

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG BÃ MEN BIA LÀM NGUỒN C/N CHO QUÁ TRÌNH NHÂN NUÔI VI KHUẨN *Bacillus velezensis* EB.KN15 KHÁNG NẤM

Phytophthora palmivora

Ngô Văn Anh¹, Trần Thị Hà Trang¹, Nguyễn Văn Bốn¹, Nguyễn Anh Dũng¹

Ngày nhận bài: 31/5/2024; Ngày phản biện thông qua: 31/7/2024; Ngày duyệt đăng: 01/8/2024

TÓM TẮT

Phụ phẩm sản xuất bia (BMB) được báo cáo là nguồn cơ chất giàu dinh dưỡng gồm protein (22,18%), tro (10,1%), carbohydrate (1,98%), đường và các nguyên tố khoáng chất dồi dào. *Bacillus velezensis* là vi khuẩn an toàn, có nhiều đặc tính quý có lợi cho cây trồng, do đó, chế phẩm *B. velezensis* được nghiên cứu phát triển rộng rãi trong phòng ngừa và kiểm soát sinh học cho cây trồng. Trong nghiên cứu này, BMB được sử dụng làm nguồn cơ chất chính trong quá trình lên men vi khuẩn *B. velezensis* EB.KN15. Kết quả thực nghiệm cho thấy chủng EB.KN15 sinh trưởng tốt trong môi trường chứa 1,05% BMB; 0,45% LB ở 30°C; pH=7; 200 rpm trong 48 giờ đạt $8,23 \times 10^9$ CFU/ml (điều kiện bình tam giác). Sản xuất chế phẩm *B. velezensis* EB.KN15 trong hệ thống Bioreactor đạt $2,11 \times 10^{11}$ CFU/ml trong thời gian ngắn (10 giờ). Hoạt tính kháng nấm được đánh giá bằng sinh khối của chủng EB.KN15 sau lên men, ghi nhận kháng *Phytophthora palmivora*: 78,11%. Kết quả nghiên cứu là minh chứng cho tiềm năng ứng dụng phụ phẩm sản xuất bia trong phát triển chế phẩm *B. velezensis* EB.KN15 cũng như mở ra hướng ứng dụng phát triển chế phẩm sinh học bản địa từ vi khuẩn nội sinh nhằm canh tác hiệu quả và bền vững cây sầu riêng.

Từ khóa: *Bacillus velezensis*, Bã men bia, Bioreactor, *Phytophthora palmivora*.

1. MỞ ĐẦU

Phụ phẩm sản xuất bia (BMB) là một sản phẩm phụ chiếm khối lượng khá lớn trong ngành công nghiệp sản xuất bia với khoảng 1,5 - 2,5% tổng sản lượng bia (Bekatorou, A. et al, 2015). BMB được xác nhận là nguồn cơ chất giàu dinh dưỡng gồm protein (22,18%), tro (10,1%), carbohydrate (1,98%), đường và các nguyên tố khoáng chất dồi dào (T.H. Nguyen et al, 2024). Vì vậy, BMB được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, dược phẩm, nông nghiệp,... đặc biệt là làm nguyên vật liệu sản xuất thuốc trừ sâu sinh học (Ejiofor A.O. (1991), sử dụng làm môi trường nuôi cấy lên men vi sinh vật để sản xuất acid hữu cơ (Pathania S. et al, 2018; Giroto F. et al, 2019; Puligundla P. and Mok C., 2021; S. Chattaraj et al, 2024),...

Các vi sinh vật có lợi đang đóng vai trò thay thế cho thuốc trừ sâu và phân bón bằng cách bảo vệ cây trồng khỏi bệnh hại. *Bacillus velezensis* là vi khuẩn an toàn và có nhiều đặc tính quý có lợi, trong đó nổi bật với khả năng sản sinh các chất kháng nấm, kháng tuyến trùng và kháng vi khuẩn gây bệnh cho cây trồng (Trần Thị Hà Trang và cs, 2022). Hiện nay, các nhà khoa học đang quan tâm nghiên cứu chế phẩm *B. velezensis* và ứng dụng rộng rãi trong phòng ngừa và kiểm soát sinh học cây trồng trên nhiều nguồn dinh dưỡng: phế

phụ phẩm nông nghiệp, phế phụ phẩm thủy sản, nguồn dinh dưỡng thương mại và một số nguồn dinh dưỡng khác (M.F. Rabbee et al, 2019; Lê Vũ Khánh Trang và cs, 2021; Trần Thị Hà Trang và cs, 2022). Tuy nhiên, BMB chưa được nghiên cứu sử dụng cho nhân nuôi *B.velezensis*.

Trong nghiên cứu này, sử dụng BMB làm nguồn dinh dưỡng chính cho lên men *B. velezensis* EB.KN15 trên quy mô lớn Bioreactor 14L với chủng EB.KN15 là chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng. Vì vậy, nghiên cứu góp phần phát triển chế phẩm sinh học bản địa giá thành rẻ nhằm canh tác sầu riêng hiệu quả và bền vững.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

- Đối tượng: chủng *B. velezensis* EB.KN15 được phân lập, tuyển chọn từ cây sầu riêng và bảo quản tại Viện CNSH&MT; chủng *P. palmivora* phân lập, tuyển chọn từ cây sầu riêng bị vàng lá, thối rễ tại tỉnh Đắk Lắk, đã được định danh và bảo quản tại Viện CNSH&MT (Ngô Văn Anh và cs, 2024).

- Vật liệu: phụ phẩm sản xuất bia (BMB) được sản xuất bởi Thức Ăn Chăn Nuôi Đại Phước Lộc - Công Ty Cổ Phần Thương Mại Đại Phước Lộc (T.H. Nguyen et al, 2024), Pepton, Cao nấm men, NaCl (Merk).

