

TỐI ƯU HÓA THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG LÊN MEN THU SINH KHỐI VI KHUẨN *Pseudomonas stutzeri* BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT (RSM)

Trương Phước Thiên Hoàng^{1*}, Lê Phước Thọ², Vũ Phú Quang³,
Nguyễn Phú Hòa⁴, Nguyễn Văn Thống⁵, Phạm Công Hoạt⁶

¹*Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM*

²*Công ty TNHH BiO Nông Lâm*

³*Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM*

⁴*Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM*

⁵*Công Ty TNHH Thương mại dịch vụ Thiên Phúc Thịnh*

⁶*Vụ Khoa học và Công nghệ các ngành kinh tế - kỹ thuật, Bộ Khoa học Công nghệ*

*Tác giả liên hệ: hoangtp@hcmuaf.edu.vn

Ngày nhận bài: 03.06.2021

Ngày chấp nhận đăng: 03.05.2021

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến quá trình sinh trưởng của vi khuẩn, làm tiền đề tạo chế phẩm ứng dụng vào thực tế sản xuất. Vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 sinh trưởng và phát triển tốt khi tỉ lệ nạc giống 2,5%, sau thời gian nuôi cấy 36 giờ ở nhiệt độ 30°C. Sau đó, các nguồn nitơ và cacbon thích hợp được chọn làm cơ sở cho việc sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 bằng thiết kế thí nghiệm Plackett - Burman. Thành phần môi trường lên men được tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM), với ma trận Box - Behnken được sử dụng, trong đó ba yếu tố như mật rỉ đường, cao nấm men và MgSO₄ là ba yếu tố tác động nhiều nhất (P < 0,05). Do đó, thành phần môi trường thích hợp cho quá trình thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 gồm: mật rỉ đường 4,76 g/l, cao nấm men 18,99 g/l và MgSO₄ 0,99 g/l, mô hình dự đoán mật độ vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 tối đa đạt $2,45 \times 10^{11}$ CFU/ml (11,591 Log₁₀.CFU/ml) và thực tế thí nghiệm thu được mật số vi khuẩn là $2,37 \times 10^{11}$ CFU/ml.

Từ khóa: Tối ưu hóa, *Pseudomonas stutzeri*, RSM, Plackett - Burman, Box - Behnken.

Optimization of the Medium Composition for Biomass Production of *Pseudomonas stutzeri* by Response Surface Methodology (RSM)

ABSTRACT

The objective of this study was to find the optimal value of the factors that directly affect the bacterial population multiplication process as a premise to create products that apply in reality with emphasis on *Pseudomonas stutzeri* KL15 strain. *Pseudomonas stutzeri* KL15 grew and developed well when the bacterial culture rate was 2.5%, after a culture time of 36 hours at 30°C. After that, appropriate nitrogen and carbon sources were selected as the basis for screening factors affecting the biomass collection of *Pseudomonas stutzeri* KL15 by experimental design Plackett - Burman. The fermentation medium composition was optimized by the Response surface methodology (RSM) with Box - Behnken matrix, in which three factors, molasses, yeast extract and MgSO₄ were the the most influential factors (P < 0.05). Results showed that the suitable media composition to receive *Pseudomonas stutzeri* KL15 biomass included molasses 4.76 g/l, yeast extract 18.99 g/l and MgSO₄ 0.99 g/l. The actual concentration of *Pseudomonas stutzeri* KL15 obtained was 2.37×10^{11} CFU/ml in comparison with the predicted maximum concentration of *Pseudomonas stutzeri* KL15 of 2.45×10^{11} CFU/ml (11,591 Log₁₀.CFU/ml).

Keywords: Optimization, *Pseudomonas stutzeri*, RSM, Plackett - Burman, Box - Behnken.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, sự tích tụ các hợp chất chứa nitơ từ thức ăn tươi trong việc nuôi tôm hùm bằng lồng bè tại các vùng nuôi là một hiện tượng rất phổ biến, mức độ tích lũy này phụ thuộc vào sự gia tăng của sinh khối vật nuôi và lượng thức ăn. Tôm hùm cần nhu cầu protein rất cao nhưng phần lớn thức ăn không được sử dụng hết mà bài tiết ra môi trường dưới dạng các hợp chất nitơ gây ảnh hưởng xấu đến sự tăng trưởng và sức khỏe hoặc gây chết cho tôm hùm. Do đó nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia, nitrite và nitrate đang rất được quan tâm trong việc ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học giảm ô nhiễm môi trường nuôi thủy sản. Theo nghiên cứu của Zang & cs. (2011) cho thấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* YZN - 001 không những có khả năng chuyển hóa ammonia mà còn chuyển hóa cả nitrite với 275,08 mg/l NO_2^- sau 24 giờ, chuyển hóa hoàn toàn 171,4 mg/l NO_3^- sau 18 giờ. Ở Việt Nam, cho thấy ứng dụng thành công loài vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* loại bỏ N trong nước ao cá tra nhiễm ammonia cao (Cao Ngọc Diệp & cs., 2009) và ngoài ra vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* còn loại bỏ N trong nước rác thải hữu cơ (Cao Ngọc Diệp & Nguyễn Thị Hoàng Nam, 2012). Do đó chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* có nhiều tiềm năng ứng dụng trong ao nuôi thủy sản nên là đối tượng được lựa chọn cho các nghiên cứu về chế phẩm sinh học hiện nay. Ngoài việc phân lập những chủng vi khuẩn có lợi, thì thành phần môi trường và các điều kiện lên men cũng quyết định đến hiệu suất thu hồi sinh khối dẫn đến việc sản xuất chế phẩm sinh học có hiệu quả hơn. Môi trường nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn *Pseudomonas putida* Rs -198 đạt được mật số vi khuẩn 10^{13} CFU/ml, sinh IAA và hòa tan phosphate là bột bắp, khô đậu nành, K_2HPO_4 , MnSO_4 , NaCl (Yanjie & cs., 2014) và chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* CN3 được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, pH 8, thời gian nuôi cấy 48 giờ với glucose 0,5% và cao nấm men 0,3% là nguồn cacbon và nitơ tốt nhất cho sản sinh uricase (Phạm Thanh Hà & cs., 2012). Phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) là một công cụ toán học hữu ích được ứng dụng trong việc tối ưu hóa quá trình

lên men (Myers & cs., 1989). Phương pháp này thường được sử dụng để tối ưu hóa thành phần môi trường để thu nhận enzyme (Park & cs., 2002), thu nhận các sản phẩm thứ cấp khác (Huajananen & cs., 2001), thu nhận bào tử (Yu & cs., 1997). Do đó, tối ưu hóa thành phần môi trường lên men vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* được nghiên cứu nhằm sản xuất sản phẩm sinh học đạt chất lượng cao và giảm giá thành đáp ứng được nhu cầu của thị trường.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị giống vi sinh vật

Ba chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL11, *P. stutzeri* KL14, *P. stutzeri* KL15 có khả năng chuyển hóa NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- được phân lập từ các mẫu bùn thu thập ở vùng nuôi tôm hùm lồng bè Vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên, định danh sinh hóa bằng kit API 20NE (The Global Health Network, 2013) và phương pháp giải trình tự vùng 16S - rRNA với cặp mồi 27F (5'AGATTTGATCCTGGCTCAG 3') và 515 R (5'-TACCGCGGC TGC TGG CAC-3') (Tim & cs., 2004) đang lưu trữ tại Phòng Công nghệ vi sinh thuộc Viện nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Khảo sát khả năng chuyển hóa NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-

Các chủng vi khuẩn *P. stutzeri* đã hoạt hóa và tăng sinh trong TSB với mật số vi khuẩn 10^7 CFU/ml được bổ sung vào môi trường định lượng Ammonia có chứa NH_4^+ 0,01 g/l, môi trường định lượng nitrite có chứa NO_2^- 0,53 mg/l, môi trường Nitrate Broth với hàm lượng NO_3^- 13,34 mg/l, ở 30°C, 120 vòng/phút. Mẫu được thu tại các thời điểm 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 7 ngày và từ 12 giờ đến 72 giờ (đối với khảo sát chuyển hóa NO_3^-).

Hàm lượng NH_4^+ trong các mẫu được xác định bằng phương pháp Phenat (APHA, 2012). Phương pháp này dựa trên nguyên tắc đo màu ở bước sóng 640nm của hợp chất màu xanh, indolphenol được tạo thành giữa ammoni hypoclorit và phenol, được xúc tác bởi natri nitroprusit.

Hàm lượng NO_2^- trong các mẫu được xác định bằng phương pháp Naphthylamine. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc trong môi trường acid có pH trong khoảng 2-2,5, axit nitrite (HNO_2) có trong nước sẽ kết hợp với axit sulfanilic ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$) cho sunfanilic dinitơ. Chất này kết hợp với naphthylamine cho hợp chất ammino azoic có màu hồng đỏ (APHA, 2012).

Hàm lượng NO_3^- được xác định bằng phương pháp Salycilate, phương pháp này dựa trên nguyên tắc là hợp chất nitrate trong mẫu ứng với natrisalycilate trong môi trường acid tạo ra một phức màu có màu vàng của muối axit nitrosalycilate (APHA, 2012).

2.3. Ảnh hưởng của các điều kiện đến sinh khối của vi khuẩn

Vi khuẩn sau khi tăng sinh và điều chỉnh mật độ đạt 10^8 CFU/ml sẽ được cấy vào erlen 250ml chứa 50ml môi trường TSB được lắc 150 vòng/phút ở 30°C trong thời gian 48 giờ, tiến hành khảo sát tỉ lệ nập giống, thời gian nuôi cấy và nhiệt độ và nguồn cacbon và nitơ.

Mật độ vi khuẩn được xác định dựa trên phương pháp đo độ đục của huyền phù vi khuẩn ở $\text{OD}_{610\text{nm}}$ và phương pháp đếm khuẩn lạc gián tiếp nhằm xây dựng đường tương quan tuyến

tính giữa độ đục và mật độ tế bào. Từ độ đục của một huyền phù vi khuẩn, dựa vào đường tương quan tuyến tính suy ra mật độ vi khuẩn cần xác định (Trần Linh Thuốc, 2007).

Chỉ tiêu theo dõi mỗi thí nghiệm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng là mật số vi khuẩn *P. stutzeri* (CFU/ml) bằng phương pháp đếm khuẩn lạc gián tiếp trên thạch đĩa và dùng hàm Log cơ số 10 trong phần mềm Microsoft Excel theo công thức $\lg a = b$ với a là mật số vi sinh vật (CFU/ml), b là hệ số quy đổi sang 10.lg nhằm xử lý thống kê theo phương pháp phân tích ANOVA 1 yếu tố qua phần mềm Minitab (Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods, 2016).

Ảnh hưởng của tỉ lệ nập giống: lần lượt là 1,0%, 2,5%, 3,5%, và 5,0%.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy: 12, 24, 36, 48 giờ.

Ảnh hưởng của nhiệt độ: với dãy nhiệt độ thay đổi 30°C , 33°C , 35°C , 37°C .

Nguồn nitơ: Thành phần môi trường 1 g/l MgSO_4 , 0,2 g/l CaCl_2 và 2 g/l K_2HPO_4 , glucose là 10 g/l và nguồn nitơ được thay đổi trong 4 chất sau: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cao nấm men, NaNO_3 và peptone với nồng độ 10 g/l.

Bảng 1. Các biến trong ma trận Plackett - Burman

Yếu tố	Ký hiệu	Mức	
		Thấp (-1)	Cao (+1)
Mật rỉ đường (g/l)	X1	2	6
Cao nấm men (g/l)	X2	9	25
K_2HPO_4 (g/l)	X3	1,25	5,00
MgSO_4 (g/l)	X4	0,25	1,50
NaCl (g/l)	X5	1	5
CaCl_2 (g/l)	X6	0,05	0,40

Bảng 2. Các yếu tố sử dụng trong Box - Behnken

Yếu tố	Ký hiệu	Đơn vị	Khoảng biến thiên	Mức		
				Thấp (-1)	Cơ sở (0)	Cao (1)
Mật rỉ đường	A	g/l	2-6	2	4	6
Cao nấm men	B	g/l	9-25	9	17	25
MgSO_4	C	g/l	0,5-1,5	0,5	1,0	1,5

Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)

Nguồn cacbon: Thành phần môi trường 1 g/l $MgSO_4$, 0,2 g/l $CaCl_2$ và 2 g/l K_2HPO_4 , với nguồn nitơ tốt nhất ở thí nghiệm trên và thay đổi các nguồn cacbon với nồng độ 10 g/l của 3 chất là glucose, mật rỉ đường, maltodextrin (Norrma & Wober, 1975; Chi Chung Lin, 1991).

