

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

TRẦN HÀ NINH

**NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG NƯỚC THẢI CHẾ BIẾN TINH BỘT
SẴN ĐỂ NUÔI CẤY *Bacillus thuringiensis***

LUẬN ÁN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2010

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

Trần Hà Ninh

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG NƯỚC THẢI CHẾ BIẾN TINH BỘT
SẴN ĐỂ NUÔI CẤY *Bacillus thuringiensis*

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 60 42 40

LUẬN ÁN THẠC SỸ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. TĂNG THỊ CHÍNH – VIỆN CÔNG NGHỆ MÔI TRƯỜNG-
VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Hà Nội – 2010

MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	1
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	4
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	5
DANH MỤC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ	6
MỞ ĐẦU	8
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	10
1.1. Tổng quan về <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
1.1.1 Giới thiệu về vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
1.1.2. Độc tố delta-endotoxin của <i>Bacillus thuringiensis</i> và cơ chế tác động của chúng.....	11
1.1.3. Khái quát về thuốc trừ sâu sinh học.....	16
1.1.4. Nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng Bt ở Việt Nam	20
1.2. Tổng quan về tình hình sản xuất và tiêu thụ tinh bột sắn	24
1.2.1. Thông tin chung về tình hình canh tác và tiêu thụ sắn	24
1.2.3. Công nghệ sản xuất tinh bột sắn	31
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	36
2.1. Vật liệu	37
2.1.1. Chủng giống vi sinh vật sử dụng	37
2.1.2. Nước thải sản xuất tinh bột sắn.....	37
2.1.3. Thiết Bị.....	37
2.1.4. Môi trường tổng hợp TSB.....	37
2.2. Phương pháp.....	38
2.2.1. Phương pháp xác định mật độ tế bào, mật độ bào tử	38
2.2.2. Phương pháp xác định các thông số trong nước thải	38

2.2.3. Phương pháp khử xyanua (CN ⁻) có trong nước thải sản xuất tinh bột sắn.....	38
2.2.4. Phương pháp xác định nồng độ delta-endotoxin trong dịch nuôi cấy ..	38
2.2.5. Đánh giá khả năng phát triển của Bt trên môi trường nước thải chế biến tinh bột đã qua tiền xử lý.....	40
2.2.6. Nghiên cứu tiền xử lý nước thải chế biến tinh bột sắn	40
2.2.7. Đánh giá ảnh hưởng pH lên khả năng sinh trưởng của Bt.....	41
2.2.9. Nghiên cứu ảnh hưởng điều kiện cấp khí của quá trình lên men trong hệ thống lên men quy mô phòng thí nghiệm (thể tích 5L) trên nước thải tinh bột lên sự sinh trưởng và phát triển của Bt	42
2.2.10. Đánh giá biến động của pH trong quá trình lên men, so sánh quá trình lên men có khống chế ổn định pH và không ổn định pH.....	42
2.2.11. Lên men Bt trong hệ lên men quy mô phòng thí nghiệm, đánh giá hiệu quả giệt sâu của sản phẩm lên men và so sánh với chế phẩm thương mại hiện có trên thị trường.....	43
2.2.12. Phương pháp thử nghiệm sinh học.....	43
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	44
3.1. Khảo sát tính chất của nước thải sản xuất tinh bột sắn	44
3.2. Thử nghiệm khả năng phát triển của Bt trên nước thải tinh bột sắn.....	47
3.3. Nghiên cứu tiền xử lý nước thải tinh bột sắn để sử dụng nuôi cấy vi sinh vật.	48
3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường lên khả năng sinh trưởng và tạo tinh thể độc của chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> trên nước thải tinh bột sắn.	53
3.5.1. Ảnh hưởng của pH lên khả năng sinh trưởng và tạo tinh thể độc của chủng <i>Bacillus thuringiensis</i>	53

3.5.2. Ảnh hưởng của độ thoáng khí lên khả năng sinh trưởng và tạo tinh thể độc của chủng <i>Bacillus thuringiensis</i>	58
3.6. Nghiên cứu ảnh hưởng điều kiện cấp khí của quá trình lên men trong hệ thống lên men quy mô phòng thí nghiệm (thể tích 5L) trên nước thải tinh bột lên sục sinh trưởng và phát triển của Bt	62
3.6.1. Ảnh hưởng tốc độ khuấy lên sự sinh trưởng và phát triển của Bt	62
3.6.2. Ảnh hưởng tốc độ thổi khí lên sự sinh trưởng và phát triển của Bt.....	66
3.7. Đánh giá biến động của pH trong quá trình lên men, so sánh quá trình lên men có khống chế ổn định pH và không khống chế ổn định pH.....	69
3.8. Nghiên cứu lên men thu nhận thuốc trừ sâu sinh học trong hệ lên men ở quy mô phòng thí nghiệm (5L)	74
3.9. Thử nghiệm so sánh khả năng diệt sâu của dịch lên men Bt từ nước thải chế biến tinh bột với chế phẩm thương mại hiện có trên thị trường.....	76
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	79
A. KẾT LUẬN	79
B. KIẾN NGHỊ.....	80

