NT 6	7	5	0,6	210	8,477	8,698
NT 7	7	10	0,2	150	9,236	9,313
NT 8	5	10	0,6	150	9,272	9,199
NT 9	9	10	0,6	150	8,700	8,654
NT 10	7	10	1	150	9,111	9,093
NT 11	5	10	0,2	180	9,200	9,262
NT 12	9	10	0,2	180	9,398	9,127
NT 13	7	10	0,6	180	9,272	9,281
NT 14	7	10	0,6	180	9,230	9,281
NT 15	7	10	0,6	180	9,342	9,281
NT 16	5	10	1	180	9,243	9,629
NT 17	9	10	1	180	8,477	8,426
NT 18	7	10	0,2	210	9,260	9,222
NT 19	5	10	0,6	210	9,519	9,284
NT 20	9	10	0,6	210	8,500	8,492
NT 21	7	10	1	210	9,241	9,108
NT 22	7	15	0,6	150	9,143	9,036
NT 23	7	15	0,2	180	9,243	9,396
NT 24	5	15	0,6	180	9,342	9,127
NT 25	9	15	0,6	180	9,199	9,171
NT 26	7	15	1	180	9,428	9,455
NT 27	7	15	0,6	210	9,238	9,408

Bảng 5. Kết quả mức độ ảnh hưởng của mô hình Box-Behnken

Ký hiệu	Giá trị		Ký hiệu	Giá trị	
	t Ratio	Prob> t		t Ratio	Prob> t
X1	-5,11	0,0003*	X2X3	1,00	0,3375
X2	2,29	0,0409*	X2X4	1,81	0,0960
X3	-1,28	0,2261	X3X4	0,23	0,8191
X4	-0,29	0,7765	X1X1	-2,28	0,0419*
X1X2	3,14	0,0085*	X2X2	-0,60	0,5606
X1X3	-2,35	0,0365*	X3X3	0,54	0,5983
X1X4	-0,54	0,5959	X4X4	-1,53	0,1509
*mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$					
p mô hình	0,0071				
R ² mô hình	0,840				
p Lack of Fit	0,0508				

Bảng 6. Kết quả phân tích hồi quy tuyến tính sau khi loại bỏ các hệ số hồi quy không ý nghĩa thống kê

Yếu tố	Estimate	t Ratio	Prob > t
Intercept	9,198		
X1 pH (5-9)	-0,334	-5,050	<,0001*
X2 Tỷ lệ nạc giống (5-15)	0,150	2,270	0,0347*
X3 YE (0,2-1)	-0,084	-1,260	0,2215
X1*X2	0,356	3,110	0,0055*
X1*X3	-0,267	-2,330	0,0305*
X1*X1	-0,192	-2,170	0,0426*

Kết quả phân tích ANOVA xác định các biến độc lập của phương trình hồi quy trong mô hình thực nghiệm ở Bảng 5 có độ tin cậy $p < 0,05$. Dựa vào kết quả Bảng 6, xây dựng phương trình hồi quy có dạng $Y = 9,198 - 0,334X_1 + 0,150X_2 - 0,084X_3 + 0,356X_1X_2 - 0,267X_1X_3 - 0,192X_1^2$.

Trong đó, Y là mật độ vi khuẩn log (CFU/mL), X1, X2, X3 lần lượt là các yếu tố pH, tỷ lệ nạc giống (%) và nồng độ yeast extract (%).

Hệ số hồi quy $R^2 = 0,840$ cho thấy có 84,0% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán theo mô hình. Theo Castillo (2007), giá trị $R^2 > 0,75$ thể hiện mô hình được xây dựng tương thích với thực nghiệm, khẳng định tính chính xác của mô hình và sự tồn tại của điểm tối ưu. Kết quả kiểm tra sự thiếu phù hợp (Lack of Fit) có $p = 0,0508 > 0,05$ cho thấy sự thiếu phù hợp không có ý nghĩa thống kê.

Phương trình hồi quy cho thấy yếu tố pH, tỷ lệ nạc giống và hàm lượng yeast extract có tác động lớn đến sự hình thành sinh khối của vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026. Tuy nhiên, khi mật độ giống vào quá lớn dẫn đến thiếu hụt chất dinh dưỡng sau một khoảng thời gian, nên vi sinh vật chỉ tăng mật độ trong một khoảng thời gian nhất định rồi dừng lại. Ngoài ra, vi sinh vật cần dinh dưỡng ở một mức độ vừa đủ trong quá trình phát triển, nên khi tăng hàm lượng dinh dưỡng vượt mức tối ưu thì hoạt tính enzyme sẽ giảm do cơ chất tạo áp lực lớn lên quá trình sinh tổng hợp sinh học của vi khuẩn, đồng thời cơ chất tăng khi năng lực sinh tổng hợp sinh học chỉ ở mức giới hạn và đạt ngưỡng cực đại cũng làm hoạt tính enzyme giảm nên sinh khối cũng sẽ giảm. Ngược lại, khi hàm lượng dinh dưỡng thấp thì tế bào không đủ cơ chất để hình thành sinh khối.

Khi đưa 4 yếu tố ảnh hưởng chính từ thí nghiệm sàng lọc Plackett-Burman vào mô hình tối ưu hóa Box-Behnken, chỉ nhận được giá trị tối ưu của 3 yếu tố, yếu tố tốc độ lắc ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Điều này có thể giải thích là yếu tố tốc độ lắc ở kết quả sàng lọc bằng thí nghiệm Plackett-Burman được nghiên cứu ở khoảng giá trị khác với thiết kế Box-Behnken.

Từ mô hình tối ưu cho thấy, giá trị các yếu tố ảnh hưởng chính được xác định: pH 5, tỷ lệ nạc giống 5%, nồng độ yeast extract 1% và mật độ vi khuẩn đạt cực đại là 9,730 log (CFU/mL).

Kết quả kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Tiến hành kiểm chứng mô hình bằng thực nghiệm tại các giá trị tối ưu. Kết quả Bảng 7 cho thấy mật độ sau 30 giờ nuôi cấy là 9,690 log (CFU/mL), tương thích với mật độ mà mô hình đã dự đoán là 9,730 log (CFU/mL).

Bảng 7. Kết quả kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Dự đoán mô hình	9,730 log (CFU/mL)
Thực nghiệm	9,690 log (CFU/mL)
Môi trường ban đầu	8,830 log (CFU/mL)

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Với mục tiêu tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026, chúng tôi đã khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn, sau đó sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối bằng ma trận Plackett-Burman và xây dựng mô hình tối ưu hóa theo ma trận thực nghiệm Box-Behnken. Với phương pháp này chúng tôi thu nhận được sinh khối cực đại 9,690 log (CFU/mL) tại các giá trị ưu với thành phần dinh dưỡng mannitol 2%; yeast extract 1%; MgSO₄ 0,01%; KH₂PO₄ 0,025%; FeCl₃ 0,0001%; CaCO₃ 0,1% (w/v) và kiện tối ưu nuôi cấy: pH 5, nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút, tỷ lệ nạp giống 5% (v/v), sau 30 giờ. Kết quả tối ưu cao hơn môi trường ban đầu 7,24 lần (mật độ tối ưu 9,690 log (CFU/mL), mật độ trên môi trường GEGB ban đầu 8,830 log (CFU/mL)).

Tiếp tục nghiên cứu đánh giá nhiều chỉ tiêu khác của vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026. Từ đó hướng đến nghiên cứu sản xuất chế phẩm phân bón vi sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Castillo ED (2007). Process Optimization, International Series in Operations Research & Management Science. Springer US, Boston, MA.
- Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media (2009). Becton Dickinson and Company.
- Parker N, Schneegurt M, Tu A.H.T, Lister P, Forster B.M (2016). Media Used for Bacterial Growth - Microbiology | OpenStax [WWW Document].
- Plackett RL, Burman JP (1946). The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, 33: 305–325.
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F (2011). Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology*, 156: 997–1005.
- Xu X, Mao X, Van Zwieten L, Niazi NK, Lu K, Bolan NS, Wang H (2020). Wetting-drying cycles during a rice-wheat crop rotation rapidly (im)mobilize recalcitrant soil phosphorus. *J Soils Sediments*, 20: 3921–3930.

OPTIMIZATION OF CONDITONS AND CULTURE MEDIUM FOR *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 BACTERIA WITH PHOSPHORUS-SOLUBILIZING CAPABILITY

Hoa Truong Minh Hieu^{1*}, Pham Thi Duy Anh¹, Tran Chi Hieu², Phan My Hanh²

¹Department of Biology-Biotechnology, University of Science University of Ho Chi Minh City

²Department of Microbial Biotechnology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Phosphorus (P) is an important macronutrient for the growth of plants, but most of the P in the soil is in insoluble form and cannot be used by plants. *Nguyenibacter vanlangensis* is a type of bacteria possibly phosphorus-insolubility into phosphorus-solubility, but it still not been widely used in agricultural production. Therefore, the research was to find the optimal values of factors that directly impact the growth process of bacteria. To find the optimal culture medium and conditions, single-factor surveys must be done to select the influence range. Then, multifactor screening was performed using the Plackett-Burman design. The results displayed that there were 4 most influential factors: pH, rotation speed, yeast extract, inoculum size ($p < 0.05$), optimized using Box-Behnken design. Optimal culture medium of *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 strain results in: nutritional ingredients mannitol 2%, yeast extract 1%, MgSO₄ 0.01%, KH₂PO₄ 0.025%, FeCl₃ 0.0001%, CaCO₃ 0.1% (w/v) and optimal condition is pH 5, temperature 30°C, rotation speed of 180 (rpm), inoculum size 5% (v/v) after 30 hours of culture reaching a density of 9.690 log (CFU/mL), higher by about 7.24 fold than the initial GEGB culture medium.

Keywords: Box-Behnken, *Nguyenibacter vanlangensis*, phosphorus-solubilizing bacteria, Plackett-Burman, optimization.

* Author for correspondence: Tel: +84-767618747; Email: 09hoatruongminhhieu91@gmail.com