2.4. Tối ưu hóa các thành phần môi trường nhân sinh khối của *P. stutzeri* KL15 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

2.4.1. Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng thiết kế Plackett - Burman (Plackett & Burman, 1946; Nguyễn Cảnh, 2004)

Nguồn cacbon và nguồn nitơ đã được sàng lọc trong thí nghiệm trước được thêm vào môi trường nuôi cấy được tối ưu hóa. Thiết kế Plackett-Burman cho phép đánh giá các yếu tố, mỗi yếu tố đã được kiểm tra ở hai cấp độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1). Các yếu tố được chọn cho nghiên cứu này là mật rỉ đường, cao nấm men, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, NaCl và $CaCl_2$. Các muối vô cơ K_2HPO_4 , $MgSO_4$, NaCl và $CaCl_2$ được sử dụng trong thí nghiệm dựa trên cơ sở từ nghiên cứu của các tác giả Yanjie & cs. (2014), Trần Quốc Tuấn & cs. (2014), Đoàn Thị Tuyết Lê & cs. (2020) đã chứng minh là nguồn dinh dưỡng ảnh hưởng đến quá trình phát triển sinh khối vi sinh vật.

Các yếu tố được sàng lọc cho độ tin cậy cao ($P < 0,05$) sẽ được đưa vào mô hình tối ưu hóa sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt theo phương án cấu trúc RSM – BBD trình bày trong bảng 1.

2.4.2. Tối ưu hóa các thành phần môi trường bằng thiết kế Box - Behnken (Box & Behnken, 1960)

Sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt và thiết kế Box - Behnken để tạo mô hình kiểm tra các biến cần thiết cho quá trình nhân sinh khối vi khuẩn. Trong thí nghiệm có ba mức độ khảo sát là thấp (-1), cơ sở (0) và cao (+1). Ba yếu tố ảnh hưởng chính đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn được chọn lọc từ thí nghiệm trước sẽ được sử dụng trong ma trận Box - Behnken, được ký hiệu lần lượt là A, B, C trình bày trong bảng 2.

Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2$$

Trong đó: b_0 là hệ số hồi quy tại tâm, b_1 , b_2 , b_3 là hệ số tuyến tính, b_{12} , b_{13} , b_{23} là hệ số tương tác, b_{11} , b_{22} , b_{33} là hệ số bình phương; A, B và C là các biến độc lập.

Mỗi hệ số b đặc trưng cho ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình thu sinh khối của vi khuẩn *P. stutzeri* KL15.

2.4.3. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Sau khi xác định mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* ở các nghiệm thức, nhập mật độ vi khuẩn vào ma trận được tạo từ phần mềm Design Expert 11, đọc kết quả ở mục Analysis gồm ANOVA, Diagnostics, Model Graphs và mục Optimization để xác định phương trình hồi quy. Phần mềm sẽ dự đoán hàm mục tiêu là mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* (Y, CFU/ml) đạt giá trị cao nhất ở các thông số tối ưu. Sau đó thí nghiệm kiểm định giá trị mô hình dự đoán bằng thực nghiệm với 3 lần lặp lại.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá khả năng chuyển hóa NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- của các chủng vi khuẩn

Từ bảng 3 cho thấy sau 7 ngày hầu hết các chủng vi khuẩn đều có khả năng chuyển hóa NH_4^+ , đạt hiệu suất xử lý trên 77% và trong đó chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 có hiệu suất xử lý NH_4^+ cao nhất 83,87%.

Các chủng vi khuẩn *P. stutzeri* được nuôi cấy trong môi trường định lượng nitrite với hàm lượng NO_2^- được bổ sung ban đầu là 0,53 mg/l (mật độ ban đầu là 10^7 CFU/ml) được khảo sát trong 1, 2, 3, 4 ngày thể hiện trên bảng 4. Sau 4 ngày, hiệu suất xử lý của 2 chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL14 và *P. stutzeri* KL15 là cao nhất với hiệu suất xử lý trên 99%. Theo Ngô Thị Kim Toán (2012), 3 dòng vi khuẩn B21.10, B23.2 và B21.1 được phân lập từ nước thải của bể biogas ở Vĩnh Lộc, Thanh Hóa có hiệu suất chuyển hóa nitrite (80 mg/l) sau 5 ngày tương ứng là 75,23%; 69,07% và 7,26%. Chủng vi khuẩn BLW2.2 phân

lập tại ao tôm ở Bạc Liêu có hiệu suất chuyển hóa nitrite là 96,5% với nồng độ là 37,5 mg/lNaNO₂ trong 3 ngày và chuyển hóa nitrite 97,2% với trong 7 ngày (Nguyễn Thị Phi Oanh & Nguyễn Thị Trúc Mai, 2019). Từ đó cho thấy khả năng chuyển hóa nitrite các dòng vi khuẩn được phân lập từ các môi trường khác nhau sẽ không giống nhau và tùy thuộc vào loài vi khuẩn.

Bảng 5 cho thấy hiệu suất xử lý NO₃⁻ của các nhóm *Pseudomonas stutzeri* được nuôi cấy trong môi trường Nitrate Broth với hàm lượng NO₃⁻ được bổ sung ban đầu là 13,34 mg/l (mật độ ban đầu là 10⁷ CFU/ml) sau 12, 24, 36, 48, 60, 72 giờ khảo sát, hiệu suất xử lý NO₃⁻ của vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 là 98,07% cao hơn hẳn so với hiệu suất xử lý NO₃⁻ của 2 chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL11 và KL14.

Vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 là chủng vi khuẩn có hiệu suất chuyển hóa NH₄⁺ là 83,87% với thời gian 7 ngày, hiệu suất xử lý NO₂⁻ 99,06% trong thời gian 4 ngày và hiệu suất xử lý NO₃⁻ 98,07% với 3 ngày. Do đó chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 có khả năng chuyển NH₄⁺, NO₂⁻,

NO₃⁻ nhanh hơn so với hai chủng *P. stutzeri* KL11, *P. stutzeri* KL14, vì thế chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 được lựa chọn để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng nhân sinh khối và tối ưu hóa môi trường lên men để thu sinh khối vi khuẩn bằng phương pháp đáp ứng bề mặt, nhằm ứng dụng trong việc sản xuất chế phẩm vi sinh trong xử lý nước nuôi trồng thủy sản. Kết quả thí nghiệm khá tương đồng với kết quả của tác giả Trịnh Hoài Vũ (2014) phân lập được 3 chủng vi khuẩn *P. stutzeri* có khả năng xử lý NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ với thời gian là 96 giờ trong ao nuôi cá tra.

3.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến việc nhân sinh khối vi khuẩn

3.2.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ nạo giống đến sự tăng sinh khối của vi khuẩn

Dịch tăng sinh vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 sau 24 giờ, pha loãng 10 lần đạt 10⁸ CFU/ml sẽ được cấy vào 50ml môi trường TSB với tỉ lệ nạo giống lần lượt là 1%, 2,5%, 3,5% và 5%, lắc sinh khối vi khuẩn với tốc độ 150 vòng/phút, sau 48 giờ tiến hành xác định mật độ vi khuẩn.

Bảng 3. Hiệu suất xử lý NH₄⁺ của các chủng vi khuẩn *P. stutzeri*

Vi khuẩn <i>P. stutzeri</i>	Hiệu suất (%)						
	1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày	7 ngày
KL11	11,57	20,84	27,29	34,46	76,40	64,87	77,93
KL14	15,62	17,46	35,07	37,94	57,25	62,83	79,62
KL15	10,34	19,10	37,79	39,07	71,53	75,63	83,87

Bảng 4. Hiệu suất xử lý NO₂⁻ của các chủng vi khuẩn *P. stutzeri*

Vi khuẩn <i>P. stutzeri</i>	Hiệu suất (%)			
	1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày
KL11	6,66	19,76	45,11	62,61
KL14	34,85	68,87	99,37	99,86
KL15	5,46	24,02	94,18	99,06

Bảng 5. Kết quả hiệu suất xử lý NO₃⁻ của các chủng vi khuẩn *P. stutzeri*

Vi khuẩn <i>P. stutzeri</i>	Hiệu suất (%)					
	12 (giờ)	24 (giờ)	36 (giờ)	48 (giờ)	60 (giờ)	72 (giờ)
KL11	2,76	5,65	10,27	30,76	56,87	72,56
KL14	2,52	4,94	8,93	14,50	34,37	52,76
KL15	4,41	9,67	21,23	44,35	90,50	98,07

Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)

Kết quả bảng 6 cho thấy mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 đạt giá trị cao nhất là $1,19 \times 10^{10}$ CFU/ml ($10,07 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/ml}$) khi nuôi cấy với tỉ lệ nạo giống 2,5% và có sự khác biệt có ý nghĩa với các tỉ lệ nạo giống còn lại ($P < 0,05$). Do đó chọn tỉ lệ nạo giống 2,5% cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự tăng sinh khối của vi khuẩn

Từ kết quả của thí nghiệm tỉ lệ nạo giống với tỉ lệ tốt nhất, tiến hành cấy dịch tăng sinh vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 sau 24 giờ, mật độ vi khuẩn là 10^8 CFU/ml với tỉ lệ nạo giống 2,5% vào 50ml môi trường TSB, lắc 150 vòng/phút ở 30°C . Sau các thời gian 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ tiến hành xác định mật độ vi khuẩn.

Kết quả bảng 7 cho thấy mật độ vi khuẩn đạt giá trị cao nhất sau 36 giờ nuôi cấy với mật độ $1,64 \times 10^{10}$ CFU/ml ($10,19 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/ml}$) và có khác biệt có ý nghĩa so với các khoảng thời gian khác ($P < 0,05$). Mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 tăng dần trong khoảng thời gian nuôi cấy từ 12 giờ đến 24 giờ và đạt mật độ cao nhất sau

36 giờ nuôi cấy, nhưng sau 48 giờ mật độ vi khuẩn lại giảm. Do đó chọn thời gian nuôi cấy vi khuẩn là 36 giờ cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự tăng sinh khối của vi khuẩn

Từ kết quả của thí nghiệm tỉ lệ giống và thời gian nuôi cấy, tiến hành cấy dịch tăng sinh vi khuẩn sau 24 giờ, mật độ vi khuẩn là 10^8 CFU/ml vào 50ml môi trường TSB với tỉ lệ nạo giống 2,5%. Lắc 150 vòng/phút với thời gian nuôi cấy 36 giờ lần lượt trong 30°C , 33°C , 35°C và 37°C .

Kết quả bảng 8 cho thấy mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 đạt giá trị cao nhất là $1,75 \times 10^{10}$ CFU/ml ($10,23 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/ml}$) khi nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C . Khi nuôi cấy vi khuẩn ở nhiệt độ từ 30°C đến 37°C , mật độ vi khuẩn tăng dần. Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn khi nuôi cấy ở 37°C không có khác biệt có ý nghĩa so với các nhiệt độ khác ($P > 0,05$). Do đó, nhiệt độ nhân sinh khối vi khuẩn là 30°C (nhiệt độ phòng) được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm giảm chi phí cho quá trình lên men nhân sinh khối *P. stutzeri*.

Bảng 6. Kết quả sự ảnh hưởng của tỷ lệ nạo giống đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15

Thí nghiệm	Tỷ lệ nạo giống (%)			
	1,0	2,5	3,5	5,0
Mật độ vi khuẩn ($\text{Log}_{10} \text{ CFU/ml}$)	$9,84^b \pm 0,18$	$10,07^a \pm 0,11$	$9,78^b \pm 0,06$	$9,73^b \pm 0,07$

Ghi chú: Trong cùng một hàng giá trị trung bình mang chữ cái giống nhau thì không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở $P = 0,05$.

Bảng 7. Kết quả sự ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15

Thí nghiệm	Thời gian nuôi cấy (giờ)			
	12	24	36	48
Mật độ vi khuẩn ($\text{Log}_{10} \text{ CFU/ml}$)	$9,75^b \pm 0,11$	$10,13^a \pm 0,16$	$10,19^a \pm 0,18$	$10,07^a \pm 0,18$

Ghi chú: Trong cùng một hàng giá trị trung bình mang chữ cái giống nhau thì không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở $P = 0,05$.

Bảng 8. Kết quả sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15

Thí nghiệm	Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)			
	30	33	35	37
Mật độ vi khuẩn ($\text{Log}_{10} \text{ CFU/ml}$)	$9,87 \pm 0,28$	$9,88 \pm 0,11$	$9,96 \pm 0,05$	$10,23 \pm 0,13$

Bảng 9. Kết quả sự ảnh hưởng của các nguồn nitơ đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15

Thí nghiệm	Nguồn nitơ			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	Cao nấm men	NaNO ₃	Pepton
Mật độ vi khuẩn (Log 10. CFU/ml)	8,20 ^b ± 0,13	10,08 ^a ± 0,20	8,03 ^b ± 0,04	10,00 ^a ± 0,05

Ghi chú: Trong cùng một hàng giá trị trung bình mang chữ cái giống nhau thì không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở $P = 0,05$.