¹Viện Công nghệ sinh học & Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên;

Tác giả liên hệ: Ngô Văn Anh; ĐT: 0374559085; Email: nvanh@ttn.edu.vn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu nhân nuôi chủng *Bacillus velezensis* EB.KN15

2.2.1. Phương pháp đánh giá mật độ vi khuẩn sau nuôi cấy

Mật độ vi sinh vật được xác định bằng phương pháp xác định gián tiếp số lượng tế bào thông qua cách đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch (Nguyễn Lâm Dũng và cs, 1972, 1978).

2.2.2. Phương pháp xác định nguồn cơ chất phù hợp cho quá trình nhân nuôi vi khuẩn nội sinh *EB.KN15* trong bình tam giác

Tiến hành nhân nuôi chủng vi khuẩn EB.KN15 trong các môi trường thích hợp bổ sung các tỷ lệ phế phụ phẩm và protein khác nhau. Sau 24 giờ, thu dịch lên men và xác định nồng độ vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

* Cách tiến hành:

- Nuôi chủng vi khuẩn trong các môi trường với tỷ lệ dinh dưỡng khác nhau của bã men bia/LB gồm: 0/10; 3/7; 5/5; 7/3; 10/0. Trong đó:

+ Nghiệm thức 1: 1,5g LB + 0,5g NaCl + 100 ml H₂O.

+ Nghiệm thức 2: 0,45g bột bã men bia + 1,05g LB + 0,5g NaCl + 100 ml H₂O.

+ Nghiệm thức 3: 0,75g bột bã men bia + 0,75g LB + 0,5g NaCl + 100 ml H₂O.

+ Nghiệm thức 4: 1,05g bột bã men bia + 0,45g LB + 0,5g NaCl + 100 ml H₂O.

+ Nghiệm thức 5: 1,5g bột bã men bia + 0,5g NaCl + 100 ml H₂O.

Với LB gồm 2peptone:1yeast extract.

- Khử trùng ở nhiệt độ 121°C, 1atm trong 15 phút, pH=7.

- Hút 1ml dịch nuôi cấy đã hoạt hóa cho vào các bình môi trường trên. Tiến hành nuôi vi khuẩn ở điều kiện thường. Lắc ở tốc độ 150 vòng/phút trong vòng 24h. Sự sinh trưởng sinh khối vi khuẩn được xác định thông qua mật độ của chúng, từ đó chọn được tỷ lệ và nguồn protein thích hợp nhất để nhân nuôi vi khuẩn.

2.2.3. Phương pháp xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp

Từ kết quả nghiên cứu nguồn cơ chất và tỉ lệ khoáng sẽ được lựa chọn để khảo sát ở các điều kiện nuôi cấy khác lần lượt: nhiệt độ nuôi cấy, pH nuôi cấy, tốc độ lắc, thời gian nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- Khảo sát nhiệt độ nuôi cấy thích hợp: 28°C; 30°C; 32°C; 34°C và 36°C.

- Khảo sát pH thích hợp của môi trường nuôi cấy: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0.

- Khảo sát tốc độ lắc thích hợp: 0 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm, 250 rpm.

- Khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp: theo dõi mật độ vi sinh vật sau 24, 36, 48, 60, 72 h nuôi cấy.

Sau khi xác định được thành phần môi trường nuôi cấy và một số thông số ảnh hưởng quan trọng đến quá trình nhân nuôi chủng vi khuẩn *B. velezensis* EB.KN15 trong điều kiện bình tam giác, tiến hành nhân sinh khối thử nghiệm trên hệ thống lên men tự động Bioreactor.

2.2.4. Phương pháp nhân nuôi chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* EB.KN15 trong hệ thống Bioreactor

- Các thông số lên men trong Bioreactor 14 L, BiFlo, Brunswick, Hoa Kỳ: được tiến hành lên men trong 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h và theo dõi theo mật độ vi khuẩn sau nuôi cấy dựa trên kết quả khảo sát ở các thí nghiệm trên bình tam giác ở phần trước (2.3.2 và 2.3.3).

2.2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng nấm bệnh vàng lá cây sầu riêng của chủng sau khi nhân sinh khối trên hệ thống Bioreactor

Hoạt tính kháng nấm bệnh *P. palmivora* của chủng vi khuẩn *B. velezensis* EB.KN15 sau khi nuôi cấy trên hệ thống Bioreactor được xác định theo phương pháp đánh giá hoạt tính kháng nấm bệnh *P. palmivora* trên môi trường PGA theo phương pháp của Van Anh Ngo et al năm 2020 (V.A. Ngo et al, 2024). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại. Các số liệu biểu diễn giá trị trung bình của lần lặp lại \pm độ lệch chuẩn (mean \pm standard deviation), sự sai khác được phân tích với phép so sánh Duncan bằng phần mềm SPSS 20 với mức ý nghĩa $p < 0,01$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định nguồn cơ chất phù hợp cho quá trình nhân nuôi *Bacillus velezensis* EB.KN15

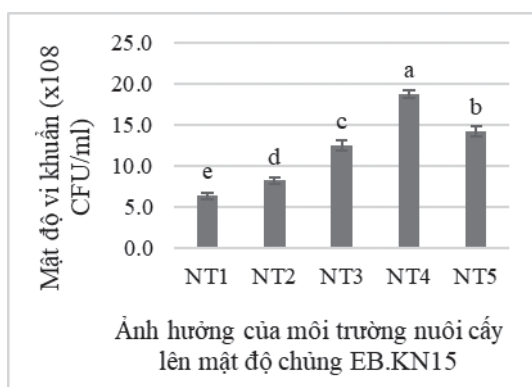
Carbon và nitơ là hai nguồn dinh dưỡng cần thiết với vi sinh vật vì chúng tham gia vào thành phần cấu trúc của các phân tử quan trọng như nucleotide, aminoacid, protein (Nguyễn Văn Giang và cs, 2019); đối với vi khuẩn, môi trường nuôi cấy luôn có tỉ lệ N cao (Nguyễn Lâm Dũng, 2000). Đây là cơ sở để tiến hành khảo sát xác định nguồn protein và carbohydrate phù hợp cho quá trình nhân nuôi chủng EB.KN15.

Bảng 1. Các nghiên cứu sử dụng nguồn dinh dưỡng và các thông số lên men của *Bacillus velezensis*

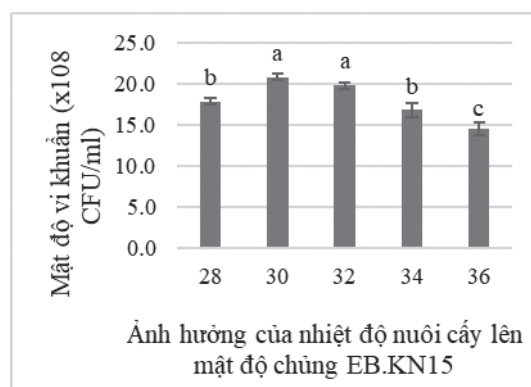
Tên vi khuẩn	Nguồn phân lập	Môi trường nuôi cấy	Điều kiện nuôi cấy	Tài liệu trích dẫn
<i>B. velezensis</i> NH-1		Tinh bột sản biến tính 0,5%; natri alginat 3%; CaCl ₂ 2%; chitosan 0,8%	pH 3,0	W. Luo et al, 2019
<i>B. velezensis</i> KY498625		Mật đường 12% (w/v), chiết xuất nấm men 6 g/L	30°C	M.S. Khan et al, 2020
<i>B. velezensis</i> DP-2	Douchi	SBM (bột đậu nành)	37°C và 48 giờ	Z. Liu et al, 2021
<i>B. velezensis</i> FJ17-4		Bột đậu nành 12,5 g/L ⁻¹ ; bột ngô 5,0 g/L ⁻¹ và KH ₂ PO ₄ 12,5 g/L ⁻¹	30°C, 40 giờ và 180 rpm (1,03×10 ¹⁰ CFU/ml)	Lan C. et al, 2022
<i>B. velezensis</i> BL-1	Đất	Bột đậu nành (2%) và mật đường (10%)	48 giờ (> 5×10 ⁸ CFU/mL).	Mai T.L. et al, 2022
<i>B. velezensis</i> BS		1% SBM	pH 6-9, nhiệt độ 20-45°C, độ mặn 4%, 24 giờ	P.H. Hoang et al, 2023
<i>B. velezensis</i> Strain Tcb43		Dầu đậu nành 0,25%	ở 12–40°C, độ mặn: 7–10% và pH 5-11 (5,35× 10 ⁸ CFU/mL)	C-C. Kuo et al, 2023
<i>B. velezensis</i> NT35	Đất vùng rẫy của nhân sâm	Chiết xuất nấm men 2,5%, bột ngô 1,5%, K ₂ HPO ₄ 1,5% và (NH ₄) ₂ SO ₄ 2,5%	pH=7,0 ở 34°C với tốc độ 180 vòng/phút	M. Li et al, 2023

Bacillus velezensis hiện nay đang được quan tâm nghiên cứu bởi nhiều tiềm năng trong việc ứng dụng sản xuất các chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh hại và giúp tăng năng suất cho cây trồng. Trong đó, nguồn phế phụ phẩm nông nghiệp được sử dụng khá nhiều (Bảng 1) với nhiều nghiên cứu sử dụng bột đậu nành làm nguồn dinh dưỡng chính trong lên men đạt mật độ > 5×10⁸ CFU/mL (Z. Liu et al, 2021; Lan C. et al, 2022; Mai T.L. et al, 2022; P.H. Hoang et al, 2023; C-C. Kuo et al, 2023). Ngoài ra, *B. velezensis* còn sinh trưởng tốt trên các phế phụ phẩm nông nghiệp khác như: bột ngô, mật đường, tinh bột sản biến tính, rẫy đậu

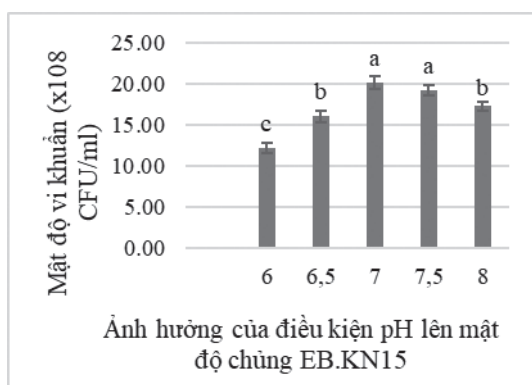
phộng,...(Bảng 1). Trong nghiên cứu này, nguồn cơ chất BMB là phụ phẩm nông nghiệp được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng chính với 5 nghiệm thức đạt mật độ 18,7×10⁸ CFU/ml (nghiệm thức 4-Biểu đồ 1), kết quả khá tương đồng với các nghiên cứu trên (Bảng 1). Tương tự, phụ phẩm bia cũng được sử dụng trong sản xuất thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14 đạt mật độ 4,4×10¹⁰ CFU/ml (Ejiofor A.O., 1991). Khi giảm thành phần BMB trong môi trường thì EB.KN15 giảm mật độ, do đó tỉ lệ phối trộn BMB và LB theo nghiệm thức 4 được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo (Biểu đồ 1).



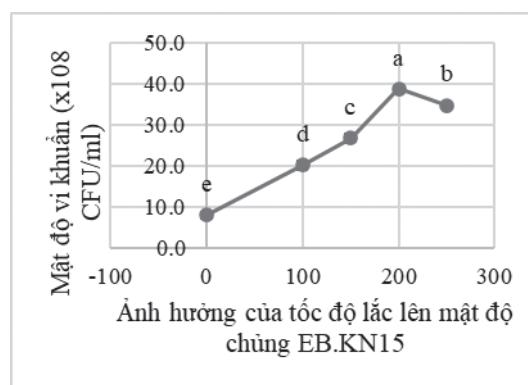
Biểu đồ 1



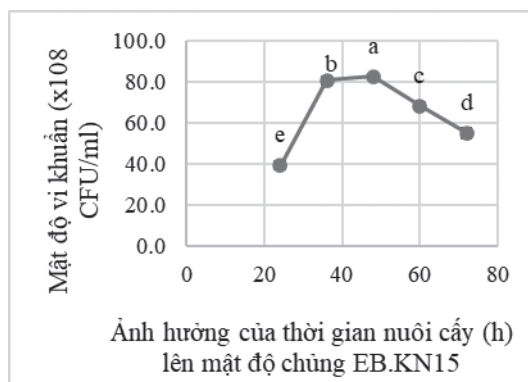
Biểu đồ 2



Biểu đồ 3



Biểu đồ 4



Biểu đồ 5

Hình 1. Ảnh hưởng của điều kiện nhân nuôi đến sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn *B. velezensis* EB.KN15 trong bình tam giác.

Ghi chú: Biểu đồ 1 (Môi trường nuôi cấy), Biểu đồ 2 (Nhiệt độ nuôi cấy), Biểu đồ 3 (điều kiện pH), Biểu đồ 4 (Tốc độ lắc) và Biểu đồ 5 (Thời gian nhân nuôi).

3.2. Kết quả xác định điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* EB.KN15 thích hợp trong bình tam giác

Trong quá trình lên men, nhiệt độ nuôi cấy được coi nhân tố quyết định đến sự phát triển và sinh trưởng của vi sinh vật (Trần Thị Hồng Châu, 2020). Ngưỡng nhiệt độ thích hợp để sinh trưởng và phát triển là khác nhau giữa các loài vi sinh vật (Nguyễn Văn Giang và cs, 2019). Từ Biểu đồ 2 ta thấy, mật độ của *B. velezensis* EB.KN15 đạt $20,8 \times 10^8$ CFU/ml ở 30°C. Kết quả nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Lan C. et al (2022), *B. velezensis* FJ17-4 đạt mật độ rất cao $1,03 \times 10^{10}$ CFU/ml khi lên men ở 30°C. Tương tự, báo cáo của Trần Thị Hà Trang và cs (2022), vi khuẩn *B. velezensis* KN12 đạt mật độ khá cao ($29,95 \times 10^8$ CFU/ml) ở 30°C trong điều kiện bình tam giác.

Nồng độ ion H⁺ hoặc OH⁻ làm thay đổi sự phân ly của các chất trong môi trường, biến đổi dù nhỏ nồng độ H⁺ trong thành phần môi trường cũng làm thay đổi trạng thái điện tích của thành tế bào có thể làm tăng hoặc giảm khả năng thẩm thấu của tế bào (Tran T.T.L. et al, 2016). Từ Bảng 1, thấy rằng *B. velezensis* sinh trưởng tốt trong dãy pH 6,0 - 9,0

và sinh trưởng tối ưu trong pH 7,0 (Mai T.L. et al, 2022; P.H. Hoang et al, 2023; M. Li et al, 2023), chủng EB.KN15 đạt $20,16 \times 10^8$ CFU/ml trong điều kiện pH 7 gấp 1,66 lần pH 6 và 1,17 lần pH 8 (Biểu đồ 3).

Tốc độ lắc ảnh hưởng nhiều đến sinh trưởng tế bào do ảnh hưởng đến quá trình cung cấp oxy và chất dinh dưỡng. Hàm lượng oxy trong môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất của tế bào vi khuẩn. Môi trường lỏng được trộn đều sẽ tăng tốc độ hòa tan của oxy, đồng thời tạo điều kiện dễ dàng cho tế bào hấp thụ chất dinh dưỡng. Tốc độ sinh trưởng của tế bào sẽ tăng khi tốc độ lắc tăng trong một phạm vi thích hợp. Tuy nhiên, khi tốc độ lắc quá cao sẽ dẫn đến sự ức chế sinh trưởng của tế bào vi khuẩn do tế bào bị biến dạng gây nên hiện tượng tự phân làm chết tế bào (Narayanaswamy S., 1994; Ziv M., 2000; Nguyễn Văn Khanh và cs, 2020). Mật độ chủng EB.KN15 cao nhất là $38,82 \times 10^8$ CFU/ml ở tốc độ lắc 200 rpm gấp 4,85 lần mật độ khi không lắc và 1,15 lần ở ở tốc độ lắc 250 rpm (Biểu đồ 4). Chọn tốc độ lắc 200 rpm cho các nghiên cứu tiếp theo.

B. velezensis EB.KN15 có nhiều biến động mật

độ qua các thời điểm nuôi cấy. Sau 48h nuôi cấy, mật độ trong bình tam giác đạt $8,23 \times 10^9$ CFU/ml gấp 2,11 lần so với khi nuôi ở 24h, chứng tỏ có tốc độ tăng trưởng mạnh. Tuy nhiên, mật độ giảm 1,5 lần khi nuôi ở 72h có nghĩa môi trường lên men đã tạo ra bất lợi về dinh dưỡng đến các yếu tố hóa lý (Biểu đồ 5).

Tóm lại, *B. velezensis* EB.KN15 sinh trưởng tốt nhất trong môi trường gồm 1,05% BMB; 0,45% LB ở 30°C với pH=7; lắc 200 rpm trong 48 giờ ($8,23 \times 10^9$ CFU/ml) trong điều kiện bình tam giác.

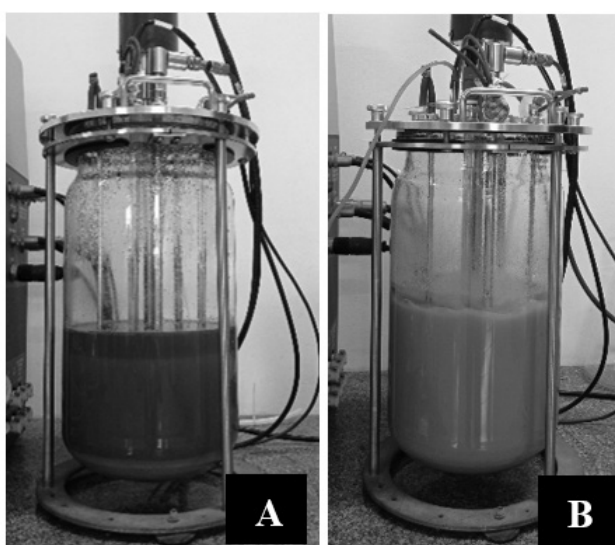
3.3. Kết quả nhân nuôi chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* EB.KN15 trên hệ thống Bioreactor

Chủng EB.KN15 được nhân nuôi trong quy mô lớn Bioreactor 14L từ 0h đến 12h giúp tiết kiệm thời

gian nuôi cấy. Khi nhân nuôi trong Bioreactor, mật độ chủng EB.KN15 tăng dần theo thời gian và đạt tối ưu $2,11 \times 10^{11}$ CFU/ml sau 10 h lên men (Bảng 4). Kết quả khá tương đồng với công bố của nhóm tác giả Trần Thị Hà Trang và cs(2022), nhân nuôi *B. velezensis* KN12 trong Bioreactor 14L sau 8h lên men mật độ đạt $2,78 \times 10^{10}$ CFU/ml.

Nghiên cứu là minh chứng cho ứng dụng BMB trong sản xuất chế phẩm *B. velezensis* EB.KN15 tiết kiệm, an toàn, bền vững và thân thiện với môi trường.

3.4. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng một số loài nấm bệnh của chủng sau khi nhân sinh khối trên hệ thống Bioreactor



Hình 2. Nhân nuôi *B. velezensis* EB.KN15 trong Bioreactor

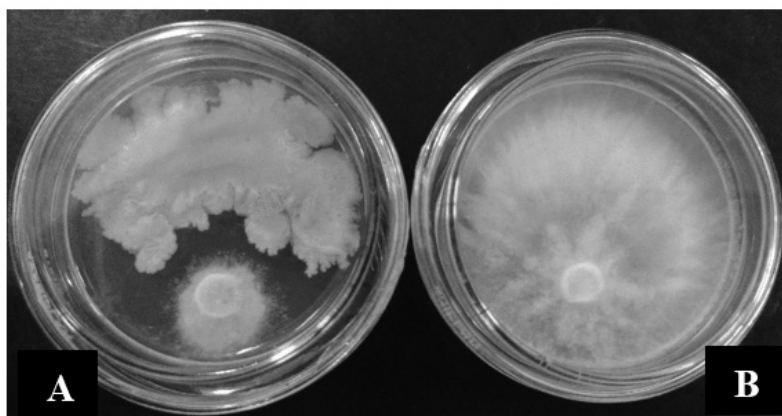
Ghi chú: Trong đó: A: Trước nuôi cấy. B: Sau 12 giờ nuôi cấy.

Một số nghiên cứu đã khảo sát hoạt tính kháng nấm bệnh của các chủng *B. velezensis* như: Inés Martínez-Raudales et al (2017), chủng *B. velezensis* 2A-2B với hơn 60% khả năng ức chế sinh trưởng đối với các nấm bệnh gây thối rễ (*Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*). Theo Jae-Hyun Moon et al (2021), *B. velezensis* CE 100 gây ức chế sự phát triển sợi nấm *Phytophthora* spp. (gây bệnh thối rễ cây *Chamaecyparis obtusa* Endlicher): *P. boehmeriae*, *P. cinnamomi*, *P. drechsleri* và *P. erythroseptica* với hiệu lực ức chế lần lượt là 54,6%, 62,6%, 74,3% và 73,7%. Theo C.A. Moreno-Velandia et al (2021), *B. velezensis* Bs006 đã bảo vệ cây khỏi *F. oxysporum* f. sp. *Physali* (gây bệnh héo trên quả *Physalis peruviana*) từ 37 đến 53%. Nghiên cứu của Lê Vũ Khánh Trang và cs (2021), *B. velezensis* có khả năng đối kháng với nấm bệnh *Phytophthora* sp. (gây bệnh sương mai cà chua) qua hiệu lực ức chế nấm là 84,44% và

80% sau 5 ngày. Chủng *B. velezensis* SDTB038 có tác dụng phòng trừ tốt bệnh thối rễ và ngọn *Fusarium* trên cây cà chua đạt 42,98% (Q. Chen et al,2022). Công bố của Lan C. et al (2022), *B. velezensis* FJ17-4 ức chế sự phát triển sợi nấm của *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* với tỷ lệ ức chế 42,35% và kiểm soát bệnh héo *Fusarium* dưa chuột trong chậu trong nhà kính khoảng 72,14%. *B. velezensis* QH03-23 và *B. velezensis* JS39D thấy tỷ lệ ức chế sợi nấm là 28,17% và 33,33% đối với chủng *F. solani* (T.B. Wekesa et al, 2022). *B. velezensis* FB2 có tác dụng ức chế sinh trưởng đối với *F. solani* (gây bệnh thối thân ở chanh dây *Passiflora edulis*) với IC_{50} là 5,58 μ g/mL, cao hơn so với thuốc diệt nấm hóa học thiram (41,24 μ g/mL) và hymexazol (343,31 μ g/mL). Hơn nữa, chủng FB2 được quan sát thấy có hoạt tính kháng nấm in vitro; ức chế tăng trưởng 41,64, 40,38 và 26% đối với các mầm bệnh nấm chính tương ứng là *Alternaria alternata*, *F. oxysporum* và *F. solani*

(M. Hammad et al, 2023). Ghi nhận của L. Sun et al (2023), *B. velezensis* BVE7 ức chế sự nảy mầm của *F. oxysporum* (gây bệnh thối rễ đậu tương) là 61,11% và gây ra dị tật sợi nấm 85,42%. Trong nghiên cứu này, chủng *B. velezensis* EB.KN15

được phân lập nội sinh từ cây sầu riêng với hoạt tính kháng *P. palmivora* khá cao 78,11%. Như vậy, nghiên cứu là minh chứng cho hướng sản xuất chế phẩm sinh học bản địa từ vi khuẩn nội sinh nhằm canh tác hiệu quả và bền vững.



Hình 3. *B. velezensis* EB.KN15 kháng *Phytophthora palmivora*

Ghi chú: Trong đó: A: Kiểm tra khả năng kháng. B: Đối chứng

Bảng 4. Mật độ nhân nuôi *B. velezensis* EB.KN15

Thời gian nuôi cấy	Mật độ trung bình của chủng EB.KN15 (CFU/ml)
2h	$4,10 \times 10^7$
4h	$5,18 \times 10^8$
6h	$7,32 \times 10^9$
8h	$5,25 \times 10^{10}$
10h	$2,11 \times 10^{11}$
12h	$1,44 \times 10^{11}$

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được các thông số cho quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *B. velezensis* EB.KN15 thích hợp trong bình tam giác là: 1,05% bã men bia; 0,45% LB; 30°C; pH=7; lắc 200 rpm

trong 48 giờ. Sản xuất sinh khối *B. velezensis* EB.KN15 trong quy mô pilot (Bioreactor 14L) với mật độ vi khuẩn đạt tối ưu $2,11 \times 10^{11}$ CFU/ml trong thời gian 10 giờ. Chủng *B. velezensis* EB.KN15 có khả năng kháng nấm bệnh *P. palmivora* cao với hiệu lực đối kháng: 78,11%. Nghiên cứu đã mở rộng hướng ứng dụng *B. velezensis* EB.KN15 trong phát triển chế phẩm sinh học kiểm soát sinh học với bệnh vàng lá thối rễ cây sầu riêng.

Lời cảm ơn

Ngô Văn Anh được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số: VINIF.2023.TS.02.

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ Bộ KH&CN Việt Nam mã số đề tài: B2023-TTN-02.

STUDY ON THE APPLICATION OF BREWER'S YEAST WASTE AS A C/N SOURCE FOR CULTURING THE *Bacillus velezensis* EB.KN15 BACTERIA AGAINST *Phytophthora palmivora* FUNGUS

Ngo Van Anh¹, Tran Thi Ha Trang¹, Nguyen Van Bon¹, Nguyen Anh Dung¹

Received Date: 31/5/2024; Revised Date: 31/7/2024; Accepted for Publication: 01/8/2024

ABSTRACT

Beer production by-products (BMB) are reported to be a rich source of nutritional substrates including protein (22.18%), ash (10.1%), carbohydrates (1.98%), sugars, and mineral elements cornucopia. *Bacillus velezensis* is a safe bacterium with many valuable properties beneficial to plants. Therefore, *B. velezensis* preparations have been widely investigated and developed in the prevention and biological control of plants. In this study, BMB was utilized as the major substrate for the strain EB.KN15 fermentation. The experimental results showed that strain EB.KN15 grew best in a culture medium containing 1.05% BMB, 0.45% LB at 30°C, pH=7, 200 rpm for 48 hours, and its density reached 8.23×10^9 CFU/ml (conical flask conditions). Production of *B. velezensis* EB.KN15 in a Bioreactor system resulting higher biomass density of 2.11×10^{11} CFU/ml in a short cultivation time (10 hours). Antifungal activity of strain EB.KN15 biomass after fermentation in the bioreactor system was evaluated, and recorded good activity against *Phytophthora palmivora* with the inhibition value of 78.11%. The research results demonstrated the potential use of beer production by-products in developing *B. velezensis* EB.KN15 product as well as opening up application directions for developing indigenous biological products from endogenous bacteria for cultivation and sustainable production of durian trees.

Keywords: *Bacillus velezensis*, Bioreactor, beer production by-product, *Phytophthora palmivora*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu trong nước

- Lê Vũ Khánh Trang, Lê Thị Mai, Võ Lương Ý Nhi, Huỳnh Thị Ngọc Lan (2021). Đánh giá hiệu lực ức chế của vi khuẩn *Bacillus velezensis* đối với nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh sương mai trên cây cà chua, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 01, Trang 122.
- Ngô Văn Anh, Trần Thị Hà Trang, Vũ Thị Thu Lê, Nguyễn Văn Bốn, Nguyễn Anh Dũng (2024). Tuyển chọn và nhân nuôi vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng kháng nấm *Phytophthora palmivora* tại huyện Cư Kuin tỉnh Đắk Lắk, *TNU Journal of Science and Technology*, 229(09): 430 - 437.
- Nguyễn Lâm Dũng (2000). Vi sinh vật học. NXB Giáo dục.
- Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Xuân Cảnh, Phùng Thị Lệ Quyên (2019). Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy in vitro tới khả năng kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của chủng *Bacillus velezensis* YMĐ1, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam/chuyên san Khoa học Nông nghiệp*, Tập 61, Số 2.
- Nguyễn Văn Khanh, Nguyễn Quang Linh, Nguyễn Thị Bích Phượng, Nguyễn Văn Huệ, Nguyễn Thị Thanh Xuân, Võ Phước Khánh, Trần Quốc Dung (2020). Ảnh hưởng của môi trường, tỷ lệ tiếp giống và tốc độ lắc đến sự sinh trưởng của chủng *E. coli* M15 mang plasmid tái tổ hợp pQE30/PirA, *Hội nghị CNSHTQ 2020/Công nghệ Gen*, pp. 86-92.
- Trần Thị Hồng Châu (2020). Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh alpha-amylase chịu nhiệt của chủng *Bacillus* spp., *Tạp chí Công Thương*, Số 21, tháng 8 năm 2020.
- Trần Thị Hà Trang, Ngô Văn Anh, Nguyễn Văn Bốn, Nguyễn Anh Dũng (2022). Nghiên cứu điều kiện nhân nuôi vi khuẩn *Bacillus velezensis* KN12 từ bột cá lên men và mật rỉ đường, *Tạp chí khoa học Đại học Tây Nguyên*, Tập 16, Số 54, <https://doi.org/10.5281/zenodo.6948352>.

Tài liệu ngoài nước

- Bekatorou, A., Plessas, S., and Mantzourani, I. (2015). Biotechnological exploitation of brewery solid wastes for recovery or production of value - added products. In V. R. Rai (Ed.). *Advances in Food*

¹Institute of Biotechnology & Environment, Tay Nguyen University;

Corresponding author: Ngo Van Anh; Tel: 0374559085; Email: nvanh@ttn.edu.vn.

- Biotechnology*, Vol. 24, pp. 393 – 414, <https://doi.org/10.1002/9781118864463.ch24>.
- Carlos Andrés Moreno-Velandia, Marc Ongena, and Alba Marina Cotes. (2021). Effects of Fengycins and Iturins on *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* and Root Colonization by *Bacillus velezensis* Bs006 Protect Golden Berry Against Vascular Wilt, *Biological Control and Microbial Ecology*, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-21-0001-R>.
- Chien-Chih Kuo, Yi-Chiao Huang and Wen-Ling Deng (2023). Evaluating the Efficacy of the Fermentation Formula of *Bacillus velezensis* Strain Tcb43 in Controlling Cucumber Powdery Mildew, *Agriculture* 2023, Vol. 13, no. 8, pp. 1558, <https://doi.org/10.3390/agriculture13081558>.
- Ejiofor A.O. (1991). Production of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 as bioinsecticide using a mixture of “spent” brewer’s yeast and waste cassava starch as the fermentation medium, *Discov. Innov.* Vol. 3, no. 2, pp. 85–88.
- Giroto F., Kusch S., Lavagnolo M.C. (2019). Biological metabolites recovery from beverage production solid residues through acidogenic fermentation, *Detritus*. Vol. 5, pp. 19–28. doi: 10.31025/2611-4135/2019.13770.
- Inés Martínez-Raudales, Yumiko De La Cruz-Rodríguez, Alejandro Alvarado-Gutiérrez, Julio Vega-Arreguín, Ahuítz Fraire-Mayorga, Miguel Alvarado-Rodríguez, Víctor Balderas-Hernández & Saúl Fraire-Velázquez. (2017). Draft genome sequence of *Bacillus velezensis* 2A-2B strain: a rhizospheric inhabitant of *Sporobolus airoides* (Torr.) Torr., with antifungal activity against root rot causing phytopathogens, *Case Reports, Stand Genomic Sci*, Vol. 12, no. 73, doi: 10.1186/s40793-017-0289-4.
- Jae-Hyun Moon, Sang-Jae Won, Chaw Ei Htwe Maung, Jae-Hyeok Choi, Su-In Choi, Henry B. Ajuna and Young Sang Ahn. (2021). *Bacillus velezensis* CE 100 Inhibits Root Rot Diseases (Phytophthora spp.) and Promotes Growth of Japanese Cypress (*Chamaecyparis obtusa* Endlicher) Seedlings, *Microorganisms*, Vol. 9, no. 4, pp. 821, doi: 10.3390/microorganisms9040821.
- Lan Chengzhong, Lin Xiong, Gan Lin, Dai Yuli, Liu Xiaofei, Yang Xiujuan, Jiang Junxi. (2022). Optimization of *Bacillus velezensis* FJ17-4 Fermentation, *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 37, no. 10, pp. 1335–1343, doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2022.010.013.
- Lei Sun, Wei Wang, Xue Zhang, Zhongchao Gao, Shanshan Cai, Shuang Wang, Yonggang Li. (2023). *Bacillus velezensis* BVE7 as a promising agent for biocontrol of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum*, *Front Microbiol.* Vol. 20, no. 14, pp. 1275986. doi: 10.3389/fmicb.2023.1275986. eCollection 2023.
- Mai Thanh Luan, Nguyen Thi Mai, Le Thi Phuong (2022). Isolation, identification and optimization of mass production of *Bacillus velezensis*, *Hong Duc University Journal of Science*, E7, vol.12, p.(48 - 56).
- Masooma Hammad, Hazrat Ali, Noor Hassan, Abdul Tawab, Mahwish Salman, Iqra Jawad, Anne de Jong, Claudia Munoz Moreno, Oscar P. Kuipers, Yusra Feroz, Muhammad Hamid Rashid (2023). Food safety and biological control; genomic insights and antimicrobial potential of *Bacillus velezensis* FB2 against agricultural fungal pathogens, *Plos One*, Vol. 18, no. 11, pp. e0291975, doi: 10.1371/journal.pone.0291975.
- Mengtao Li, Hao Tang, Zongyan Li, Yu Song, Lin Chen, Chao Ran, Yun Jiang and Changqing Chen (2023). Optimization of the Production and Characterization of an Antifungal Protein by *Bacillus velezensis* Strain NT35 and Its Antifungal Activity against *Ilyonectria robusta* Causing Ginseng Rusty Root Rot, *Fermentation* 2023, Vol. 9, no. 4, pp. 358, <https://doi.org/10.3390/fermentation9040358>.
- Mohammad Sayyar Khan, Junlian Gao, Xuqing Chen, Mingfang Zhang, Fengping Yang, Yunfeng Du, The Su Moe, Iqbal Munir, Jing Xue and Xiuhai Zhang (2020). The Endophytic Bacteria *Bacillus velezensis* Lle-9, Isolated from *Lilium leucanthum*, Harbors Antifungal Activity and Plant Growth-Promoting Effects, *J Microbiol Biotechnol*, pp. 668-680. doi: 10.4014/jmb.1910.10021.
- Muhammad Fazle Rabbee, Md. Sarafat Ali, Jinhee Choi, Buyng Su Hwang, Sang Chul Jeong, and Kwang-hyun Baek. (2019). *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes, *Molecules*, Vol. 24, no 6, pp. 1046, doi: 10.3390/molecules24061046.

- Narayanaswamy, S. (1994). Plant cell and tissue culture, Tata McGraw-Hill Education.
- Pathania S., Sharma S., Kumari K. (2018), Solid state fermentation of BSG for citric acid production, *Indian J. Nat. Prod. Resour*, Vol. 9, pp. 70–74.
- Phuong Ha Hoang, Minh Thi Nguyen, Nhat Huy Chu, Huong Giang Bui (2023). The growth and probiotic characteristics of *Bacillus velezensis* BS in soybean meal used as synbiotic-like preparations for *Litopenaeus vannamei* culture, *Vietnam Journal of Biotechnology*, Vol. 21, no. 1, <https://doi.org/10.15625/1811-4989/18102>.
- Puligundla, P., Mok, C. (2021). Recent advances in biotechnological valorization of brewers' spent grain, *Food Sci. Biotechnol.* Vol. 30, no. 3, pp.341–353. doi: 10.1007/s10068-021-00900-4.
- Qiqi Chen, Yue Qiu, Yazhen Yuan, Kaiyun Wang, Hongyan Wang (2022). Biocontrol activity and action mechanism of *Bacillus velezensis* strain SDTB038 against Fusarium crown and root rot of tomato, *Front. Microbiol/ Sec. Microbe and Virus Interactions with Plants*, Vol. 13, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.994716>.
- Sourav Chattaraj, Debasis Mitra, Arindam Ganguly, Hrudayanath Thatoi and Pradeep K. Das Mohapatra (2024). A critical review on the biotechnological potential of Brewers' waste: Challenges and future alternatives, *Curr Res Microb Sci*, Vol. 6, pp. 100228. doi: 10.1016/j.crmicr.2024.100228.
- Thi Hanh Nguyen, San-Lang Wang, Tu Quy Phan, Thi Huyen Nguyen, Thi Ha Trang Tran, Manh Dung Doan, Van Anh Ngo, Anh Dzung Nguyen & Van Bon Nguyen (2024). New record of reusing brewing by-product for biosynthesis of prodigiosin and its novel anti-pathogen fungi via in vitro tests and molecular docking study, *Research on Chemical Intermediates*, Vol. 50, pp. 925–949. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11164-023-05207-z>.
- Tofick B. Wekesa, Vitalis W. Wekesa, Justus M. Onguso, Eliud N. Wafula and Ndinda Kavesu (2022). Isolation and Characterization of *Bacillus velezensis* from Lake Bogoria as a Potential Biocontrol of *Fusarium solani* in *Phaseolus vulgaris* L, *Bacteria 2022*, Vol. 1, no. 4, pp. 279-293, <https://doi.org/10.3390/bacteria1040021>.
- Tran Thi Thu Lan, Nguyen Van Cach, Le Thi Huong, Tran Thi Hong Huong (2016). Study on the growth of *Bacillus velezensis* M2 and applying it for treatment of the cattle slaughterhouse wastewater, *Journal of Science and Technology*, Vol. 54, pp. 213-220.
- Van Anh Ngo, San-Lang Wang, Van Bon Nguyen, Chien Thang Doan, Thi Ngoc Tran, Dinh Minh Tran, Trung Dzung Tran and Anh Dzung Nguyen (2020). *Phytophthora* Antagonism of Endophytic Bacteria Isolated from Roots of Black Pepper (*Piper nigrum* L.), *Agronomy 2020*, 10, 286; doi:10.3390/agronomy10020286.
- Wenjian Luo, Lidong Liu, Gaofu Qi, Fan Yang, Xuanjie Shi, Xiuyun Zhao (2019). Embedding *Bacillus velezensis* NH-1 in Microcapsules for Biocontrol of Cucumber *Fusarium Wilt*, Vol. 85, no. 9, pp. e03128-18. doi: 10.1128/AEM.03128-18.
- Zhiyun Liu, Xiaofeng Guan, Xiaoxia Zhong, Xiaorong Zhou, Feiyun Yang (2021). *Bacillus velezensis* DP-2 isolated from Douchi and its application in soybean meal fermentation, pp. 1861-1868, doi: 10.1002/jsfa.10801.
- Ziv, M. (2000). Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticult Rev* 24: 1-30.