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu, chữ viết tắt	Giải thích, ý nghĩa
WHO	Tổ chức Y tế Thế giới
FAO	Tổ chức Lương thực Thế giới
UNEP	Chương trình môi trường Thế giới
BVTV	Bảo vệ thực vật
CNSH	Công nghệ sinh học
TCN	Trước Công nguyên
TSB	Trypton soya Broth
TSA	Trypton soya Agar
T-N	Tổng nitơ
T-P	Tổng photpho
COD	Nhu cầu oxy hóa hóa
BOD ₅	Nhu cầu oxy sinh học
vvm	Thể tích khí/thể tích môi trường/phút
rpm	Vòng/phút
cfu	Đơn vị hình thành khuẩn lạc (colony-forming unit)

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Tình hình sản xuất và sử dụng sản ở năm 1993 và dự kiến đến năm 2020	25
Bảng 1.2. Một số thành phần dinh dưỡng có trong củ sản	26
Bảng 1.3. Tính chất hóa lý của nước thải sản xuất tinh bột sản	34
Bảng 3.1. Kết quả phân tích chất lượng nước thải sản xuất tinh bột tại xưởng sản xuất tinh bột Tiên Sơn – Bắc Ninh	44
Bảng 3.2. Thử nghiệm khả năng phát triển của Bt trên nước thải sản xuất tinh bột sản	47
Bảng 3.3. Mật độ tổng số Bt sau 24 nuôi lắc	48
Bảng 3.4. Khả năng phát triển của Bt trên môi trường nước thải chế biến tinh bột sản	49
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của pH lên quá trình sinh trưởng Bt	54
Bảng 3.6. ảnh hưởng của độ thoáng khí lên khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i>	58
Bảng 3.7. Kết quả phân tích mật độ tổng số, bào tử và hàm lượng độc tố delta-endotoxin ở các tốc độ khuấy khác nhau	63
Bảng 3.8. Sinh trưởng và sinh độc tố của chủng Bt trong các điều kiện thời khí khác nhau khi lên men trên nước thải tinh bột sản	66
Bảng 3.9. Các thông số môi trường được thống kê trong suốt quá trình lên men.....	69
Bảng 3.10. Ảnh hưởng độ biến động pH lên khả năng sinh trưởng và sinh độc tố của Bt khi nuôi trên môi trường nước thải tinh bột sản đã qua tiền xử lý.....	72

Bảng 3.11. Động thái của Bt khi nuôi cấy trong hệ lên men quy mô phòng thí nghiệm trên môi trường nước thải tinh bột sắn..... 74

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của lượng dịch nuôi cấy vi khuẩn Bt lên khả năng diệt sâu so sánh với chế phẩm trừ sâu sinh học V-BT 77

DANH MỤC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Hình dạng Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* 10

Hình 1.2. Sâu bị chết khi ăn phải lá nhiễm Bt 13

Hình 1.3. Tinh thể độc của Bt dưới kính hiển vi điện tử 14

Hình 1.4. Chuyển gen sinh độc tố của Bt vào ngô..... 15

Hình 1.5. Cây sắn và củ sắn sau khi thu hoạch..... 24

Hình 1.6. Sản lượng tinh bột sắn của một số nước (x1000 tấn) 30

Hình 1.7. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất tinh bột sắn 33
ở quy mô công nghiệp (Thái Lan)..... 33

Hình 1.8. Quy trình công nghệ xử lý nước thải chế biến tinh bột sắn 35

Hình 2. Đường chuẩn protein để xác định delta-endotoxin 39

Hình 3.1. Sinh trưởng của Bt trên môi trường cơ bản TSB 51

Hình 3.3. Sinh trưởng của Bt trên môi trường 50% nước thải tinh bột sắn.... 52

Hình 3.4. Sinh trưởng của Bt trên môi trường 100% nước thải tinh bột sắn.. 53

Hình 3.5. Sinh trưởng và sinh độc tố của Bt trên nước thải tinh bột sắn có pH 5 .. 55

Hình 3.6. Sinh trưởng và sinh độc tố của Bt trên nước thải tinh bột sắn có pH6
..... 55