Bảng 10. Kết quả sự ảnh hưởng của nguồn cacbon đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15

Thí nghiệm	Nguồn cacbon		
	Glucose	Maltodextrin	Mật rỉ đường
Mật độ vi khuẩn (Log 10. CFU/ml)	9,24 ^b ± 0,05	9,28 ^b ± 0,02	9,41 ^a ± 0,06

Ghi chú: Trong cùng một hàng giá trị trung bình mang chữ cái giống nhau thì không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở $P = 0,05$.

3.2.4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Dịch tăng sinh *P. stutzeri* KL15 sau 24 giờ, đạt 10⁸ CFU/ml được cấy vào môi trường có nguồn nitơ lần lượt là (NH₄)₂SO₄, cao nấm men, NaNO₃ và peptone. Vi khuẩn được nuôi cấy ở các điều kiện tối ưu được xác định từ các thí nghiệm trước bao gồm tỉ lệ giống 2,5%, thời gian nuôi cấy 36 giờ, lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng 30°C.

Trong các nguồn nitơ được khảo sát nhận thấy cao nấm men có ảnh hưởng lớn nhất đến mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15, đạt giá trị $1,31 \times 10^{10}$ CFU/ml (10,08 Log₁₀. CFU/ml). Nguồn nitơ hữu cơ khác là peptone cho giá trị mật độ vi khuẩn thấp hơn, khoảng 7% so với nguồn cao nấm men. Mật độ vi khuẩn khi nuôi cấy trong môi trường chứa cao nấm men có khác biệt có ý nghĩa so với các nguồn nitơ khác ($P < 0,05$), do đó cao nấm men được chọn làm nguồn nitơ thích hợp cho quá trình thu sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15.

3.2.5. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Kết quả khảo sát các nguồn cacbon cho thấy mật rỉ đường cho giá trị mật độ vi khuẩn cao nhất, đạt $2,56 \times 10^9$ CFU/ml (9,41 Log₁₀. CFU/ml), sau đó đến glucose và maltodextrin (Bảng 10).

Xét về giá trị kinh tế, mật rỉ đường là nguồn cacbon rất thích hợp cho quá trình lên men thu nhận sinh khối vi khuẩn. Kết quả xử lý thống kê cho thấy mật độ vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường chứa mật rỉ đường có khác biệt có ý nghĩa với các nguồn cacbon khác ($P < 0,05$). Do đó, chọn mật rỉ đường làm nguồn cacbon tối ưu nhất cho thành phần môi trường.

3.3. Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15

3.3.1. Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng ma trận Plackett - Burman (Plackett & Burman, 1946)

Dịch tăng sinh vi khuẩn với các điều kiện khảo sát từ các thí nghiệm trên sau khi điều chỉnh đạt mật độ vi khuẩn 10⁸ CFU/ml được cấy vào môi trường gồm 6 thành phần là mật rỉ đường, cao nấm men, K₂HPO₄, MgSO₄, CaCl₂ và NaCl đã được bố trí theo ma trận Plackett - Burman. Vi khuẩn được nuôi cấy ở điều kiện thích hợp đã được khảo sát từ các thí nghiệm trước. Xác định mật độ vi khuẩn và nhập vào phần mềm Design Expert 11 để xử lý số liệu. Kết quả được trình bày ở bảng 11.

Sau khi xử lý thu được kết quả như sau: từ 6 yếu tố chọn được 3 yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất đến mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 đều

Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)

là các giá trị có ảnh hưởng + với mức ý nghĩa $P = 0,05$ ($P < 0,05$), bao gồm: mật rỉ đường, cao nấm men và $MgSO_4$. Trong khi đó 3 yếu tố gồm K_2HPO_4 , $CaCl_2$ và $NaCl$ có ảnh hưởng thấp, đồng thời giá trị $P > 0,05$ nên không có ý nghĩa về mặt thống kê, do đó bị loại bỏ.

Dựa vào hệ số ảnh hưởng cho thấy mật rỉ đường có tác động lớn nhất đến mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 (0,55 g/l), sau đó là cao nấm men (0,32 g/l) và cuối cùng là $MgSO_4$ (0,25 g/l).

Dựa vào kết quả bảng 12 cho thấy giữa giá trị mô hình và thực nghiệm có sự chênh lệch không đáng kể. Ba yếu tố bao gồm mật rỉ đường, cao nấm men và $MgSO_4$ là những yếu tố có ảnh hưởng và tác động nhiều nhất đến quá trình

nhân sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15. Do đó chọn ba yếu tố này cho thiết kế thí nghiệm theo ma trận Box - Behnken để xác định sự tương tác giữa các yếu tố cũng như xác định các thông số tối ưu ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15.

3.3.2. Tối ưu hóa thành phần môi trường

Từ ba yếu tố đã được sàng lọc bằng ma trận Plackett - Burman bao gồm mật rỉ đường, cao nấm men và $MgSO_4$, tiến hành thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa. Dịch tăng sinh vi khuẩn sau 24 giờ, mật độ 10^8 CFU/ml sẽ được cấy vào môi trường có thành phần được bố trí theo ma trận Box - Behnken (Box & Behnken, 1960; Ferreira & cs., 2007).

Bảng 11. Các biến trong ma trận Plackett - Burman và ảnh hưởng của chúng

Ký hiệu	Yếu tố	Đơn vị	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
			Thấp (-1)	Cao (-1)	Ảnh hưởng	Prob>F
A	Mật rỉ đường	g/l	2	6	0,55 ^a	0,0002
B	Cao nấm men	g/l	9	25	0,32 ^a	0,0029
C	K_2HPO_4	g/l	1,25	5,00	0,03 ^b	0,6502
D	$MgSO_4$	g/l	0,25	1,50	0,25 ^a	0,0079
E	$CaCl_2$	g/l	0,05	0,40	0,09 ^b	0,1933
F	$NaCl$	g/l	1	5	-0,15 ^b	0,0568

Ghi chú: ^a: có ý nghĩa ở độ tin cậy $P = 0,05$; ^b: không có ý nghĩa ở độ tin cậy $P = 0,05$

Bảng 12. Ma trận thiết kế Plackett - Burman

Thí nghiệm thứ	Các biến						Mật độ vi khuẩn (Log10. CFU/ml)	
	A	B	C	D	E	F	Thực nghiệm	Mô hình
1	1	1	-1	-1	-1	1	10,19	10,10
2	-1	1	-1	1	1	-1	10,01	10,04
3	1	-1	1	1	-1	1	10,05	10,06
4	1	1	-1	1	1	1	10,36	10,44
5	-1	1	1	-1	1	1	9,69	9,67
6	1	1	1	-1	-1	-1	10,16	10,27
7	-1	-1	1	-1	1	1	9,33	9,35
8	-1	1	1	1	-1	-1	10,08	9,98
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9,31	9,38
10	-1	-1	-1	1	-1	1	9,48	9,49
11	1	-1	-1	-1	1	-1	10,10	10,01
12	1	-1	1	1	1	-1	10,31	10,29

Bảng 13. Các yếu tố trong ma trận Box - Behnken

Yếu tố	Ký hiệu	Đơn vị	Khoảng biến thiên	Mức		
				Thấp (-1)	Cơ sở (0)	Cao (1)
Mật rỉ đường	A	g/l	2 - 6	2	4	6
Cao nấm men	B	g/l	9-25	9	17	25
MgSO ₄	C	g/l	0,5-1,5	0,5	1,0	1,5

Bảng 14. Thiết kế ma trận Box - Behnken

Thí nghiệm	Mật rỉ đường (A)	Cao nấm men (B)	MgSO ₄ (C)	Mật độ vi khuẩn (Log10.CFU/ml)	
				Thực nghiệm	Mô hình
1	1	0	-1	11,37	11,38
2	0	0	0	11,54	11,55
3	1	1	0	11,53	11,51
4	0	-1	1	11,36	11,35
5	-1	0	-1	11,04	11,05
6	-1	0	1	11,20	11,19
7	0	-1	-1	11,28	11,25
8	0	0	0	11,54	11,55
9	0	1	-1	11,31	11,32
10	0	0	0	11,57	11,55
11	0	1	1	11,43	11,46
12	1	0	1	11,48	11,47
13	-1	1	0	11,17	11,15
14	1	-1	0	11,36	11,38
15	-1	-1	0	11,09	11,11

Kết quả bảng 14 cho thấy mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 nằm trong khoảng từ 11,04 Log10. CFU/ml đến 11,57 Log10. CFU/ml. Mật độ vi khuẩn đạt cao nhất khi nồng độ thành phần môi trường như sau: mật rỉ đường 4 g/l, cao nấm men 17 g/l và MgSO₄ 1 g/l. Trong khi đó khi nồng độ các thành phần môi trường gồm mật rỉ đường 2 g/l, cao nấm men 17 g/l và MgSO₄ 0,5 g/l thì mật độ vi khuẩn đạt thấp nhất. Từ kết quả phân tích ANOVA ảnh hưởng của 3 yếu tố đến hàm mục tiêu được trình bày ở Bảng 14, các giá trị của các nhân tố tuyến tính (A, B, C) và giá trị bậc hai (A², B², C²) đều thể hiện mức độ ý nghĩa tin cậy cao (P-value <0,05) khi tham gia mô hình ngoại trừ ba tương tác AB, AC và BC (P-value >0,05). Giá trị F-value

của mô hình là 54,25 và giá trị P-value = 0,0002 đã chứng tỏ mô hình thí nghiệm được thiết lập có ý nghĩa thống kê cao.

Dựa vào kết quả phân tích, phương trình hồi quy đa biến cho kết quả trên được thể hiện như sau: $Y = 11,55 + 0,1550A + 0,0437B + 0,0588C + 0,0225AB - 0,0125AC + 0,0100BC - 0,1675A^2 - 0,0950B^2 - 0,1100C^2$.

Trong đó: Y là mật độ vi khuẩn (Log10. CFU/ml), A mật rỉ đường (g/l), B là cao nấm men (g/l), C là MgSO₄ (g/l).

Hệ số xác định tương quan R² là yếu tố xác định sự phù hợp của mô hình được kiểm chứng. Khi hệ số xác định tương quan R² lớn hơn 0,8 thì mô hình có độ tương quan tốt (Guan & Yao, 2008). Mô hình tương quan được xây dựng từ thí

Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)

nghiệm phải thỏa mãn điều kiện với giá trị R^2 cao ($R^2 = 0,9899$) tức có 98,99% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu mô hình. Điều này cũng chứng tỏ rằng mô hình phù hợp với các đại diện đầy đủ của các mối quan hệ thực sự giữa các biến được lựa chọn. Theo Montgomery (1984), giá trị P-value của Lack of Fit là 0,2125 ($>0,05$) phản ánh độ rời rạc của dữ liệu phải không có ý nghĩa về mặt thống kê. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy sự thay đổi của mật rỉ đường (P-value $<0,0001$) và cao nấm men (P-value = 0,0075) trong khoảng khảo sát của hai yếu tố này có ảnh hưởng mạnh, tuy nhiên sự tương tác giữa hai yếu tố mật rỉ đường và cao nấm men (AB, P-value = 0,1758) ít có tác động đến mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15. Bên cạnh đó, sự thay đổi của $MgSO_4$ (P-value = 0,0021) cũng ảnh hưởng lớn tới mật độ vi khuẩn. Mặt khác, sự tương tác giữa cao nấm men và $MgSO_4$ (BC, P-value = 0,5148) và sự tương tác giữa mật

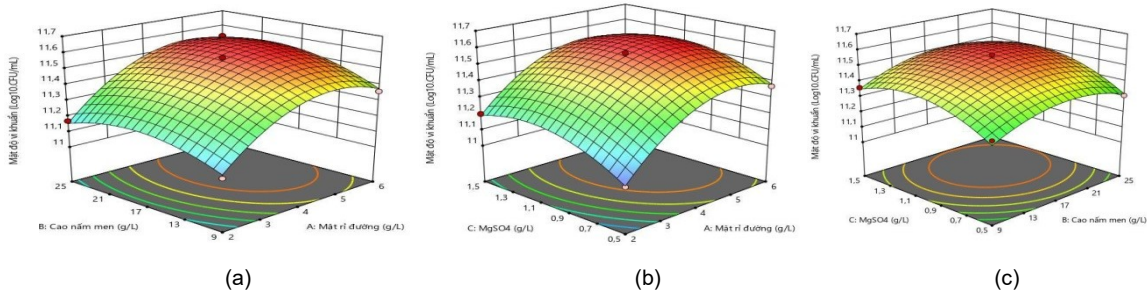
rỉ đường và $MgSO_4$ (AC, P-value = 0,4213) đều ảnh hưởng không nhiều đến mật độ vi khuẩn. Hệ số xác định tương quan $R^2 = 0,9899$ cho thấy 98,99% phương sai của mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 có thể được giải thích bởi ba yếu tố trên. Đồng thời, R^2 hiệu chỉnh của mô hình cao, ($R^2_{Adj} = 0,9716$) cho thấy mô hình thể hiện thực tế khá chính xác và R^2 dự đoán ($R^2_{pred} = 0,8583$) phù hợp với R^2 hiệu chỉnh (sai khác phù hợp là nhỏ hơn 0,20) cho thấy mô hình đã đầy đủ. Adeq Precision (độ chính xác đầy đủ) = 21,6113 thể hiện một tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu tốt (yêu cầu > 4), điều này cho thấy mô hình phù hợp để đưa vào thực tế. Để xác định mức độ tối ưu của mỗi yếu tố đối với mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 và sự tương tác của từng cặp yếu tố, đồ thị bề mặt 3D - đáp ứng bề mặt được xây dựng với trục Z là mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 và 2 yếu tố độc lập bất kỳ, trong khi duy trì yếu tố còn lại ở mức tối ưu.

Bảng 15. Kết quả phân tích ANOVA

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình phương	F-value	P-value
Model	0,3979	9	0,0442	54,25	0,0002
A - Mật rỉ đường	0,1922	1	0,1922	235,83	$<0,0001$
B - Cao nấm men	0,0153	1	0,0153	18,79	0,0075
C - $MgSO_4$	0,0276	1	0,0276	33,88	0,0021
AB	0,002	1	0,002	2,48	0,1758
AC	0,0006	1	0,0006	0,77	0,4213
BC	0,0004	1	0,0004	0,49	0,5148
A^2	0,1036	1	0,1036	127,11	0,0001
B^2	0,0333	1	0,0333	40,89	0,0014
C^2	0,0447	1	0,0447	54,82	0,0007
Phần dư	0,0041	5	0,0008		
Sự thiếu phù hợp	0,0035	3	0,0012	3,86	0,2125
Sai số	0,0006	2	0,0003		
Tổng	0,402	14	0,0442		
R^2	R^2_{Adj}	R^2_{Pred}	C.V. %	Adeq precision	
0,9899	0,9716	0,8583	0,2515	21,6113	

Bảng 16. Kết quả kiểm định mô hình thực tế

Lần lặp lại	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung Bình
Mật số vi khuẩn (CFU/ml)	$2,2.10^{11}$	$2,5.10^{11}$	$2,4.10^{11}$	$2,37.10^{11}$



Hình 1. Mặt đáp ứng giữa các yếu tố (a) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và mật rỉ đường, (b) Mặt đáp ứng tương tác giữa mật rỉ đường và MgSO_4 , (c) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và MgSO_4

Hình 1a và 1b cho thấy mật rỉ đường là yếu tố có ảnh hưởng lớn đến mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15. Đồ thị mặt đáp ứng cho thấy, nồng độ mật rỉ đường trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn tỉ lệ thuận với mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15, nhưng đến giới hạn nhất định mật độ vi khuẩn giảm dần do nồng độ mật rỉ đường cao sẽ làm thay đổi áp suất thẩm thấu của môi trường gây ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn. Các loài vi khuẩn nằm trong chi *Pseudomonas* thường sinh trưởng và phát triển tối ưu khi môi trường có tỉ lệ C:N là 20:60 (Peekate & Gideon, 2017). Khi nồng độ mật rỉ đường quá cao làm tăng tỉ lệ C trong môi trường nuôi cấy, khiến tỉ lệ C: N bị chênh lệch, từ đó làm mật độ vi sinh vật giảm. Tương tự, nồng độ cao nấm men trong môi trường cũng có ảnh hưởng đáng kể đến mật độ vi khuẩn. Khi nồng độ cao nấm men thay đổi, tỉ lệ N thay đổi làm ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn. Tuy nhiên, từ kết quả ở hình 1a và hình 1c cho thấy nồng độ cao nấm men ảnh hưởng không nhiều bằng nồng độ mật rỉ đường trong quá trình nhân sinh khối *P. stutzeri* KL15. Bên cạnh đó, nồng độ MgSO_4 trong môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng tương đối khá đến quá trình nhân sinh khối *P. stutzeri* KL15 nhưng sự tác động của yếu tố này có vẻ không nhiều bằng mật rỉ đường và cao nấm men.

3.4. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Từ các dữ liệu thu được và phương trình hồi quy, các thông số tối ưu của mỗi thành phần môi trường được xác định như sau: mật rỉ đường

4,95 g/l, cao nấm men 19,08 g/l và MgSO_4 1,13 g/l, mô hình dự đoán mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 tối đa đạt $2,45 \times 10^{11}$ CFU/ml (11,60 Log10. CFU/ml). Để kiểm chứng mô hình, thí nghiệm kiểm định được thực hiện với 3 lần lặp lại với thành phần môi trường tối ưu như trên và kết quả được trình bày trong bảng 15.

Mật số vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 sau 36 giờ nuôi cấy, nhiệt độ 33°C, tỉ lệ nập giống là 2,5% là $2,37 \times 10^{11}$ CFU/ml, tương thích với mật số vi khuẩn mà mô hình đã dự đoán. Yanjie & cs. (2014) đã tối ưu hóa thành phần của môi trường lên men giá rẻ để thu sinh khối *P. putida* R-198 và sản xuất axetic acid hòa tan (IAA) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). Nồng độ IAA tối đa (18,73 mg/l) được dự đoán trong môi trường chứa 52,41 g/l bột ngô, bột đậu nành 15,82 g/l, 2,40 g/l K_2HPO_4 , 0,17 g/l MnSO_4 và 5,00 g/l NaCl, mật độ vi khuẩn đạt tối đa 10^{13} CFU/ml. Tác giả Ana & cs. (2017) đã nghiên cứu thành phần tối ưu của môi trường nuôi cấy 2 dòng vi khuẩn *P. stutzeri* là glucose, KNO_3 và peptone khác hoàn toàn với môi trường tối ưu của dòng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15, có thể các dòng vi khuẩn tuy cùng loài *P. stutzeri* nhưng khi được phân lập ở các điều kiện sinh thái khác nhau thì sẽ phát triển các môi trường lên men khác nhau. Từ các nghiên cứu cho thấy nguồn nitơ, cacbon, các muối vô cơ ảnh hưởng khá nhiều đến việc nhân sinh khối các dòng vi khuẩn và các tác giả cũng nhắm tới việc lựa chọn nguồn nghiên cứu rẻ tiền để có thể lên men vi khuẩn ở qui mô lớn.

Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)

4. KẾT LUẬN

Vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 là chủng vi khuẩn có hiệu suất chuyển hóa NH_4^+ là 83,87% với thời gian 7 ngày, hiệu suất xử lý NO_2^- 99,06% trong thời gian 4 ngày và hiệu suất xử lý NO_3^- 98,07% với 3 ngày.

Sáu yếu tố bao gồm mật rỉ đường, cao nấm men, K_2HPO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , và NaCl được tiến hành thí nghiệm sàng lọc bằng ma trận Plackett - Burman, từ đó đã chọn ra ba yếu tố chính ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 là mật rỉ đường, cao nấm men và MgSO_4 .

Thông qua thí nghiệm tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu được phương trình hồi quy có dạng: $Y = 11,55 + 0,1550A + 0,0437B + 0,0588C + 0,0225AB - 0,0125AC + 0,0100BC - 0,1675A^2 - 0,0950B^2 - 0,1100C^2$ với Y là sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15. Mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 được mô hình dự đoán cao nhất với giá trị đạt $2,45 \times 10^{11}$ CFU/ml với thành phần môi trường gồm mật rỉ đường 4,76 g/l, cao nấm men 18,99 g/l, MgSO_4 0,99 g/l thực hiện trong điều kiện nhiệt độ 30°C, thời gian nuôi cấy 36 giờ, tỉ lệ nạp giống là 2,5% và thực tế thí nghiệm thu được mật số vi khuẩn là $2,37 \times 10^{11}$ CFU/ml. Kết quả đáp ứng được mục tiêu nghiên cứu, xây dựng được quy trình tối ưu thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ana M. Vidakovic, Olja Lj. Sovljanski, Aleksandra S. Ranitovic, Dragoljub D. Cvetkovi & Sinisa L. Markov (2017). Determination of culture medium composition for maximizing the biomass production of *Pseudomonas stutzeri*. Acta Periodica Technologica. 48: 295-305.
- APHA (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 22nd edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Cao Ngoc Diep, Pham My Cam, Nguyen Hoai Vung, To Thi Lai & Nguyen Thi Xuan My (2009). Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment. Bioresource Technology. 100: 3787-3791.
- Cao Ngoc Diep & Nguyễn Thị Hoàng Nam (2012). Ứng dụng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* và *Acinetobacter lwoffii* loại bỏ amoni trong nước thải từ rác hữu cơ. Tạp chí Khoa học. 22b: 1-8.
- Chi Chung Lin (1991). Metabolism of Maltodextrin in *Pseudomonas elodea* during Gellan Fermentation. Proceedings of the 1991 Annual Meeting of Society of Industrial Microbiology, Philadelphia, Pennsylvania, USA. p. 86.
- Đoàn Thị Tuyết Lê, Phạm Vũ Bảo, Nguyễn Ngọc Tùng & Đỗ Minh Anh (2020). Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men rẽ tiền chủng *Bacillus subtilis* LH1 bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm phục vụ sản xuất Probiotic, Tạp chí Khoa học Lạc Hồng. 9: 37-40.
- Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandao G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S., Souza A.S. & dos Santos W.N.L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. Anal. Chim. Acta. 597: 179-186.
- George Box & Donald Behnken (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics. 2: 455-475.
- Guan X. & Yao. H. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. Food Chemistry. 106(1): 345-351.
- Hujanen M., Linko S., Linko Y.Y. & Leisola M. (2001). Optimization of media and cultivation conditions for L (+) (S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 126-130.
- Montgomery D.C. (1984). Design and Analysis of Experiments. 2nd Edn., John Wiley, New York, ISBN: 0-471-86812-4.
- Myers H.R., Khuri A.I. & Carter W.H. (1989). Response Surface Methodology: 1966-1988. Technometrics. 31: 137-157.
- Norrman J. & Wober G. (1975) Comparative biochemistry of α -glucan utilization in *Pseudomonas amyloclavata* and *Pseudomonas saccharophila*. Arch Microbiol. 102: 253-260.
- Ngô Thị Kim Toán (2012). Nghiên cứu phân lập tuyển chọn các chủng vi sinh vật ứng dụng xử lý nước thải giàu nitơ, photpho. Luận văn thạc sĩ khoa học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Đại học Quốc gia Hà Nội.
- Nguyễn Cảnh (2004). Quy hoạch thực nghiệm. Nhà xuất bản Đại Học Quốc gia TP.HCM.
- Nguyễn Thị Phi Oanh & Nguyễn Thị Trúc Mai (2019). Phân lập vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite trong một số ao nuôi tôm ở Bạc Liêu. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ. 55(6B): 75-81.

- Park Y.S., Kang S.W., Lee J.S., Hong S.I. & Kim S.W. (2002). Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 761-766.
- Peekate L. & Gideon O. Abu (2017). Optimizing C: N Ratio, C:P Ratio, and pH for Biosurfactant Production by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Advances in Microbiology*. 7(2): 1-14.
- Phạm Thanh Hà, Trần Đình Mẫn & Trần Thị Hoa (2013). Nghiên cứu, lựa chọn điều kiện nuôi cấy và lên men chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* để thu nhận enzyme Uricase, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. 51(6): 709-718.
- Plackett R.L. & Burman J.P. (1946). The Design of Optimum Multifactorial Experiments *Biometrika*. 33(4): 305-325.
- Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization.
- Tim Schuurman, Richard F. de Boer, Anna M.D. Kooistra-Smid & Anton A. van Zwet (2004). Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16s ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(2): 734-74.
- Trần Linh Thuộc (2007). Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm. Nhà xuất bản Giáo dục.
- Trần Quốc Tuấn, Nguyễn Thị Thu Kiều, Lê Thị Thúy Ái, Đinh Minh Hiệp & Trần Cát Đông (2014). Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men chủng *Bacillus subtilis* thu nhận nattokinase tái tổ hợp bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. *Tạp chí Sinh học*. 36: 130-137.
- The Global Health Network (2013). Bacterial Identification Using BioMerieux API Kits. COMRU-AHC. 21p.
- Trịnh Hoài Vũ (2014). Phân lập và xác định khả năng khử đạm của vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* trong nước thải ao nuôi cá tra. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học An Giang*. 2(1): 16-25.
- Yanjie Peng, Yanhui He, Zhansheng Wu, Jianjiang Lu & Chun Li (2014). Screening and optimization of low-cost medium for *Pseudomonas putida* Rs-198 culture using RSM. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(4): 1229-1237.
- Yu X., Hallet S.G., Sheppard J. & Watson A.K. (1997). Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47: 301-305.
- Zhang J., Wu P., Hao B. & Z. Yu. (2011). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresource Technology*. 102: 9866-9.