Hình 3.7. Sinh trưởng và sinh độc tố của Bt trên nước thải tinh bột có pH7..... 56

Hình 3.8. Sinh trưởng và sinh độc tố của Bt trên nước thải tinh bột có pH8..... 57

Hình 3.9. Biểu đồ mật độ tổng số trong thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của độ thoáng khí..... 59

Hình 3.10. Biểu đồ mật độ bào tử thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của độ thoáng khí.....	60
Hình 3.11. Biểu đồ hàm lượng độc tố delta-endotoxin thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của độ thoáng khí.....	61
Hình 3.12. DO trong hệ lên men ở các tốc độ khuấy khác nhau.....	62
Hình 3.13. Sinh trưởng và sinh độc tố delta-endotoxin của Bt trong hệ lên men với tốc độ khuấy 350 rpm.....	64
Hình 3.14. Sinh trưởng và sinh độc tố delta-endotoxin của Bt trong hệ lên men với tốc độ khuấy 450 rpm.....	65
Hình 3.15. Sinh trưởng và sinh độc tố delta-endotoxin của Bt trong hệ lên men với tốc độ khuấy 550 rpm.....	65
Hình 3.16. DO trong hệ lên men ở các tốc độ thổi khí khác nhau.....	66
Hình 3.17. Sinh trưởng và sinh độc tố của Bt khi nuôi trên môi trường nước thải tinh bột sắn ở điều kiện thổi khí 0,2vvm.....	67
Hình 3.18. Sinh trưởng và sinh độc tố của Bt khi nuôi trên môi trường nước thải tinh bột sắn ở điều kiện thổi khí 0,5vvm.....	68
Hình 3.19. Sinh trưởng và sinh độc tố của Bt khi nuôi trên môi trường nước thải tinh bột sắn ở điều kiện thổi khí 1,0vvm.....	68
Hình 3.20. Biến độ pH trong quá trình lên men trong môi trường nước thải tinh bột.....	71
Hình 3.21. Sinh trưởng và phát triển của Bt trên môi trường không điều chỉnh pH.....	72
Hình 3.22. Ảnh hưởng của sự ổn định pH đến khả năng sinh trưởng và phát triển của Bt trên môi trường nước thải tinh bột sắn.....	73
Hình 3.23. Khả năng sinh trưởng và sinh độc tính của chủng vi khuẩn Bt trong suốt quá trình lên men.....	76

Hình 3.24. Ảnh hưởng của lượng dịch nuôi cấy vi khuẩn Bt lên khả năng diệt sâu so sánh với chế phẩm trừ sâu sinh học V-BT 78

MỞ ĐẦU

Nhu cầu về tinh bột sắn ngày càng tăng trong những năm trở lại đây do những ứng dụng rộng rãi của chúng trong công nghiệp cũng như đời sống con người. Điều này dẫn đến sự gia tăng nhanh chóng của nhà máy chế biến tinh bột sắn cả về quy mô lẫn số lượng. Tuy nhiên, bên cạnh những lợi ích mà chúng đem lại, chúng ta cũng không thể làm ngơ về một thực trạng môi trường đáng báo động do chất thải mà đặc biệt là nước thải tạo ra trong quá trình chế biến tinh bột đang hàng ngày hàng giờ đầu độc môi trường. Tình trạng này do trong nước thải chế biến tinh bột có hàm lượng ô nhiễm hữu cơ quá cao, do đó chúng phải được xử lý trước khi thải ra môi trường hoặc tái sử dụng để sản xuất những sản phẩm có ích nhằm giảm thiểu lượng nước thải ra môi trường.

Sản phẩm thương mại từ *Bacillus thuringiensis* đã và đang được sử dụng trong việc bảo vệ rừng và nông nghiệp, tuy nhiên, việc ứng dụng rộng rãi các sản phẩm này đang gặp trở ngại do giá thành sản xuất còn cao. Do đó, với mong muốn tìm ra một giải pháp nhằm tái sử dụng có hiệu quả nước thải chế biến tinh bột sắn – ô nhiễm nhưng cũng rất giàu dinh dưỡng cho vi sinh vật, đồng thời tìm ra một nguồn nguyên liệu rẻ tiền, sẵn có để sản xuất các sản phẩm thuốc trừ sâu có nguồn gốc từ *Bacillus thuringiensis*, chúng tôi thực hiện đề tài: “Nghiên cứu sử dụng nước thải chế biến tinh bột sắn để nuôi cấy *Bacillus thuringiensis*”. Đề tài bao gồm những nội dung sau: