

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

***** 380 *****



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT MẬT ĐỘ VI KHUẨN CỐ ĐỊNH
ĐẠM VÀ HÀM LƯỢNG TINH DẦU CỦA RỄ CỎ
VETIVER (*Vetiverria zizanioides* L.)**

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2003 - 2007

Sinh viên thực hiện: LÊ MINH ĐỨC

Thành phố Hồ Chí Minh
8/2007

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

***** 380 *****

**BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT MẬT ĐỘ VI KHUẨN CỐ ĐỊNH
ĐẠM VÀ HÀM LƯỢNG TINH DẦU CỦA RỄ CỎ
VETIVER (*Vetiverria zizanioides* L.)**

LUẬN VĂN KỸ SƯ

Giáo viên hướng dẫn:

PGS.TS. BÙI XUÂN AN

KS. DƯƠNG THÀNH LAM

Sinh viên thực hiện:

LÊ MINH ĐỨC

Khóa: 2003 - 2007

**Thành Phố Hồ Chí Minh
8/2007**

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

**THE FIRSTSTEP RESEARCH DENSITY OF
NITROGEN – FIXING BACTERIA AND
THE ESSENTIAL OIL CONTENT
OF VETIVER’S ROOTS
(*Vetiverria zizanioides* L.)**

Graduation thesis

Major: Biotechnology

Advisor:

Dr. BUI XUAN AN

BSc. DUONG THANH LAM

Student:

LE MINH DUC

Term: 2003 - 2007

HCMC. 8/2007

LỜI CẢM TẠ

Với lòng biết ơn sâu sắc

Tôi xin gửi lời cảm ơn Ban Giám hiệu trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, Ban chủ nhiệm Bộ Môn Công nghệ sinh học, cùng tất cả quý thầy cô đã truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt quá trình học tại trường.

Đặc biệt tôi xin chân thành cảm ơn thầy: PGS.TS BÙI XUÂN AN, KS. DƯƠNG THÀNH LAM, đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi hoàn thành khóa luận tốt nghiệp này.

Chân thành cảm ơn sâu sắc đến TS. Phạm Như Liên Giám đốc sản xuất công ty CP Y - Dược phẩm Vimedimex, công ty TNHH Công nghệ hóa học đã giúp đỡ tôi hoàn thành khóa luận tốt nghiệp.

Cảm ơn các thầy cô, anh chị tại Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao KHCN đã nhiệt tình hướng dẫn tôi thực hiện khóa luận tốt nghiệp.

Xin gửi lời cảm ơn đến bạn bè cũng như tập thể lớp Công nghệ sinh học 29 đã động viên giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học.

Vô cùng biết ơn gia đình đã nuôi dạy, yêu thương và động viên con trong suốt bốn năm qua.

TP. Hồ Chí Minh, tháng 08 năm 2007

TÓM TẮT KHÓA LUẬN

Lê Minh Đức, Đại học Nông Lâm Tp.Hồ Chí Minh. Tháng 08/2007
“BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT MẬT ĐỘ VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM VÀ HÀM LƯỢNG TINH DẦU CỦA RỄ CỎ VETIVER (*Vetiveria zizanioides* L.)”.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm gồm 3 phần

- ❖Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nước rỉ rác đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cỏ Vetiver.
 - Gồm có 3NT trồng cỏ Vetiver trong nước rỉ rác với 3 nồng độ pha loãng khác nhau: 80%, 60% và 40%.
- ❖Thí nghiệm 2: Khảo sát mật độ vi khuẩn cố định đạm từ các nốt sần trên bề mặt rễ cỏ Vetiver của thí nghiệm 1 và rễ trong các mô hình trồng cỏ.
- ❖Thí nghiệm 3: Khảo sát và so sánh quy trình công nghệ chiết xuất tinh dầu từ rễ cỏ Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.).

Địa điểm thực hiện thí nghiệm: Trung tâm nghiên cứu và Chuyển giao KHCN, ĐH Nông Lâm, Tp.HCM; Công ty TNHH Công nghệ hóa học, Tân Sơn Nhì, Tân Phú, Tp.HCM.

Thời gian tiến hành: 03/06/2007 - 17/08/2007.

Mẫu nước thải được lấy từ bãi chôn lấp rác Gò Cát, Tp.HCM

Những kết quả thu được:

- Mùi hôi thối và chất lượng của nước thải được cải thiện.
- Cỏ chỉ sinh trưởng được ở nồng độ pha loãng 80%.
- Không có sự xuất hiện của nốt sần trên rễ cỏ.
- Hàm lượng tinh dầu thu được từ rễ cỏ Vetiver: 0,04%.
- Sự khác nhau giữa các phương pháp chiết xuất tinh dầu.

MỤC LỤC

NỘI DUNG	TRANG
LỜI CẢM TẠ	iv
TÓM TẮT KHÓA LUẬN	v
MỤC LỤC	vi
DANH SÁCH CÁC BẢNG	ix
DANH SÁCH CÁC HÌNH	x
DANH MỤC VIẾT TẮT	xi
Chương 1. MỞ ĐẦU	1
1.1 ĐẶT VẤN ĐỀ	1
1.2 MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI	2
1.3 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	2
1.4 GIỚI HẠN PHẠM VI NGHIÊN CỨU	3
1.5 Ý NGHĨA KHOA HỌC	3
1.6 Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU	3
Chương 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
2.1 CỎ VETIVER	4
2.1.1 Nguồn gốc	4
2.1.2 Phân loại	5
2.1.3 Đặc tính nông học	6
2.1.4 Đặc tính sinh thái	7
2.1.5 Vi sinh vật trên hệ rễ	9
2.1.6 Lợi ích từ cỏ Vetiver	10
2.1.7 Khả năng cố định nitơ ở một số loài thực vật	12
2.2 VI KHUẨN AZOTOBACTE	14
2.2.1 Phân loại	14
2.2.2 Đặc điểm sinh học	14
2.2.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến vi khuẩn <i>Azotobacter</i>	18

2.2.4 Tác dụng của vi khuẩn <i>Azotobacter</i>	24
2.3 VI KHUẨN BEIJERINCKIA	25
2.3.1 Phân loại.....	25
2.3.2 Đặc điểm sinh học	27
2.4 NƯỚC RỈ RÁC	28
2.4.1 Nguồn gốc	28
2.4.2 Đặc điểm	29
2.4.3 Bãi chôn lấp Gò Cát	31
2.5 TINH DẦU TỪ CỎ VETIVER.....	33
2.5.1 Bản chất của tinh dầu	33
2.5.2 Các hợp phần của tinh dầu.....	34
2.5.3 Tinh dầu trong vật liệu thực vật	34
2.5.4 Các phương pháp lấy tinh dầu	35
2.5.4.1 Phương pháp ép vật liệu thực vật	35
2.5.4.2 Dùng một lồng hay rần để trích ly tinh dầu.....	35
2.5.4.3 Phương pháp cất bằng hơi nước.....	36
2.5.5 Tinh dầu cỏ Vetiver.....	37
2.5.6 Tác dụng của tinh dầu từ cỏ Vetiver.....	38
2.5.7 Nhu cầu về tinh dầu hương liệu.....	39
2.6 CÁC NGHIÊN CỨU KHOA HỌC LIÊN QUAN	40
2.6.1 Các nghiên cứu trong nước	40
2.6.2 Các nghiên cứu trên thế giới	40
Chương 3. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	42
3.1 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM THÍ NGHIỆM.....	42
3.2 BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM	42
3.2.1 Thí nghiệm 1	42
3.2.2 Thí nghiệm 2	43
3.2.3 Thí nghiệm 3	43
3.3 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	43

3.3.1 Thí nghiệm 1	43
3.3.1.1 Giai đoạn tiền thí nghiệm.....	43
3.3.1.2 Giai đoạn thí nghiệm.....	44
3.3.2 Thí nghiệm 2	45
3.3.2.1 Mẫu	45
3.3.2.2 Điều kiện nuôi cấy.....	45
3.3.2.3 Môi trường nuôi cấy.....	46
3.3.2.4 Quy trình nuôi cấy.....	46
3.3.3 Thí nghiệm 3	48
3.4 VẬT LIỆU.....	50
3.5 THIẾT BỊ PHÒNG THÍ NGHIỆM	50
3.6 PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU	50
Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	51
4.1 THÍ NGHIỆM 1	51
4.2 THÍ NGHIỆM 2	54
4.3 THÍ NGHIỆM 3	56
Chương 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	60
5.1 KẾT LUẬN	60
5.2 ĐỀ NGHỊ.....	60
TÀI LIỆU THAM KHẢO	62

DANH SÁCH CÁC BẢNG

BẢNG	TRANG
Bảng 2.1 : Sự khác nhau giữa các loài <i>Azotobacter</i>	16
Bảng 2.2 : Thành phần nước rỉ từ bãi chôn lấp Gò Cát	30
Bảng 2.3 : Thành phần chất thải rắn của bãi chôn lấp Gò Cát.....	32
Bảng 2.4 : Các thông tin về nước rỉ rác trên bãi chôn lấp rác Gò Cát tính đến ngày 19/06/2004.....	33
Bảng 2.5 : Thành phần tinh dầu từ rễ cỏ Vetiver	38
Bảng 3.1 : Thành phần dung dịch Knop.....	44
Bảng 3.2 : Môi trường Ashby's Glucose Agar	46
Bảng 3.3 : Môi trường Beijerinckia medium	46
Bảng 4.1 : Sự phát triển độ dài rễ của các NT trong quá trình thí nghiệm	54
Bảng 4.2 : Sự thay đổi màu sắc lá của các NT trong quá trình thí nghiệm.....	54
Bảng 4.3 : So sánh sự khác nhau giữa hai mô hình trồng cỏ	55
Bảng 4.4 : Sự hiện diện của nốt sần trên bề mặt rễ cỏ qua các NT.....	56
Bảng 4.5 : Hàm lượng tinh dầu theo các quy trình chiết xuất.....	57
Bảng 4.6 : Hàm lượng tinh dầu chiết xuất của các cơ chất theo quy trình CO....	58

DANH SÁCH CÁC HÌNH

HÌNH	TRANG
Hình 2.1 : Hình thái củ Vetiver	5
Hình 2.2 : Khuẩn lạc của vi khuẩn <i>Azotobacter</i>	14
Hình 2.3 : Suối hình thành từ nước rỉ rác.....	33
Hình 3.1 : Quy trình nuôi cấy vi khuẩn.....	47
Hình 3.2 : Mô hình quy trình chiết xuất tinh dầu.....	48
Hình 3.3 : Mô hình chiết xuất 2 bể.....	49
Hình 4.1 : Chiều cao thân và độ dài rễ củ của NT1	51
Hình 4.2 : Nước rỉ rác trước và sau thí nghiệm của NT1.....	52
Hình 4.3 : Chiều cao thân củ NT2.....	52
Hình 4.4 : Chiều cao thân củ của NT3	53
Hình 4.5 : Biểu đồ sự phát triển của rễ qua các NT	53
Hình 4.6 : Mô hình trồng củ 1 và 2	55
Hình 4.7 : Biểu đồ so sánh hàm lượng tinh dầu qua các quy trình	57
Hình 4.8 : Biểu đồ hàm lượng các loại tinh dầu đã chiết xuất theo CO.....	58
Hình 4.9 : Tinh dầu Vetiver sau khi chiết xuất	59

DANH MỤC VIẾT TẮT

BOD : Nhu cầu oxy sinh học.

COD : Nhu cầu oxy hóa học.

TCVN : Tiêu chuẩn Việt Nam.

SS : Chất rắn lơ lửng.

TD : Tinh dầu.

CO : Quy trình chiết xuất tinh dầu sử dụng khí CO₂.

NT : Nghiệm thức.

CENTEEMA : Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng Công nghệ và Quản lý Môi trường.

KHCN : Khoa học công nghệ

KÝ HIỆU

[ký tự số] : Tài liệu tham khảo được trích dẫn.

Chương 1

MỞ ĐẦU

1.1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cỏ Vetiver (*Vetiverria zizanioides* L.) được biết đến như là một loại thực vật đa năng, bảo vệ đất và nước trong nông nghiệp, được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhờ những đặc tính sinh lý độc đáo. Cỏ Vetiver có giá trị kinh tế cao, sức sống mạnh mẽ, là loài có khả năng thích nghi rộng với các điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng của vùng nhiệt đới, dễ nhân giống, ít đòi hỏi công chăm sóc, khi mọc nó chỉ chiếm một khoảng không gian tối thiểu và lại hoàn toàn không có tiềm năng trở thành cỏ dại.

Bên cạnh đó tinh dầu thực vật đã được chiết xuất và sử dụng từ rất sớm trong lịch sử phát triển của con người. Tinh dầu dùng làm hương liệu để tạo ra các loại nước hoa, mỹ phẩm và giúp con người thư giãn trí óc, tăng cường sức khỏe. Trong đó, tinh dầu của cỏ Vetiver có mùi thơm đặc trưng, được sử dụng phổ biến trên thế giới trong ngành công nghiệp mỹ phẩm. Tại Việt Nam đã có một số nghiên cứu về tinh dầu từ cỏ Vetiver nhưng các quy trình chiết xuất tinh dầu này vẫn chưa mang lại hiệu quả cao, sản phẩm vẫn chỉ ở dạng thô nên giá thành không cao, chưa tận dụng được nguồn rễ cỏ sẵn có trên cả nước.

Việt Nam là một nước nông nghiệp với sản lượng gạo xuất khẩu đứng hàng thứ hai trên thế giới. Để có thể vừa cung cấp nhu cầu gạo trong nước vừa phục vụ xuất khẩu thì người nông dân phải thực hiện thâm canh tăng vụ, kéo theo đó là việc sử dụng phân bón cũng tăng cao. Phân bón được người nông dân sử dụng chủ yếu là phân hoá học và thông thường họ sử dụng vượt mức yêu cầu, đặc biệt là phân đạm, nên đã tạo điều kiện cho sâu bệnh phá hoại mùa màng, làm giảm năng suất và chất lượng. Hơn nữa, việc thâm canh đã ảnh hưởng đến chất lượng đạm tự nhiên ở trong

đất, hiện trạng đất nông nghiệp nghèo đạm, trở nên bạc màu đã diễn ra ở nhiều nơi, cùng với diện tích đất hoang hoá còn tồn tại rất nhiều. Nhiệm vụ được đặt ra hiện nay là làm sao để vừa canh tác bền vững vừa cải tạo lại những vùng đất nghèo dinh dưỡng, không sử dụng được trở nên cấp thiết, ảnh hưởng sâu rộng đến đời sống kinh tế của người dân.

Vi khuẩn cố định đạm có tác dụng cố định nitơ trong không khí, làm giàu cho đất. Các vi khuẩn này cũng hiện diện trên hệ rễ cỏ Vetiver, tuy nhiên hiện nay chưa có đánh giá chính xác về số lượng cũng như mật độ của các vi khuẩn cố định đạm này trên rễ cỏ Vetiver. Tinh dầu từ rễ cỏ Vetiver có giá trị kinh tế cao nhưng chưa được quan tâm khai thác, một phần vì quy trình công nghệ chưa phù hợp và những hiểu biết về loại tinh dầu này còn hạn chế. Các đặc điểm trên cho thấy cỏ Vetiver mang lại hiệu quả cao trong nông nghiệp, vừa có thể cải tạo đất, vừa là nguồn nguyên vật liệu cho ngành công nghiệp hương liệu.

Mong muốn hiểu biết thêm về những tiềm năng của cỏ Vetiver trong nông nghiệp, chúng tôi đã thực hiện đề tài “**Bước đầu khảo sát mật độ vi khuẩn cố định đạm và hàm lượng tinh dầu của rễ cỏ Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.)**” với sự đồng ý của Bộ môn Công nghệ sinh học trường Đại học Nông Lâm, dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Bùi Xuân An và KS. Dương Thành Lam.

1.2 MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

Khảo sát mật độ của hai giống vi khuẩn cố định đạm *Azotobacter* spp. và *Beijerinckia* spp. trong nốt sần trên hệ rễ của cỏ Vetiver.

Đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của cỏ Vetiver khi trồng thủy canh trong nước rỉ rác.

Khảo sát hàm lượng tinh dầu trong rễ cỏ Vetiver.

1.3 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Cỏ Vetiver (*Vetiver zizanioides* L.)

Nốt sần và hàm lượng tinh dầu của rễ cỏ Vetiver.

1.4 GIỚI HẠN PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Đề tài nghiên cứu giới hạn chỉ xác định mật độ hai giống vi khuẩn *Azotobacter* spp. và *Beijerinckia* spp. trên hệ rễ của cỏ Vetiver trong các mô hình trồng cỏ.

Đề tài chỉ giới hạn ở việc đánh giá khả năng phát triển của cỏ Vetiver trồng thủy canh trong nước rỉ rác, không xác định các chỉ tiêu của nước rỉ rác đã qua thí nghiệm.

Đề tài chỉ dựa trên quy trình công nghệ chiết xuất để đánh giá hàm lượng tinh dầu, không xác định các thành phần của tinh dầu từ cỏ Vetiver.

1.5 Ý NGHĨA KHOA HỌC

Hiểu thêm về các loại vi khuẩn trên hệ rễ cỏ Vetiver đặc biệt là vi khuẩn cố định đạm, về sự hiện diện của chúng, tác dụng của chúng đối với cỏ Vetiver và với môi trường đất.

Tiếp cận thêm một khía cạnh mới về khả năng của cỏ Vetiver, khả năng làm giàu cho đất.

Đánh giá hàm lượng tinh dầu từ cỏ Vetiver là bước khởi đầu cho các nghiên cứu sâu hơn về các thành phần trong tinh dầu cỏ, tiến đến những hiểu biết cụ thể về đặc tính hương - dược liệu của cỏ *Vetiveria zizanioides* L.

1.6 Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU

Sử dụng nước rỉ rác làm môi trường nuôi dưỡng và nhân giống cỏ Vetiver, đồng thời nước rỉ rác đã qua xử lý được tái sử dụng làm nguồn nước tưới cho các loại thực vật mà không ảnh hưởng đến môi trường.

Mật độ vi khuẩn cố định đạm trên rễ cỏ Vetiver, cụ thể là khả năng hình thành nốt sần trên rễ góp phần tăng cường khả năng cải tạo đất, giữ nước và làm giàu thêm đạm cho đất bạc màu.

Tinh dầu thu được từ rễ cỏ Vetiver mang lại hiệu quả kinh tế cao, là nguồn nguyên liệu cần được tận dụng tối đa.

Chương 2

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 CỎ VETIVER [22]

2.1.1 Nguồn gốc [21]

Có hai loài cỏ Vetiver phổ biến đã được trồng để bảo vệ đất là *Vetiverria zizanioides* và *Vetiverria nemoralis*. Tuy nhiên, loài *V. zizanioides* phân bố trong vùng ẩm, trong khi loài *V. nemoralis* hiện diện ở những vùng khô hơn. Có hai kiểu gen của loài *Vetiverria zizanioides* đã và đang được sử dụng:

- Kiểu gen Bắc Ấn Độ: Là loại cỏ mọc hoang dại và được gieo trồng bằng hạt.
- Kiểu gen Nam Ấn Độ: Là loại cỏ có khả năng tạo màu cho đất thấp và là loài bất thụ.

Số nhiễm sắc thể gốc ở các giống cỏ Vetiver là $x = 10$ và $2n = 20$ ($2x$).

Ở Việt Nam, trong quyển “Tên cây rừng Việt Nam” của Nhà xuất bản Nông nghiệp, 1992 ghi nhận cỏ Vetiver được gọi là cỏ Hương bài hoặc cỏ Hương lau, có tên khoa học là *Vetiverria zizanioides* L. Giống cỏ này đã được trồng ở Thái Bình để sản xuất dầu thơm.

Paul Trương (1999) cho rằng nó bắt nguồn từ Nam Ấn Độ và thuộc loại Monto, có một loại cỏ địa phương cũng được gọi là cỏ Hương bài, cùng tên phân loại là *Vetiverria zizanioides* L. được tìm thấy ở Miền Trung, quanh vùng Pleiku và Ban Mê Thuột, nó được nhân giống bằng cách tách tép, vì vậy chắc chắn loại cỏ này không bắt nguồn từ Nam Ấn Độ như loại Monto.

Ngoài ra, dựa vào hình dạng cây, hoa và đặc biệt là mùi thơm đặc trưng của bộ rễ, một số nhà khoa học đã đặt tên theo địa phương gồm ba giống như sau:

- Giống Đồng Nai có hoa tím, hạt lép không nảy mầm, rễ có mùi thơm đặc trưng của cỏ Vetiver.
- Giống Bình Phước có hoa tím, hạt lép không nảy mầm, hình dạng giống như giống Đồng Nai nhưng rễ không có mùi thơm.
- Giống Đăklăk có hoa tím, hạt lép không nảy mầm và rễ có mùi thơm đặc trưng như giống Đồng Nai.

2.1.2 Phân loại [23]

Giới: Plantae
 Ngành: Magnoliophyta
 Lớp: Liliopsida
 Bộ: Poales
 Họ: Poaceae (Graminae)
 Họ phụ: Panicoidae
 Tộc: Andropogoneae
 Giống: *Vetiveria* (*Chrysopogon*)



Hình 2. 1 Hình thái cỏ Vetiver

Vetiver gồm 11 loài phân bố ở nhiều nơi:

Tên	Phân bố
1. <i>V. elongata</i> (R.Br.) Stapf ex C.E.	New Guinea, Australia
2. <i>V. festucoides</i> (Presl.) Ohwi	Nhật
3. <i>V. filipes</i> C.E Hubbard	New Guinea, Australia (Queensland)
4. <i>V. fulvibarbis</i> Stapf	Trung và Đông Châu Phi
5. <i>V. intermedia</i> S.T Blake	Australia (Queensland)
6. <i>V. lawsonii</i> (Hook.f) Blatt. Et McCann	Ấn Độ
7. <i>V. nemoralis</i> (Balansa) Q. Camus	Đông Nam Á

8. <i>V. nigriflora</i> Stapf	Trung và Đông Châu Phi
9. <i>V. pauciflora</i> S.T.Blake	Australia (Queensland)
10. <i>V. rigida</i> B.K.Simon	Australia (Queensland)
11. <i>V. zizanioides</i> Nash	Trung và Đông Nam Á

Các đồng nghĩa:

Andropogon zizanioides Linn.
Andropogon squarrosus Hack
Andropogon muricatus Retz.
Andropogon nardus Blanco.
Andropogon nigritanus Stapf.
Andropogon festucoides Presl.
Andropogon echinulatum Koenig.
Anatherum zizanioides Linn.
Anatherum muricatum Beauv.
Agrotis veticillata Lam.
Pharalis zizanioides Linn.

Trong các loài *Vetiverria* nói trên thì chỉ có hai loài được sử dụng phổ biến và phân bố rộng rãi là *V. zizanioides* và *V. nemoralis*. (Nguồn: Dương Thành Lam, 2005).

2.1.3 Đặc tính nông học [21]

❖ Thân

Dạng thân cọng, chắc, đặc, cứng và hoá gỗ. Cỏ Vetiver mọc thành bụi dày đặc. Từ gốc rễ mọc ra rất nhiều chồi ở các hướng. Thân cỏ mọc thẳng đứng, cao trung bình 1,5 - 2 m. Phần thân trên không phân nhánh, phần dưới đẻ nhánh rất mạnh.

❖ Mắt

Nhẫn nhụi không lông nằm tiếp giáp giữa các thân cọng cỏ, lồi ra, từ đó tạo ra rễ khi cỏ Vetiver được chôn vùi vào đất.

❖ Lá

Phiến lá hẹp, dài khoảng 45 - 100 cm, rộng khoảng 6 - 12 mm, dọc theo rìa lá có răng cưa bén.

❖ Rễ

Rễ là phần hữu dụng và quan trọng nhất. Đa số cỏ dại có rễ dạng sợi, trải dài ra từ phần thân cỏ trên mặt đất và cắm vào đất theo hướng ngang, còn rễ cắm đứng vào đất không mọc sâu. Ngược lại, cỏ Vetiver không bò lan, thân rễ đan xen nhau và có thể phát triển rất nhanh. Do đó, hệ thống rễ cỏ Vetiver không mọc trải rộng mà lại cắm thẳng đứng sâu vào trong đất, kể cả rễ chính, rễ thứ cấp hoặc rễ dạng sợi. Rễ có dạng chùm không mọc trải rộng mà lại cắm thẳng đứng sâu 3 - 4 m, rộng đến 2,5 m sau hai năm trồng. Rễ của loài *Vetiveria zizanioides* có chứa tinh dầu, chất lượng tốt nhất 18 tháng sau khi trồng với lượng tinh dầu 2 - 2,5% trọng lượng khô.

❖ Cơ quan sinh sản

Loài *Vetiveria zizanioides* được dùng phổ biến vì có đặc điểm không tạo hạt, nhân giống chủ yếu bằng phương pháp vô tính nên không thể mọc tràn lan như một loại cỏ dại khác.

Cỏ Vetiver là cây lưỡng tính, có hoa lưỡng tính. Các hoa có phân hoá giới tính như lưỡng tính, đực hoặc bất thụ có ở cùng trên một cây.

2.1.4 Đặc tính sinh thái [21]

❖ Phân bố địa lý và sinh thái

Trên thế giới, cỏ Vetiver đã được dùng rộng rãi để chống xói mòn đất. Tại Nam Ấn Độ, gần thành phố Mysora, nông dân đã trồng cỏ *Vetiveria nigratana* làm hàng rào cây xanh từ khoảng 200 năm nay cũng như nông dân ở Kano, Nigeria cũng đã trồng cỏ Vetiver hàng thế kỷ nay. Từ giữa thập niên 80, công nghệ cỏ Vetiver đã được giới thiệu đến hơn 100 nước và hiện nay có hàng trăm hecta đất được áp dụng công nghệ bằng cỏ Vetiver ở 147 nước, trong đó có 106 nước sử dụng với mục đích bảo vệ đất và nước.

Theo nhiều tài liệu, cỏ Vetiver hiện được trồng nhiều ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, như Châu Phi nhiệt đới (Ethiopia, Nigeria...), Châu Á (Trung Quốc, Ấn Độ, Malaysia, Indonesia, Philippines, Thái Lan...), Châu Úc, Trung và Nam Mỹ (Colombia...).

Trong tự nhiên, cỏ Vetiver có ở vùng đồng trũng và dọc bờ suối; còn hiện nay, cỏ Vetiver được trồng rộng rãi làm hàng rào cây xanh để bảo vệ đất và nước ở các vị trí như: bờ sông, bờ đê, bờ ao và hồ chứa nước, dọc theo các kênh tưới hoặc tiêu nước, đập nước, các vịnh nước, các đường nước và mương cắt nước; khu vực chu vi của một công trình, các sườn đất dốc, dọc các xa lộ, cũng như ở các vùng mỏ...

❖ Khí hậu

Cỏ Vetiver phát triển được ở mức nhiệt độ trung bình là 18 - 25⁰C, nhiệt độ tháng lạnh nhất trung bình là 5⁰C, nhiệt độ tối thiểu tuyệt đối là -15⁰C. Khi mặt đất đóng băng, cỏ sẽ chết. Nhiệt độ mùa hè nóng 25⁰C sẽ kích thích cỏ phát triển nhanh, sự sinh trưởng thông thường bắt đầu ở nhiệt độ hơn 12⁰C. Cỏ Vetiver có sức chịu đựng đối với sự biến động khí hậu cực kỳ lớn như hạn hán kéo dài, lũ lụt, ngập úng. Khả năng chịu ngập úng kéo dài đến 45 ngày ở luồng nước sâu 0,6 - 0,8 m và chịu được biên độ nhiệt từ -10⁰C đến 48⁰C.

❖ Lượng mưa

Cỏ Vetiver cần lượng mưa khoảng 300 mm, nhưng trên 700 mm, có lẽ thích hợp hơn để cỏ tồn tại suốt thời gian khô hạn, thông thường cỏ Vetiver cần một mùa ẩm ướt ít nhất 3 tháng, lý tưởng nhất là có mưa hàng tháng.

❖ Ẩm độ

Cỏ Vetiver phát triển tốt ở điều kiện ẩm hoặc ngập nước hoàn toàn trên 3 tháng. Tuy nhiên, chúng cũng sinh trưởng tốt ở điều kiện khô hạn nhờ hệ thống rễ đâm ăn sâu vào đất nên cỏ Vetiver có thể chịu đựng được khô hạn và trên các triền dốc.

❖ Ánh sáng

Cỏ Vetiver là loại cây C_4 nên chúng thích hợp trong vùng có lượng ánh sáng cao. Loài này phát triển yếu dưới bóng râm, khi bóng râm được bỏ đi thì cỏ sẽ phục hồi sinh trưởng rất nhanh.

❖ Đất

Cỏ Vetiver mọc tốt nhất ở đất cát sâu, tuy nhiên nó cũng phát triển được ở phần lớn các loại đất, từ đất vertisol nứt - đen đến đất alfisol đỏ. Cỏ còn mọc trên đá vụn, đất cạn và cả đất trũng ngập nước.

Cỏ Vetiver mọc tốt nhất ở chỗ đất trống và thoát nước tốt, nhất là ở đất non trẻ tạo từ tro núi lửa. Hàm lượng tinh dầu trong rễ cỏ Vetiver sẽ tăng lên nếu cỏ được trồng ở đất sét.

Từ những đặc điểm thực vật và sinh thái của cỏ Vetiver (*V. zizanioides* L.) cho thấy chúng là loài có khả năng thích nghi rộng ở nhiều vùng sinh thái khác nhau, phát triển được ở những vùng đất tương đối khắc nghiệt và có thể dùng được trồng với mục đích chống xói mòn và sạt lở đất để bảo vệ đất đai.

2.1.5 Vi sinh vật trên hệ rễ [3,15]

Khá nhiều vi sinh vật đất phát triển quanh hệ rễ cỏ Vetiver, vi khuẩn và nấm là tiêu biểu. Các vi sinh vật xâm nhập vào mặt trên rễ, tạo thành những đường dẫn truyền dinh dưỡng nối đất và cây, rễ tiết ra polysaccharide là chất hữu cơ hoà tan giúp cho sự chuyển hoá sinh học của đất và sự thích nghi của cây.

Vi sinh vật gắn liền với rễ cỏ Vetiver là các vi khuẩn cố định đạm, vi khuẩn hoà tan lân, các nấm rễ và các vi khuẩn phân giải cellulose... sản xuất chất dinh dưỡng cho sự sinh trưởng, phát triển và thúc đẩy các hormon sinh trưởng thực vật tác động trực tiếp lên cỏ Vetiver.

❖ Vi khuẩn:

- **Vi khuẩn cố định đạm:** hiện diện ở bề mặt rễ, trong các gian bào hoặc trong các tế bào rễ đã chết; có vai trò quan trọng trong việc cung cấp đạm cho cỏ Vetiver, sản xuất enzym chuyển hoá nitơ tự do thành nitơ sinh học dưới dạng N-

ammonia cho cây hấp thụ. Có thể kể: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter alicalignen*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* và *Pseudomonas*.

– **Vi khuẩn điều hoà sự sinh trưởng của cây:** chất điều hoà sinh trưởng là những chất hữu cơ ảnh hưởng đến quá trình sinh lý của cây ở nồng độ rất thấp; ví dụ như auxin, gibberellins, cytokinins và acid abscisic. Chất điều hoà sinh trưởng cũng bao gồm cả những chất chuyển hoá từ vi khuẩn. Nhiều hormon thực vật (phytohormones) được sản xuất bởi các vi khuẩn cố định đạm như *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* và *Pseudomonas* góp phần thúc đẩy sự phát triển và sự tái sinh của bộ rễ, đồng thời giúp cây kháng được bệnh hại.

– **Vi khuẩn hoà tan lân:** một số vi khuẩn đất, đặc biệt là vi khuẩn thuộc họ *Bacillus* và *Pseudomonas*, có khả năng chuyển hoá lân không hoà tan trong đất thành dạng hoà tan bằng cách tiết ra các acid hữu cơ như acid formic, propionic, lactic, glycolic, fumaric, succinic. Các acid này làm giảm pH và thúc đẩy sự phân giải phospho. Đất ở vùng nhiệt đới thường nghèo lân, do vậy mà các vi khuẩn này có vai trò rất quan trọng đối với sự sinh trưởng, phát triển của cỏ Vetiver.

❖ **Nấm:**

– **Nấm phân giải phosphate:** thuộc họ *Penicillium* và *Aspergillus*, chuyển hoá phosphate không tan trong đất thành dạng hoà tan hữu dụng cho cỏ Vetiver.

– **Nấm rễ:** cộng sinh với rễ. Nhóm này có 5 họ: *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Scheocystis* và *Endogone*. Lợi ích: thúc đẩy quá trình hút dinh dưỡng đa lượng và vi lượng, tăng sức chống chịu cho cây.

❖ **Vi sinh vật phân giải cellulose:** có vai trò quan trọng trong việc làm tăng hay giảm hàm lượng chất hữu cơ trong đất ở vùng nhiệt đới.

2.1.6 Lợi ích từ cỏ Vetiver [21]

Cỏ Vetiver dạng bụi rậm, lưu niên, phiến lá tương đối cứng, tán lá phần lớn nằm ở phần gốc. Các bẹ lá phủ lên nhau, ép sát và xếp úp vào nhau tạo thành một rào cản cơ học, mật độ dày trên bề mặt đất, sẽ rất hiệu quả trong việc ngăn chặn sự mất dinh dưỡng và xói mòn đất.

Khi trồng thành bờ rào, nó có tác dụng như một hệ thống lọc liên tục, giảm nước thoát đi, giảm việc tạo thành những dòng chảy nhỏ hoặc phải đào mương thoát nước.

Hàng rào cỏ Vetiver không cần làm thêm rãnh thoát nước như phải làm với các hệ thống cơ học khác, cho phép thoát nước trên bề mặt đất được lọc qua hàng rào. Do hàng rào cỏ Vetiver chiếm một khoảng không gian tối thiểu, nên có thể trồng cây khác (ví dụ như cây họ đậu) dọc theo bờ rào.

Trồng cỏ vetiver rất thích hợp để tạo một rào cản thực vật dày đặc ở các vị trí trồng cây hàng năm hoặc lâu năm, trồng để chống xói mòn ở các sườn dốc của xa lộ hoặc đường xe lửa, dọc theo các bờ đê mới quanh ao hoặc hồ chứa nước...

Nhờ có hệ thống rễ phát triển dày đặc, cỏ Vetiver có khả năng hấp thu một cách có hiệu quả các khoáng chất có độc tính từ nguồn phân bón và thuốc bảo vệ thực vật gây ô nhiễm trong đất và nước như các chất N, P, Al, Mg, Hg, Cd và Pb. Ngoài ra, nó còn giúp làm tăng độ phì nhiêu của đất một cách tự nhiên nhờ tác dụng giữ ẩm độ của đất, rễ và thân cỏ mọc dày đặc sẽ giữ lại chất trầm tích (đất, bùn...) nằm lại trên mặt đất. Thân, lá, rễ khi chết được vùi lấp vào trong đất sẽ phân hủy thành chất hữu cơ làm cho đất trở nên tơi xốp và thoáng hơn.

Ngoài ra, cỏ vetiver còn giúp làm tăng độ phì nhiêu của đất một cách tự nhiên nhờ tác dụng giữ ẩm đất, rễ và thân cỏ mọc dày đặc sẽ giữ lại chất trầm tích (đất, bùn ...) nằm lại trên mặt đất, còn thân, lá và rễ cỏ khi được vùi lấp vào trong đất sẽ phân hủy thành chất hữu cơ làm cho đất trở nên tơi xốp và thoáng hơn, cải thiện được đặc tính cơ học của đất.

❖ Các lợi ích khác từ cỏ Vetiver

Từ rễ của loài cỏ *Vetiveria zizanioides*, qua chưng cất sẽ lấy tinh dầu được dùng làm dầu thơm và hương liệu trong xà bông thơm. Giá bán trên thị trường thế giới khá cao, khoảng 135 USD/Kg tinh dầu cỏ Vetiver (Nguồn: Sở NN&PTNN An Giang, 2005).

Ngoài ra, cọng, thân, lá cỏ Vetiver còn có tác dụng:

– Như một dạng bẫy nhằm giữ lại chất dư thừa của cây trồng và phù sa bị nước làm xói mòn, chảy mất đi.

– Lá cỏ Vetiver dùng làm thức ăn cho gia súc, là nguồn giá trị dinh dưỡng ngang giữa cỏ Napier và bắp tươi sấy. Lọp mái nhà, sử dụng như nguyên liệu làm giấy, làm dây thừng, chiếu, nón, giỏ xách ... Khi phần ngọn cỏ Vetiver thuần thực đạt 52%, có thể dùng làm thức ăn cho bò sữa, ngựa, dê và nhiều loại động vật khác do tính chất dễ tiêu hóa. Ngoài ra, người ta còn dùng cỏ Vetiver để lót ổ rom cho gia súc.

– Thân và lá cỏ Vetiver có thể dùng làm lớp thảm thực vật rải lên lớp đất mặt quanh tán cây để giữ ẩm cho cây và diệt cỏ dại cũng như lót rải để bảo vệ đất dưới chuồng nuôi gia súc ...

– Thân, lá còn dùng làm vật liệu nuôi trồng nấm rom và phân xanh. Người ta còn dùng thân lá cỏ Vetiver làm vật liệu nhồi nệm, làm chổi quét, làm cây cảnh trang trí trong vườn, trong nhà ...

Tóm lại, do có hiệu quả cao và kinh tế trong việc bảo vệ đất chống xói mòn, sạt lở; cỏ Vetiver có thể được trồng dọc theo các kinh đào, bờ sông, bờ đê, các vùng đất dốc hay sạt lở ...

Trồng cỏ Vetiver được xem như là xây dựng một hàng rào bê tông sinh học chống lại xói mòn sạt lở đất do có một số tác dụng có hiệu quả như:

1. Giảm vận tốc dòng chảy, giữ đất không bị nước cuốn trôi.
2. Hấp thu các khoáng chất có độc tính, lọc nước chống ô nhiễm nguồn nước, bảo vệ môi trường.
3. Duy trì độ ẩm của đất, tăng độ phì cho đất.
4. Vấn đề an toàn về môi trường: đến nay, chưa có ảnh hưởng nghịch nào trong việc sử dụng công nghệ cỏ Vetiver cũng như chưa có phản ứng phụ nào tác động xấu đến con người.

2.1.7 Khả năng cố định nitơ ở một số loài thực vật [1]

Khả năng hình thành nốt sần được phát hiện thấy ở cả nhiều thực vật không thuộc bộ Đậu.

Trong số các thực vật thuộc ngành Hạt mở (*Gymnospermae*) người ta đã phát hiện thấy trong các giống sau đây có một số loài có khả năng hình thành nốt sần ở bộ rễ: *Bowenia*, *Cycas*, *Ceratozamia*, *Dioon*, *Encephalarlos*, *Macrozamia*, *Stangeria*, *Zamia* (thuộc bộ *Cycadales*), *Ginkgo* (thuộc bộ *Giakgoale*), *Agathis*, *Araucaria*, *Libocedrus*, *Acrophyle*, *Dacridium*, *Microcachrys*, *Phyllocladus*, *Pherosphaera*, *Podocarpas*, *Saxegothaea*, *Sciadopitys* (thuộc bộ *Coniferales*).

Trong số các thực vật thuộc lớp Hai lá mầm (*Dicotyledoneae*) trong ngành Hạt kín (*Angiospermae*) người ta nhận thấy có các loài nằm trong một số giống sau đây (không kể các loài thuộc bộ Đậu) có khả năng tạo thành nốt sần trên rễ : *Coriaria* (bộ *Coriariales*), *Myricagale*, *Comptonia* (bộ *Myricalee*), *Almus* (bộ *Fagales*), *Casuarina* (bộ *Casuarinales*), *Elaeagnus*, *Hippophae*, *Shephrdiae*, *Ceanothus*, *Discaria* (bộ *Rhamnales*), *Tribulus*, *Zygophyllum*, *Fagonia* (bộ *Gruinales*), *Brassica*, *Raphanus* (bộ *Rhoeadales*), *Melampyrum*, *Rhinanthus* (bộ *Tubiflorae*), *Coffea* (bộ *Rubiales*), *Dryas*, *Purshia*, *Cercocapus* (bộ *Rosales*), *Acrostaphylos* (bộ *Ericales*).

Trong số các thực vật thuộc lớp Một lá mầm (*Monocotyledoneae*) người ta đã tìm thấy một số loài trong các giống sau đây có khả năng tạo thành nốt sần ở rễ : *Poa*, *Clinelymus*, *Alopecurus*.

Ngoài ra một số loài thực vật thuộc các giống *Pavetta*, *Psychotria*, *Chomelia*, *Coprosoma*,... còn có khả năng tạo ra nốt sần trên lá.

Các loài thực vật nói trên được nghiên cứu không nhiều. Một số vi khuẩn cộng sinh đã được phân lập và định tên, một số khác còn chưa đủ tài liệu để xác định. Khả năng cố định nitơ của chúng thường cũng không lớn như các loài thuộc bộ Đậu. Đáng chú ý hơn cả là khả năng cố định nitơ của loài *Casuarinaequisetifolia*, khoảng 143 kg/ha/năm.

Ngoài vi khuẩn nốt sần, nhiều loài nấm rễ (khuẩn căn = *mycorhiza*) cũng có khả năng cố định nitơ phân tử. Chẳng hạn các loài nấm rễ phân lập từ các cây thuộc họ Thạch nam (*Ericaceae*) thường có hoạt tính cố định nitơ là 10,92 - 22,14 mg nitơ/1g đường. Có nghiên cứu cho biết nhờ tác dụng của nấm rễ mà đất trồng loại

thông *Pinus radiala* ở Mỹ hàng năm có thể được làm giàu thêm khoảng 50 kg nito/hecta.

2.2 VI KHUẨN AZOTOBACTER [1]

2.2.1 Phân loại [23]

Giới: Bacteria

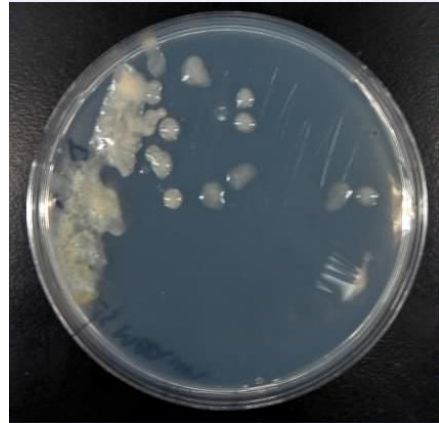
Ngành: Proteobacteria

Lớp: Gamma Proteobacteria

Bộ: Pseudomonadales

Họ: Pseudomonadaceae/Azotobacteraceae

Giống: Azotobacter



Hình 2. 2 Khuẩn lạc của *Azotobacter*

2.2.2 Đặc điểm sinh học

Azotobacter được phân lập lần đầu tiên vào năm 1901 (M.W.Beijerinck, 1901). Đó là loài *Azotobacter chroococum*. Về sau, người ta tìm thấy nhiều loại khác trong giống *Azotobacter*.

Vi khuẩn thuộc giống *Azotobacter* có tế bào từ hình cầu đến hình que. Khi còn non, tế bào thường có hình que với kích thước khoảng 2,0 - 7,0 x 1,0 - 2,5 μm . Đôi khi chiều dài đạt đến 10 - 12 μm . Tế bào sinh sôi nảy nở theo lối phân cắt gián đơn. Di động nhờ tiêm mao mọc quanh khắp cơ thể (chu mao). Ngoài tiêm mao trên tế bào còn có cả nhiều sợi tiêm mao (fimbriae) rất nhỏ bé. Lượng DNA trong tế bào *Azotobacter* thường thấp hơn so với nhiều loài vi khuẩn khác (khoảng 0,70 - 0,81%).

Khi già, tế bào *Azotobacter* mất khả năng di động, kích thước thu nhỏ lại trông như hình cầu. Nguyên sinh chất xuất hiện nhiều hạt lớn nhỏ. Đó là các hạt vòlutin, granuloza, các giọt mỡ...Quan sát dưới kính hiển vi ta còn thấy khi già tế bào *Azotobacter* được bao bọc bởi một vỏ nhầy khá dày. Vỏ nhầy của *Azotobacter* chứa khoảng 75% là chất hydrit của axit uronic và chỉ chứa khoảng 0.023% nito. Một số loài *Azotobacter* có khả năng tạo thành bào xác (kyste, cyste).

Trong các bình nuôi cấy có thể thấy xuất hiện những dạng khổng lồ của tế bào *Azotobacter*. Ngược lại cũng có khi xuất hiện những dạng hiển vi nhỏ bé đến 0,2 μm , thậm chí đôi khi xuất hiện cả những dạng qua lọc hết sức nhỏ bé. Khi gặp điều kiện thuận lợi, các dạng hiển vi hoặc các dạng qua lọc này lại có thể nhanh chóng phát triển thành các tế bào bình thường.

Trên các môi trường không chứa nitơ khuẩn lạc của *Azotobacter* có dạng nhầy, lồi, đôi khi nhăn nheo. Khi nuôi cấy lâu trên môi trường đặc, khuẩn lạc có màu vàng lục, màu hồng hoặc màu nâu đen (tùy loài *Azotobacter*).

Cho đến nay đã có rất nhiều loài *Azotobacter* đã được miêu tả. Theo nghiên cứu của nhiều tác giả (H. Jensen, 1954; L. I. Rubentchich, 1960; J. P. Votes và M. Dedeken, 1966) thì phần lớn các loài này không phải là loài thực sự, mà chỉ là những dạng khác nhau của vài loài mà thôi.

1. Có thể kể đến các loài *Azotobacter* chủ yếu sau đây: *Azotobacter chroococcum* (tên khác là: *Az. Woodstownii*, *Bac. Azotobacter*, *Bac. Chroococcus*, *Az. unicapsulare*, *Az. galophilum*, *Az. nigricans*, *Az. acidum*).

Tế bào có kích thước khoảng 3,1 x 2,0 μm . Có khả năng tạo thành bào xác, có khả năng di động nhất là khi còn non hoặc khi nuôi cấy trên môi trường có nguồn cacbon là etanol. Khi già sinh sắc tố có màu từ nâu đến đen. Sắc tố không khuếch tán vào môi trường. Có khả năng đồng hóa mannit, ramnoza, tinh bột, có hoặc không có khả năng đồng hóa benzoat natri.

2. *Azotobacter beijerinckii*:

Tế bào có kích thước khoảng 4,6 x 2,4 μm . Có khả năng tạo thành bào xác, không di động. Khi già sinh sắc tố có màu từ vàng tới nâu sáng. Sắc tố không khuếch tán vào môi trường. Có khả năng đồng hóa mannit, ramnoza, không đồng hóa tinh bột nhưng đồng hóa được benzoat batri (ngay ở nồng độ 5%).

3. *Azotobacter vinelandii* (tên khác là: *Az. Smyrni*, *Az. Hilgardii*, *Az. Vitreum*, *Az. Fluorescens*).

Tế bào có kích thước khoảng 3,4 x 1,5 μm . Có khả năng tạo thành bào xác (sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường có nguồn cacbon là etanol). Có khả năng di

động (khi già di động không rõ rệt). Sinh sắc tố màu vàng lục huỳnh quang ngay từ khi mới phát triển trong môi trường. Sắc tố khuếch tán vào môi trường. Có khả năng đồng hóa mannit, ramnoza, có khả năng đồng hóa benzoat natri (ở nồng độ 1%).

4. *Azotobacter agilis* (tên khác là: *Az. Agile*, *Azotomonas agile*)

Tế bào có kích thước khoảng 3,3 x 2,8 μm , không tạo thành bào xác. Có khả năng di động, khi già sinh sắc tố vàng lục huỳnh quang. Sắc tố khuếch tán vào môi trường. Không có khả năng đồng hóa benzoat natri, mannit và ramnoza.

Dựa trên các nghiên cứu về tỷ lệ Guanin + Citozin trong DNA của tế bào *Azotobacter* có tác giả đã đề nghị chia giống *Azotobacter* thành 3 nhóm:

1. Nhóm *Azotobacter*: gồm ba loài là *Az. Chroococcum*, *Az. Beijerinckii* và *Az. Vinelandii*.
2. Nhóm *Azotomonas*: gồm hai loài là *Az. Insignis* và *Az. Macrocytogenes*.
3. Nhóm *Azotococcus* : gồm một loài là *Az. Agilis* (De Ley và Park, 1966).

Theo hệ thống phân loại vi khuẩn Bergey (1974) thì tất cả 4 loài *Azotobacter* và ba loài *Azotomonas*, chúng khác nhau chủ yếu bởi các đặc điểm sau đây:

Bảng 2. 1 Sự khác nhau giữa các loài *Azotobacter*

	A.chrooc	A.beij	A.vine	A.pasp	A.agil	A.ins	A.mac
Sắc tố:							
-tan trong nước huỳnh quang	-	-	Lục	Lục	Trắng	-	Trắng
-không tan trong nước	Đen	Nâu					
Đồng hóa:							
-Tinh bột	+	-	+	-	-	-	+
-Mannitol	-	-	+	-	-	-	-
-Ramnoza							

Di động:	+	-	+	+	+	+	+
Tiêm mao:							
-Chu mao	+		+	+	+		
-Chùm mao							+
-Đơn mao							-
Sinh bào xác:	+	+	+	+	-	-	-
Sinh vỏ nhậy:	+	+	+	+	+	-	+
Thường gặp trong đất:	+	+	+	+	-	-	+
Sống ở nước ngọt					+	+	
Tỷ lệ GC (%) trong DNA	65 - 66	66	66	63 - 65	53 - 54	57 - 58	58 - 59

➤ Trong đó:

- ❖ A.chrooc: là *Azotobacter chroococcum*
- ❖ A.beij: *Azotobacter beijerinckii*
- ❖ A.vine: *Azotobacter vinelandii*
- ❖ A.pasp: *Azotobacter paspali*
- ❖ A.agil: *Azotomonas agilis*
- ❖ A.ins: *Azotomonas insignis*
- ❖ A.mac: *Azotomonas macrocytogene*

Để phân lập *Azotobacter* người ta có thể sử dụng môi trường thạch Ashby (S. F. Ashby, 1907). Trên môi trường này một số vi khuẩn khác (như *Bacillus oligonitrophilus*, *Bacillus muciliginosus*) cũng có thể phát triển và tạo thành những khuẩn lạc nhầy rất dễ làm cho ta nhầm lẫn với khuẩn lạc của *Azotobacter*. Nhiều khi có một số vi khuẩn chui hẳn vào trong bao nhầy của *Azotobacter* để phát triển. Muốn hạn chế sự phát triển của các vi khuẩn này có thể sử dụng môi trường Ashby nhưng thay thế đường bằng natri benzoat (0,15%) hoặc có thể sử dụng môi trường chứa 1,5% quinozol và 0,003% lovomixeti, cũng có thể sử dụng các bản silicagel để thay thế cho môi trường thạch.

Phần lớn các nòi *Azotobacter* phân lập được từ thiên nhiên có khả năng cố định được trên 10 mg N₂ khi tiêu thụ hết 1g các hợp chất carbon. Một số nòi

Azotobacter trong những điều kiện thích hợp có thể đồng hóa được đến 30 mg N₂/1g hợp chất carbon. Khả năng cố định N₂ của *Azotobacter* không những phụ thuộc từng nòi vi khuẩn mà còn phụ thuộc vào thành phần môi trường nuôi cấy, pH và nhiệt độ nuôi cấy, sự tồn tại của các hợp chất chứa nitơ, tinh chất của nguồn thức ăn carbon, sự có mặt của nguyên tố vi lượng và các chất hoạt động sinh học.

Khi phát triển chung với một số vi sinh vật khác *Azotobacter* sẽ có hoạt tính cố định N₂ cao hơn so với khi nuôi cấy riêng. *Azotobacter* sẽ đem một phần nitơ đồng hóa được đưa vào môi trường dưới dạng NH₃, acid amin hoặc protein.

Ngoài nitơ phân tử *Azotobacter* còn có khả năng đồng hóa muối amôn và ure. Một số nòi *Azotobacter* có khả năng sử dụng nitrit và nitrat. Hai loại acid amin thích hợp nhất đối với nhu cầu dinh dưỡng của *Azotobacter* là acid glutamic và acid asparaginic.

Sự có mặt của muối amôn hay nitrat trong môi trường sẽ làm hạn chế sự cố định N₂ của *Azotobacter*. Người ta đã tìm thấy phương trình của mối quan hệ này (V. Iswaran, 1960) như sau:

- Khi có muối amôn : $y = 4,84 - 1,59 \lg 10x$
- Khi có nitrat : $y = 3,73 - 3,31 \lg 10x$

Ở đây y là số lượng N₂ (mg) đồng hóa khi dùng hết 1g mannit, còn x là số lượng nguồn nitơ hợp chất (mg/100ml).

2.2.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến vi khuẩn *Azotobacter*

❖ Nguồn carbon

Về thức ăn carbon *Azotobacter* có khả năng đồng hóa nhiều loại monosaccarit (glucoza, fructoza, galactoza, mannoza, arabinoza, xyloza), disaccarit (saccaroza, maltoza, trehaloza, melibioza, xenlobioza, lactoza), trisaccarit (raffinoza, melixitoza), polisaccarit (tinh bột, dextrin, glycogen, inulin), 2,3 - butylenglycol, glyxerin, critrit, mannit, sorbit, inozit, các oxyacid (như acid lactic, acid glycolic, acid saccaric, acid succinic, acid malic, acid limonic, acid galactonic, acid glucuroic, acid mannonic, acid glycetic, acid pyruvic, acid quinic), các acid đơn chức (như acid acetic, acid propionic, acid butyric, acid valeric, acid cepronic),

các diacid (như acid aconitic, acid tricarboic, acid limonic), các hợp chất thơm (như acid benzoic, acid salicilic, phenol...).

Thực ra thì khả năng đồng hóa các nguồn thức ăn carbon nói trên không phải là giống nhau ở tất cả các nòi *Azotobacter*. Có không ít các nòi *Azotobacter* không có khả năng đồng hóa lactoza, mannit hoặc natri benzoat. Khi đồng hóa glucoza, *Azotobacter* thường làm tích lũy lại trong môi trường acid pyruvic, acid lactic và etanol. Chính vì lý do này cho nên khi phát triển, *Azotobacter* thường làm acid hóa môi trường nuôi cấy.

Azotobacter không có khả năng đồng hóa tốt chất mùn, tuy nhiên sự tồn tại của một lượng nhỏ chất mùn trong môi trường sẽ làm kích thích sự phát triển của *Azotobacter*.

❖ Phospho (P)

Sự phát triển của *Azotobacter* chịu ảnh hưởng rõ rệt của lượng chứa phospho trong môi trường.

Những điều tra tại đất trồng lúa ở nước ta cho thấy khi lượng chứa P_2O_5 của đất 0,006% thì luôn luôn thấy có mặt *Azotobacter* trong đất, ngược lại khi lượng chứa P_2O_5 0,02% hầu như không phát hiện thấy sự có mặt của *Azotobacter* trong đất. Bổ sung phân lân vào đất có thể làm tăng cường rõ rệt hoạt động cố định nitơ của *Azotobacter* và do đó làm nâng cao lượng chứa nitơ trong đất.

Một số nghiên cứu cho biết hoạt động cố định nitơ của *Azotobacter* chỉ được bắt đầu xảy ra khi nồng độ PO_4 đạt đến 4 mg trong 100 ml môi trường. Ngược lại khi nồng độ PO_4 đạt tới 800 mg/100 ml thì quá trình cố định nitơ sẽ bắt đầu bị ngừng lại.

Sự mẫn cảm mạnh mẽ của *Azotobacter* với phospho đã cho phép người ta sử dụng chúng như một loại vi khuẩn chỉ thị để xác định nhu cầu về phospho của đất.

❖ Kali (K)

Kali rất cần thiết đối với sự phát triển của *Azotobacter* nhưng với số lượng nhỏ hơn nhiều. Nếu đưa vào môi trường một lượng muối kali quá thừa thì chúng sẽ

làm ức chế sự phát triển của *Azotobacter*, có thể tác hại này là do gốc anion của các muối này gây ra.

❖ **Calci (Ca)**

Calci cũng có ảnh hưởng lớn đối với sự phát triển của *Azotobacter*. Những điều tra tại Việt Nam cho thấy trong các đất có lượng chứa CaO cao hơn 0,4% luôn luôn thấy có mặt một số lượng lớn các tế bào *Azotobacter*, ngược lại hầu như không phát hiện thấy chúng trong các mẫu đất có lượng chứa CaO dưới 0,25%.

Khi thiếu Calci tế bào *Azotobacter* sẽ tạo thành nhiều không bào, ảnh hưởng xấu đối với việc tổng hợp ATP và sự tạo thành các polyphosphate.

Đối với *Azotobacter chroococcum* nồng độ CaCl_2 thích hợp nhất là khoảng 0,01%, nếu cao hơn sẽ ảnh hưởng không tốt đối với hoạt động cố định nitơ của chúng, nhưng ngay cả những liều lượng cao của calci carbonate cũng không làm ức chế hoạt động cố định nitơ của *Azotobacter*. Ý nghĩa sinh lý của Calci đối với *Azotobacter* thực ra còn chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ. Trong một số trường hợp có thể dùng *Azotobacter chroococcum* như một loài vi khuẩn chỉ thị để xác định nhu cầu về vôi của đất.

❖ **Magie (Mg)**

Magie được *Azotobacter* đòi hỏi với số lượng cao hơn sắt khoảng 10 lần.

❖ **Molybden (Mo)**

Mo có tác dụng làm tăng cường sự phát triển của *Azotobacter* cũng như làm tăng cường quá trình cố định N_2 của chúng. Một số nghiên cứu cho biết nhu cầu về Mo của *Azotobacter chroococcum* là 10 - 100 mg $\text{Na}_2\text{Mo}_4/\text{l}$, của *Az. Agile* và *Az. Vinelandii* là 5mg $\text{Na}_2\text{Mo}_4/\text{l}$.

❖ **Bo (B)**

B cũng có tác dụng tương tự như Mo. Nồng độ B thích hợp nhất đối với sự phát triển của *Azotobacter* là 2 mg/l (nuôi cấy dịch thể) hoặc 3 - 5 mg/l (nuôi cấy trong đất).

❖ Mangan (Mn)

Mn làm tăng cường sự phát triển của *Azotobacter* (cả trên môi trường có chứa các hợp chất nitơ lẫn môi trường không chứa nitơ). Mn không phải là nguyên tố có liên quan đối với quá trình cố định N_2 (J. P. Votes, 1963). Nhu cầu về Mn của *Az. chroococcum* là vào khoảng 20 - 30 mg/l. Nhu cầu về Mn của *Az. beijerinckii* và *Az. vinelandii* chỉ vào khoảng 10 - 15 mg/l. Sự có mặt của Mn có thể thay thế một phần sự có mặt của Mg.

❖ Đồng (Cu)

Nhiều ý kiến không giống nhau về nhu cầu của *Azotobacter* đối với Cu. Ở những nồng độ rất nhỏ Cu cũng đã ảnh hưởng xấu đối với sự phát triển của *Azotobacter*. Trong khi đó, có ý kiến khác cho rằng Cu là nguyên tố vi lượng cần thiết đối với *Azotobacter*. Cũng có tác giả cho rằng Cu rất cần thiết đối với việc tạo thành sắc tố nâu đen của *Az. chroococcum*.

❖ Vanadi (V)

Nhu cầu của *Az. chroococcum* đối với V thay đổi trong khoảng 0,2 - 15 mg $NaVO_3 \cdot 6H_2O/l$ môi trường (V. V. Kovalskii, 1966).

❖ Các chất khác

Các nguyên tố vi lượng có tác dụng dương tính của đối với sự phát triển của *Azotobacter* như: Coban (Co), Iot (I), Kẽm (Zn),...

Asen (As) ở nồng độ rất nhỏ (10 - 20 mg muối As trong 1 kg đất) có tác dụng kích thích sự phát triển của *Azotobacter*.

Nhiều nguyên tố vi lượng có ảnh hưởng xấu đối với sự phát triển của *Azotobacter* như: Brom (Br) dẫn đến việc ức chế quá trình cố định N_2 , Nhôm (Al) làm ức chế sự phát triển của *Azotobacter*.

Một số nguyên tố phóng xạ như: Th (Thori), U (Urani)... ở một nồng độ rất nhỏ có thể kích thích sự phát triển và sự cố định N_2 của *Azotobacter*.

Azotobacter có khả năng tự túc về các chất sinh trưởng khác nhau: vitamin B_1 , vitamin B_2 , vitamin B_{12} , acid nicotinic, acid pantothenic, acid folic, biotin, gibberellin.

Một số nòi *Azotobacter* còn có khả năng sinh ra một số chất chống nấm có phổ tác dụng khá rộng (ức chế *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*,...).

❖ pH

Azotobacter có thể phát triển được trên các môi trường có pH trong khoảng 4,5 - 9,0. Tuy nhiên quá trình cố định nitơ chỉ được thực hiện trong một phạm vi pH khá hẹp, khoảng 5,5 - 7,2 (đôi khi đến 7,7).

Các loài *Azotobacter* khác nhau (thậm chí các nòi khác nhau có thể lẫn cảm một cách khác nhau đối với pH của môi trường. pH thấp nhất của môi trường đối với *Az. chroococcum* và *Az. beijerinckii* là khoảng 5,5, đối với *Az. macrocytogenes* là khoảng 4,6.

pH thích hợp nhất đối với *Azotobacter* là 7,2 - 8,2. Sinh khối *Az. chroococcum*, *Az. agile*, *Az. vinelandii* đạt tới mức cao nhất khi nuôi cấy ở phạm vi pH = 6,5 - 6,7. *Azotobacter* thường ít thấy trong các đất có pH thấp hơn 5,6 - 5,8. Cũng có thể phân lập được từ đất chua một số nòi *Azotobacter* nhưng các nòi này thường đã mất khả năng cố định nitơ phân tử.

Các điều tra ở đất Việt Nam cho biết khi pH đất thấp hơn 5,5 sự phát triển của *Azotobacter* bị hạn chế một cách rõ rệt. Trong khi đó ở các đất có pH trung tính *Azotobacter* luôn luôn có từ hàng nghìn đến hàng vạn tế bào trong mỗi gam đất khô.

❖ Nồng độ muối

Azotobacter thuộc loại vi khuẩn có khả năng chịu được những nồng độ muối khá cao. Người ta nhận thấy *Azotobacter* có thể phát triển được ngay cả trong các môi trường có chứa tới 2,5 - 3% NaCl. Có tài liệu cho biết *Azotobacter* có thể phát triển được cả ở những môi trường chứa đến 10,27% MgSO₄.

Người ta đã phân lập được những nòi *Azotobacter* ưa mặn. Nồng độ NaCl thích hợp nhất đối với chúng là 3 - 5%. Chúng có thể chịu đựng được ngay đến cả nồng độ 9% NaCl. Trong nước biển và bùn biển cũng thường thấy có *Azotobacter* ưa mặn, chúng có thể cố định N₂ ngay cả ở nồng độ 3% NaCl.

❖ Oxy

Azotobacter thuộc loại vi khuẩn hiếu khí nhưng chúng có thể phát triển được cả trong các điều kiện vi hiếu khí. Quá trình cố định nitơ của *Azotobacter* bị giảm xuống khi thế oxy hóa khử của môi trường cao quá +200 mV hoặc thấp quá -200 mV. Như vậy là không khí quá mạnh cũng làm ức chế quá trình cố định nitơ phân tử. Khi nồng độ oxy trong không khí là 4 % thì quá trình cố định nitơ vượt quá gấp ba lần so với khi nồng độ oxy là 10 - 20%.

❖ Độ ẩm

Để phát triển thuận lợi *Azotobacter* đòi hỏi một độ ẩm khá cao của đất. Nhu cầu về độ ẩm của chúng tương tự như nhu cầu của cây trồng. Tuy vậy bào xác (kyste) của *Azotobacter* vẫn còn có thể chịu đựng được rất lâu dài đối với sự khô hạn của đất.

❖ Nhiệt độ

Nhiệt độ thích hợp nhất đối với sự phát triển của *Azotobacter* là vào khoảng 26 - 30°C. Ở vùng nhiệt đới người ta nhận thấy *Azotobacter* thích hợp với những nhiệt độ cao hơn nữa. Ví dụ như một số nòi phân lập ở Ấn Độ thích hợp nhất với nhiệt độ 35 - 40°C. Ở nhiệt độ 7°C người ta nhận thấy *Azotobacter* có hoạt động cố định nitơ thấp hơn 5 lần so với ở nhiệt độ 45°C. Tế bào dinh dưỡng của *Azotobacter* không sống được khi xử lý ở 50°C trong 30 phút, ở 80°C sẽ chết rất nhanh.

❖ Mối quan hệ với vi sinh vật và cây trồng

Sự phát triển và cố định nitơ của *Azotobacter* trong đất còn chịu ảnh hưởng mật thiết của khu hệ các vi sinh vật đất. Bên cạnh các nhóm vi sinh vật có ảnh hưởng tốt đối với sự phát triển của *Azotobacter* (tổng hợp các chất hoạt động sinh học, phân giải các thức ăn hữu cơ bền vững) còn có nhiều nhóm vi sinh vật có khả năng làm ức chế sự phát triển của *Azotobacter* (cạnh tranh thức ăn, sản sinh chất kháng sinh,...). Người ta cũng đã phát hiện thấy sự phá hủy tế bào *Azotobacter* của một số loại thực khuẩn thể.

Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu đề cập đến mối quan hệ giữa *Azotobacter* và cây trồng. *Azotobacter* thường xuyên có mặt trong vùng rễ

(rhizosphere) cây trồng với số lượng cao hơn nhiều so với ngoài vùng rễ. Số lượng của chúng còn biến đổi phụ thuộc vào từng loài cây, từng giai đoạn phát triển của cây và nhiều yếu tố sinh thái - địa lý khác. Người ta đã chứng minh được rằng *Azotobacter* không phát triển trên bề mặt rễ mà phát triển trong đất chung quanh rễ (vùng rễ).

2.2.4 Tác dụng của vi khuẩn *Azotobacter*

Azotobacter có tác dụng làm tăng cường thức ăn nitơ cung cấp cho cây trồng. Trung bình khi tiêu thụ hết 1 g các chất sinh năng lượng, *Azotobacter* có khả năng đồng hóa được khoảng 10 - 15 mg nitơ phân tử. Cày vùi rơm rạ hoặc bón phân xanh vào cho ruộng sẽ góp phần cung cấp nguồn năng lượng cho *Azotobacter* và thông qua hoạt động của *Azotobacter* mà làm giàu thêm nitơ cho đất. Các biện pháp kỹ thuật như bón vôi để trung hòa đất, bón phân lân, tưới nước, làm ải, phơi đất,... đều làm tăng cường rõ rệt sự phát triển và hoạt động cố định nitơ của *Azotobacter* trong đất.

Tác dụng của *Azotobacter* đối với cây trồng còn được chứng minh ở khả năng kích thích sinh trưởng của chúng. Những thí nghiệm nhiễm dịch nuôi cấy *Azotobacter* lên hạt cho thấy có khả năng làm nâng cao rõ rệt tỷ lệ nảy mầm cũng như tốc độ phát triển của mầm hạt. Người ta cho rằng sở dĩ có tác dụng này là do *Azotobacter* có khả năng làm tích lũy trong môi trường nuôi cấy nhiều loại chất hoạt động sinh học có giá trị. Một số nghiên cứu cho biết khi trong môi trường tích lũy được khoảng 1 g tế bào *Azotobacter* (tính theo chất khô) thì cũng đã tích lũy được một số ít các chất sau: tiamin, acid nicotinic, acid panjotenic, pyridoxin, biotin... *Azotobacter* còn có khả năng tổng hợp các chất sinh trưởng loại auxin và gibberellin. *Azotobacter* có cả khả năng tổng hợp ra một số chất chống nấm, khả năng tích lũy các chất chống nấm này không giống nhau ở các nòi *Azotobacter* khác nhau.

Trong nhiều năm ở nhiều nước khác nhau, người ta đã sản xuất ở quy mô công nghiệp hoặc thủ công nghiệp những chế phẩm *Azotobacter* và gọi là Azotobacterin. Đó là những dịch nuôi cấy *Azotobacter* được hấp thụ vào than bùn

hoặc các loại đất giàu chất hữu cơ đã trung hòa và bổ sung thêm một ít phân phospho kali...

Loại phân Azotobacterin khi dùng để bón cho cây trồng thường đưa đến những hiệu quả không lớn và không ổn định (nếu có làm tăng sản lượng thường cũng không tăng quá 10% so với đối chứng). Đa số các tác giả cho rằng hiệu quả của việc sử dụng Azotobacterin chỉ tương đối rõ đối với các loại đất giàu chất hữu cơ hoặc trong trường hợp được bón thêm nhiều phân khoáng. Có lẽ tác dụng chủ yếu của chúng không phải ở khía cạnh cố định nitơ mà là ở khía cạnh tổng hợp các chất hoạt động sinh học có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của cây trồng.

Trong điều kiện nước ta, một số nghiên cứu đã cho biết nhân tố chủ yếu hạn chế sự phát triển của *Azotobacter* trong đất là pH, hàm lượng calci và hàm lượng phospho. Chỉ cần bón vôi và bón phân lân đã đủ làm tăng nhanh chóng số lượng *Azotobacter* trong đất. Biện pháp sản xuất và sử dụng chế phẩm từ *Azotobacter* chỉ nên đặt ra trong những điều kiện thâm canh có khả năng đòi hỏi về phân bón.

2.3 VI KHUẨN BEIJERINCKIA [1]

2.3.1 Phân loại [23]

Giới: Bacteria

Ngành: Proteobacteria

Lớp: Alpha Proteobacteria

Bộ: Rhizobiales

Họ: Beijerinckiaceae

Beijerinckia là một giống vi khuẩn hiếu khí cố định nitơ rất giống với *Azotobacter*. Năm 1939 Stackê (R. J. Starkey, P. K. De) phân lập được từ nitơ chịu chua và gọi là *Azotobacter indicum*. Năm 1950, H. G. Derx cũng tìm thấy loại vi khuẩn này nhưng chúng thuộc về một giống mới, giống *Beijerinckia*.

Một số tác giả cho rằng giống *Beijerinckia* (thuộc họ *Azotobacteriaceae*), bao gồm 3 nhóm:

1. Nhóm *Beijerinckia indica* (các loài *B. indica*, *B. lacticogenes*, *B. mobilis* đều thuộc về nhóm này). Theo hệ thống phân loại Bergey (1974) thì hai loài *B. indica* và *B. lacticogenes* thực ra chỉ là một.
2. Nhóm *Beijerinckia fluminensis*.
3. Nhóm *Beijerinckia derxii* (có các loài rất giống nhau: *B. perxii*, *B. acida* và *B. cogensis*)

Đặc điểm chung của các vi khuẩn thuộc giống *Beijerinckia* là chịu chua cao hơn nhiều so với *Azotobacter* (có thể phát triển được ngay cả trong các môi trường có pH = 3,0. Tế bào của chúng có hình dạng thay đổi (hình cầu, hình trái xoan, hình que), khi già có thể tạo nên những hình thái rất khác thường.

Beijerinckia thuộc loại vi khuẩn Gram âm, khi quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy ở hai đầu tế bào có những hạt bắt màu với thuốc nhuộm Xudăng III, không sinh bào xác và bào tử. *Beijerinckia* phát triển chậm trên môi trường nuôi cấy (thời kỳ dài đến 3 - 15 ngày), khuẩn lạc điển hình thường được tạo thành sau khi nuôi cấy ở 30°C qua ba tuần lễ. Khi phát triển trên các môi trường vô đạm chứa glucoza, *Beijerinckia* thường tạo thành những khuẩn lạc lồi và rất nhầy, khi già mới tạo sắc tố. Sự khác nhau giữa 3 nhóm *Beijerinckia* có thể được trình bày như sau:

- a. *B. indica* : Tế bào có kích thước khoảng 0,5 - 1,5 x 1,7 - 3,0 μm, di động hoặc không di động, có khả năng sinh sắc tố khi già, sắc tố có màu từ đỏ đến nâu, sắc tố không khuếch tán vào môi trường. Khuẩn lạc có dạng hơi lồi, mép phẳng, khá nhầy. Có tốc độ cố định nitơ phân tử nhanh.
- b. *B. fluminensis* : Tế bào có kích thước khoảng 1,1 - 1,5 x 3,0 - 3,5 μm, di động, có khả năng sinh sắc tố màu nâu-nâu tối. Khuẩn lạc có mép không phẳng, khô, rắn và có cấu tạo hạt. Trên môi trường lỏng không hoặc ít tạo thành lớp nhầy. Có tốc độ cố định nitơ tương đối chậm.
- c. *B. derxii* : Tế bào có kích thước khoảng 1,5 - 2,0 x 3,5 - 4,5 μm, không di động, sinh sắc tố thường có màu vàng lục huỳnh quang, trên môi trường chứa muối của các acid hữu cơ sinh sắc tố màu hồng, sắc tố không khuếch

tán vào môi trường. Khuẩn lạc tròn, mép phẳng, lồi, nhầy, thường có tốc độ cố định nitơ chậm.

2.3.2 Đặc điểm sinh học

Vi khuẩn thuộc giống *Beijerinckia* thường có thể cố định được 16 - 20 mg nitơ phân tử khi đồng hóa hết 1g các chất sinh năng lượng. Một số nghiên cứu cho biết năng lực cố định nitơ của *B. indica*, *B. fluminensis* được tăng lên nhiều khi có mặt loài nấm men *Lipomyces starkey* (Y. Dommergues, 1965). *Beijerinckia* thuộc loại vi khuẩn hiếu khí bắt buộc, chúng đồng hóa tốt các loại monosaccharide, disaccharide và tinh bột, ít đồng hóa acid hữu cơ. Khác với *Azotobacter*, *Beijerinckia* không đồng hóa các hợp chất thơm (như: benzoat natri, acid benzoic,...).

Khả năng đồng hóa N - NH₄, N - NO₃ và nhiều acid amin ở *Beijerinckia* còn cao hơn cả khả năng đồng hóa nitơ phân tử.

Beijerinckia bắt đầu phát triển được khi nồng độ PO₄²⁻ trong 100 ml môi trường có từ 0,2 mg trở lên (trong khi *Azotobacter* đòi hỏi 4,0 mg PO₄²⁻ trở lên). Để phát triển và cố định nitơ *Beijerinckia* không đòi hỏi calci (khác với *Azotobacter*). Một lượng nhỏ calci (22,5 phần triệu CaCl₂) đã đủ làm ức chế sự phát triển của *Beijerinckia*.

pH thích hợp nhất đối với *Beijerinckia* là 4,5 - 6,0, nhiều loài *Beijerinckia* ngay ở pH = 3,0 vẫn phát triển được. Khi pH = 7,0 sự phát triển của *Beijerinckia* bị ức chế một cách rõ rệt (trong khi đó *Azotobacter* thường không phát triển được ở pH thấp hơn 5,5 trừ một vài loài đặc biệt như *Az. macrocytogenes* hay *Az. beijerinckia acidotolerans*).

Beijerinckia có thể phát triển được trong phạm vi nhiệt độ 16 - 37°C (đối với *Azotobacter* là 16 - 45°C). Chúng có khả năng giữ sức sống khá lâu ở 0°C hoặc các nhiệt độ thấp hơn nữa. Một số nghiên cứu cho biết thời kỳ tiềm phát (lag phase) là ngắn nhất khi nuôi cấy *Beijerinckia* ở nhiệt độ 30 - 35°C và ở pH = 4,5 - 5,3.

Vi khuẩn thuộc giống *Beijerinckia* phân bố rộng rãi trong các đất vùng nhiệt đới. Người ta đã phát hiện thấy chúng ở Ấn Độ, ở Mã Lai (Malaysia), ở Indonesia,

ở Nhật Bản, ở Trung Quốc, ở Madagasca, ở Tanjania, ở Bắc Úc, ở Braxin, ở Bắc Phi và Nam Phi. Tại Việt Nam, một số tác giả đã phát hiện thấy sự tồn tại của *Beijerinckia* trong một mẫu đất của vùng Lào Cai, đáng chú ý là loài *Beijerinckia* này mang một số đặc tính khác với các loài *Beijerinckia* thông thường.

Nghiên cứu của J. H. Becking, 1961 cho biết trong số 155 mẫu đất thu thập ở Châu Âu chỉ có hai mẫu được phát hiện thấy có *Beijerinckia*, nhưng trong số 53 mẫu đất thu thập ở Châu Phi có tới 30 mẫu có chứa *Beijerinckia*.

Một số nghiên cứu cho biết sự tồn tại của *Beijerinckia* có thể được coi là một chỉ thị cho quá trình laterit hóa của đất.

So với *Azotobacter*, *Beijerinckia* có nhu cầu nhỏ hơn nhiều đối với Mg (khoảng 20 lần nhỏ hơn) và đối với Mo (nồng độ Mo thích hợp nhất chỉ vào khoảng 0,004 - 0,034 mg/l).

Beijerinckia có thể chịu đựng được các nồng độ cao của muối sắt (đến 2 g/l) và muối nhôm (đến 80 mg/l).

Beijerinckia thường phát triển trong lớp đất cây (0 - 20 cm), nhưng cũng có khi phát hiện thấy sự phát triển của *Beijerinckia* ở cả các lớp đất sâu hơn. Nhiều tác giả còn quan sát thấy lối sống biểu sinh (epiphyte) của *Beijerinckia* trên lá nhiều loại cây nhiệt đới.

Ngoài ý nghĩa kinh tế do có khả năng cố định nitơ phân tử, *Beijerinckia* còn đáng chú ý cả ở chỗ chúng có thể tổng hợp ra một số chất hoạt động sinh học có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của cây trồng.

2.4 NƯỚC RỈ RÁC

2.4.1 Nguồn gốc

❖ Định nghĩa

Nước rỉ rác từ các bãi chôn lấp có thể được định nghĩa là chất lỏng thấm qua các lớp chất thải rắn mang theo các chất hòa tan hoặc các chất lơ lửng. Trong hầu hết các bãi chôn lấp nước rò rỉ bao gồm chất lỏng đi vào bãi chôn lấp từ các nguồn

bên ngoài, như nước mưa, nước mặt, nước ngầm và chất lỏng tạo thành trong quá trình phân hủy các chất thải.

❖ Sự phát sinh

Một trong những nguồn gây ô nhiễm lớn nhất đến môi trường nước (nước ngầm và nước mặt) là nước rò rỉ.

Nước rò rỉ phát sinh khi chất lỏng tiếp xúc với chất thải rắn. Chất lỏng ở đây là nước mưa, nước mặt, nước ngầm, nước chảy tràn và nước từ quá trình phân hủy chất thải. Đây là hậu quả không thể tránh khỏi đối với các bãi chôn lấp chất thải, nhất là chất thải rắn sinh hoạt.

Nước thấm vào bãi chôn lấp đầu tiên sẽ bị hấp phụ bởi các chất thải rắn còn có khả năng hấp phụ tiếp, nhưng khi chất thải đã bão hòa nước, nước thấm qua chất thải rò rỉ ra ngoài và lúc này mang theo các chất gây ô nhiễm trong quá trình phân hủy rác thải tại bãi chôn lấp. Nồng độ chất ô nhiễm trong nước phụ thuộc vào khối lượng các chất thấm nước trong chất thải rắn, thành phần các chất dễ hòa tan, độ dày của chất thải và tốc độ thấm, còn phải nói đến một số yếu tố ảnh hưởng khác như diện tích bề mặt, thời gian tiếp xúc và pH.

2.4.2 Đặc điểm

Các số liệu phân tích thành phần hóa học của nước rò rỉ thay đổi rất lớn phụ thuộc vào tuổi của bãi chôn lấp và khí hậu tại thời điểm lấy mẫu. Cụ thể như sau:

- Nước rò rỉ trong giai đoạn phân hủy lên men acid sẽ có giá trị pH thấp và nồng độ BOD, COD, chất dinh dưỡng, kim loại nặng sẽ rất cao.
- Nước rò rỉ trong giai đoạn phân hủy lên men methane, giá trị pH trong khoảng 6,5 - 7,0 và nồng độ BOD, COD, chất dinh dưỡng, kim loại nặng thấp đi đáng kể vì hầu hết kim loại nặng hòa tan kém ở giá trị pH trung hòa.

- Nếu bãi chôn lấp có sử dụng vôi để khử mùi, nước rò rỉ sẽ có pH khá cao lên đến 8,5 - 9,0 và nồng độ các chất rắn hòa tan tăng đáng kể (15.000 - 20.000 mg/L).
- Nồng độ chất ô nhiễm của nước rò rỉ cũng phụ thuộc rất lớn vào lượng nước mưa thấm vào bãi chôn lấp, lượng nước mưa càng lớn nồng độ chất ô nhiễm càng nhỏ.

Bảng 2.2 Thành phần nước rỉ từ bãi chôn lấp Gò Cát

STT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Nồng độ
1	pH	-	7,8 - 8,6
2	COD	mgO ₂ /L	1127 - 1534
3	BOD	mgO ₂ /L	275 - 412
4	SS	mg/L	244 - 4311
5	NH ₃	mg/L	890 - 1090
6	N tổng	mg/L	1981 - 2695
7	P tổng	mg/L	14,9 - 21,5
8	SO ₄ ²⁻	mg/L	159
9	Ca ²⁺	mg/L	2739
10	Fe tổng	mg/L	27
12	Mg ²⁺	mg/L	687
13	Cu	mg/L	4,0
14	Zn	mg/L	93
15	Mn	mg/L	32,17
16	Ni	mg/L	2,211
17	Cr tổng	mg/L	0,05
18	Cd	mg/L	0,1
19	Pb	mg/L	1,9
20	Coliform	MNP/100ml	406*10 ³

Nguồn: CENTEEMA, 08/2003

Qua bảng 2.2 cho thấy thành phần nước rỉ rác rất đa dạng, chứa nhiều chất nguy hại có hàm lượng rất cao vượt qua ngưỡng TCVN cho phép thải ra môi trường. Gây tác động lan truyền ô nhiễm đến chất lượng nước ngầm, nước bề mặt. Tác hại trực tiếp và bao trùm lên đời sống của người dân đang sống xung quanh bãi chôn lấp này là mùi hôi, mầm mống của bệnh tật ảnh hưởng lâu dài đến sức khỏe người dân.

Bên cạnh đó môi trường đất tại bãi chôn lấp cũng bị ô nhiễm, do nước rỉ rác ngấm vào đất làm thay đổi thành phần của đất, ảnh hưởng đến việc tạo môi trường xanh cho khu đất khi bãi chôn lấp đang vận hành và khi ngừng hoạt động.

2.4.3 Bãi chôn lấp Gò Cát

➤ Vị Trí Bãi Chôn Lấp

Bãi chôn lấp Gò Cát được xây dựng trên lô đất thuộc xã Bình Hưng Hòa, huyện Bình Chánh, giáp ranh với huyện Hooc Môn và quận Tân Bình, có diện tích 25 ha. Phía Tây là quốc lộ 1A. Phía Bắc là vùng hồ đầm hoang, một phần diện tích được dân định cư cải tạo làm hồ nuôi cá. Phía Đông và Đông Bắc là kênh Nước Đen với khu dân cư mới phát triển dọc bên kia bờ kênh. Phía Nam là đầm nước khoảng 6 ha không canh tác có lục bình phủ kín toàn bộ bề mặt nước.

➤ Điều Kiện Tự Nhiên

❖ Gió

Có hai hướng gió chính, mùa khô gió Đông - Đông Nam (gió chướng) và mùa mưa gió Tây - Tây Nam, vận tốc trung bình 3 - 4 m/s. gió thường thổi mạnh từ trưa sang chiều. Gió chướng thường thổi mạnh vào trưa sang chiều. Gió chướng thổi mạnh làm gia tăng sự xâm nhập mặn vào sâu trong lục địa trong mùa khô và tăng mực nước đỉnh triều lên vài cm. Ở TP.HCM ít có bão, thường chỉ bị ảnh hưởng của áp thấp nhiệt đới hay bão ở miền Trung gây mưa lớn ở khu vực thành phố. Các số liệu theo dõi cho thấy trong thời gian quan trắc (100 năm) vị trí này không xảy ra lũ lụt.

❖ Độ ẩm tương đối

Các tháng mùa mưa độ ẩm khá cao, độ ẩm trung bình các tháng mùa mưa vào khoảng 79 - 83%, cao nhất là các tháng 9, 10 khoảng 83%, trong đó các tháng có độ ẩm trung bình thấp nhất là tháng 1 và tháng 3 khoảng 67%.

❖ Lượng mưa

Mùa mưa chiếm khoảng 84% tổng lượng mưa cả năm. Mưa lớn tập trung vào tháng 6, 8, 11. lượng mưa tháng cao nhất lên đến 466,6 mm (tháng 6). Mưa ở thành phố Hồ Chí Minh mang tính mưa rào nhiệt đới: mưa đến nhanh và kết thúc cũng

nhanh, thường một cơn mưa không kéo dài đến 03 giờ nhưng cường độ mưa khá lớn và dồn dập.

➤ **Điều kiện thủy văn**

Rạch Nước Đen là nguồn tiếp nhận nước thải từ trạm xử lý nước rò rỉ của bãi chôn lấp này. Đây là một con rạch nối liền với hệ thống kênh đào 19 - 5 và kênh Tham Lương ở phía Bắc chảy ra sông Sài Gòn, đoạn chảy ra phường 15 Tân Bình và phía Nam nối với hệ thống sông Tân Hóa - Lò Gốm chảy vào rạch Cần Giuộc và sông Chợ Đệm. Ngoài ra con rạch này cũng thông với nhiều hồ đầm trong địa bàn xã Bình Hưng Hòa. Có thể thấy rạch Nước Đen nằm ở giữa hai đầu của hai nhánh kênh thoát nước thải của thành phố hay nói cách khác có thể xem như đây là thượng nguồn của hai nhánh kênh Tham Lương và kênh Tân Hóa nên dòng chảy thay đổi theo thủy triều lên xuống đồng thời ở cả hai đầu rạch, do đó có sự tích tụ chất thải ở đoạn kênh này làm nước bị ô nhiễm, đen kịt và có mùi hôi thối.

Bảng 2.3 Thành phần chất thải rắn của bãi chôn lấp Gò Cát

STT	Thành phần	Khối lượng (%)
1	Thực phẩm	68,9 - 75,6
2	Nylon	12,6 - 45,4
3	Nhựa	1,0 - 8,0
4	Vải	1,5 - 13,3
5	Gỗ	2,5 - 4,5
6	Giấy	0,0 - 5,4
7	Thủy tinh	0,0 - 2,0
8	Kim loại	0,0 - 2,0
9	Da	0,0 - 1,0
10	Sành sứ	0,0
11	Carton	0,0 - 2,5
12	Lon đồ hộp	0,0
13	Cao su mềm	0,0 - 1,8
14	Mốp xốp	0,0 - 1,0
15	Bã sơn	-
16	Mica	-

Nguồn: CENTEEMA, 08/2003

Thành phần chất thải rắn ảnh hưởng đến thành phần và tính chất của nước rỉ rác, vì bãi chôn lấp có thể được xem là nơi xảy ra nhiều phản ứng sinh hoá và hoá học, nên trong thời gian hoạt động, thành phần nước rò rỉ có xu hướng tăng dần nồng độ các chất khó phân huỷ. Bên cạnh đó nước ta là nước nhiệt đới gió mùa với

lượng mưa trung bình hàng năm khá lớn nên lượng nước mưa cũng ảnh hưởng nhiều đến thành phần nước rò rỉ. (Nguồn trích dẫn tài liệu: Báo cáo xử lý nước rỉ rác của Sở KHCN, 2004).

Bảng 2.4 Các thông tin về nước rỉ rác trên bãi chôn lấp rác Gò Cát tính đến ngày 19/06/2004

Lượng nước rỉ rác (m ³)	Lượng nước đã xử lý (m ³)	Lượng nước còn tồn đọng (m ³)
378.000	124.312	253.688



Hình 2.3 Suối hình thành từ nước rỉ rác

2.5 TINH DẦU TỪ CỎ VETIVER [2]

2.5.1 Bản chất của tinh dầu

Tinh dầu là những hỗn hợp khác nhau của những chất bốc hơi nguồn thực vật (rất ít khi nguồn động vật), các chất này thường có mùi thơm và thành phần hóa học, cấu tạo, tính chất, điểm chảy, điểm sôi, độ tan trong nước hay trong các dung môi rất khác nhau, phần lớn không tan, chính xác là ít hay rất ít tan trong nước. Các hợp phần của TD hòa tan lẫn nhau. Nếu một lượng TD nào đó là một khối đồng nhất (một pha) bắt đầu sôi ở một nhiệt độ phụ thuộc thành phần và tỷ lệ các hợp phần.

2.5.2 Các hợp phần của tinh dầu

Phần lớn các hợp phần của TD có mùi thơm, một số có tính chất sinh lý đặc biệt. Giá trị của các hợp phần về từng mặt rất khác nhau, ví dụ có hợp phần là chất quyết định hương vị chủ yếu của tinh dầu, có hợp phần không đưa lại hương vị chủ yếu nhưng lại rất cần thiết để cố định (giữ) mùi thơm hay cần thiết cho sự hòa hợp mùi, làm tinh dầu có mùi rất tinh tế, nhiều khi các nước hoa pha chế bằng cách trộn các hợp chất thơm thiên nhiên tổng hợp không sao đạt được; có hợp phần có rất ít mùi hay không có mùi, thậm chí có hợp phần lại có mùi làm hại hương vị chung cần loại đi.

Về mặt hóa học các hợp phần chủ yếu thuộc các loại hợp chất sau: các hydrocarbon (loại hợp phần ít giá trị nhất, nhiều khi người ta tìm cách loại ra), các rượu este (loại hợp chất rất phổ biến của các TD và là nguồn mùi thơm quan trọng), các phenol và ete của phenol (hai loại hợp phần quan trọng của một số TD, nguồn thơm quan trọng của chúng và là những hợp chất được dùng trong một số tổng hợp các mỹ phẩm), các aldehyt và các xeton (hai loại hợp phần cũng có nhiều trong TD và có vai trò quan trọng bậc nhất trong mùi thơm), ngoài ra còn có loại hợp chất khác như các acid tự do, các hợp chất nito... Trong mỗi TD có rất nhiều hợp phần khác nhau, nhưng nhiều hợp phần có hàm lượng rất nhỏ. Mỗi loại TD có từ vài đến 10 - 20 hợp phần đáng kể về mặt hàm lượng hay về mặt giá trị sử dụng. Trong các mẫu khác nhau của cùng một loại TD (cùng tên) nhưng có nguồn gốc khác nhau, thành phần và hàm lượng các hợp phần cũng không nhất thiết giống nhau.

2.5.3 Tinh dầu trong vật liệu thực vật

Tinh dầu cũng như các chất nguồn thực vật khác được tạo thành trong quá trình sinh trưởng của cây và tích tụ lại trong một hay một số bộ phận của cây (như hoa, lá, vỏ, rễ, thân...), phân bố không đồng đều. TD rất ít khi tự do ở bên ngoài (vì nếu có nó sẽ nhanh chóng bay hơi hết, không tích tụ lại được) mà thường nằm ở các khoảng trống bên trong tế bào hay ở các túi, các hạch tinh dầu, ngăn cách với bên ngoài bằng một màng (còn gọi là tế bào có TD hay túi TD). Những túi TD có thể ở ngoài mặt hay nằm bên trong mô thực vật. Nếu túi nằm ngoài mặt mô mà màng

mỏng manh (như các lông TD trên lá hay cánh hoa trong một số trường hợp) thì màng này rất dễ vỡ ra và người ta dễ ngửi thấy mùi TD. Nhưng thường thì cần một tác động để làm vỡ túi nếu không TD bị giữ lại trong túi không khuếch tán ra được. Trong túi, TD lẫn với nước, túi lại nằm trong mô thực vật có nước, điều này ảnh hưởng đến việc chưng cất TD.

2.5.4 Các phương pháp lấy tinh dầu

Muốn dùng TD, người ta tách nó ra khỏi vật liệu thực vật có chứa các túi TD bằng các biện pháp khác nhau thích hợp cho từng loại TD về mặt kỹ thuật và về mặt kinh tế.

2.5.4.1 Phương pháp ép vật liệu thực vật

Trường hợp chỉ cần ép vật liệu thực vật cũng đủ phá vỡ các màng cho TD chảy ra, mà hàm lượng TD trong vật liệu tương đối lớn và TD có giá trị cao không cần thu hồi thì người ta dùng phương pháp ép vì nó rẻ tiền, tuy nhiên ép thì không lấy kiệt TD và TD kéo theo cả những chất không bốc hơi như dầu béo, nhựa, nên sau đó phải làm sạch TD thu được. Phương pháp này dùng để lấy TD từ vật liệu ở vỏ (như vỏ chanh).

2.5.4.2 Dùng một lồng hay rần để trích ly tinh dầu

Trong một số trường hợp, do điều kiện đặc biệt, người ta dùng một lồng hay rần để trích ly TD rồi sau đó tách TD ra khỏi lồng hay rần đó. Phương pháp này có một số ưu điểm đặc biệt, có khi bắt buộc phải dùng nó để lấy TD nhưng phức tạp và đắt tiền nên ít dùng. Phương pháp này chủ yếu dùng cho TD từ một số hoa (như hoa nhài, hoa hồng).

➤ Phương pháp trích ly bằng dung môi bốc hơi (ete, ete dầu hỏa, benzen, rượu)

Nguyên tắc là cho vật liệu thực vật vào thiết bị chiết xuất ở nhiệt độ 60 - 80°C với dung môi đã tinh chế (để không để mùi lại cho TD). Dung môi hòa tan TD và cả một ít sáp, chất màu, chất Albumin. Người ta cho dung dịch bay hơi ở nhiệt độ thấp thì thu được TD lẫn sáp, Albumin, chất màu...sau đó phải làm sạch.

Phương pháp này đắt vì quá trình về thiết bị phức tạp, cần tay nghề cao của công nhân, giá dung môi lại đắt, nên chỉ dùng cho các vật liệu đắt tiền, cất bằng hơi nước không được hay không tốt (như hoa Acacia, Mimosa, Violette, quả Vanille, rễ Iris, nhựa Benzoin...).

➤ **Phương pháp trích ly bằng dung môi không bốc hơi**

Người ta ngâm vật liệu trong mỡ nóng chảy ở 80°C, để nguội 1 giờ, lại đun nóng chảy để tách bã vật liệu ra. Dung môi là mỡ, dầu olive, dầu paraffine. Phương pháp này trước kia dùng nhiều cho hoa Acacia và một số hoa khác, nay ít được dùng hơn.

➤ **Phương pháp trích ly bằng mỡ lạnh (ướp hoa)**

Có một số hoa (nhài, Tuberose) sau khi đã hái còn tiếp tục tạo ra TD một thời gian nữa nhưng TD các hoa đó rất dễ bay hơi nên không thể chờ cho quá trình tạo TD hoàn thành mới lấy. Còn nếu cất ngay bằng hơi nước hay nếu trích ly ngay bằng các phương pháp khác thì cánh hoa bị chết, không tiếp tục tạo ra TD nữa. Để trích ly người ta dùng chất nào hấp thu ngay TD sẵn có và hấp phụ dần TD được tạo ra. Chất ấy là mỡ động vật (có thành phần phù hợp theo kinh nghiệm). Mỡ thực vật không dùng được vì nó gồm các hợp chất không no dễ bị hỏng. Mỡ khoáng vật hấp phụ kém, lại để mùi trong TD. Người ta đặt những cánh hoa dưới những lớp mỡ và để một thời gian 24 giờ cho hoa tiếp tục tạo TD, và mỡ hấp phụ hết TD đó. Sau 24 giờ người ta thay các cánh hoa mới và phải thu hơi mỡ có hấp phụ TD dính vào các cánh hoa thải ra, cứ thế nhiều ngày (hơn 1 - 2 tháng) để mỡ tích tụ được nhiều TD. Mỡ lấy ra có thể dùng ngay trong công nghệ mỹ phẩm hoặc có thể dùng rượu để hòa tan TD và tiếp tục xử lý thêm. Phương pháp này tốt, nó giữ được nguyên mùi của TD nhưng phức tạp và đắt tiền, nên chỉ dùng cho các hoa cho TD có giá trị cao (như hoa hồng, các hoa tiếp tục tạo TD sau khi hái).

2.5.4.3 Phương pháp cất bằng hơi nước

Phương pháp phổ biến nhất và cũng dùng cho nhiều loại TD nhất, là phương pháp cất bằng hơi nước. Hơi nước được đưa qua khối vật liệu thực vật, tiếp xúc với TD làm TD bay hơi, hơi ấy được kéo theo lẫn với hơi nước (người ta nói là hơi

nước được bão hòa hơi TD). Hỗn hợp hơi nước và TD kéo theo như thế được đưa sang bộ phận làm lạnh và ngưng, ở đó nó ngưng lại. Khối ngưng được lắng, tách thành những lớp nước và TD riêng không hòa tan vào nhau, vì hơi nước kéo hơi TD đi nên người ta còn gọi là phương pháp cất kéo TD bằng hơi nước.

2.5.5 Tinh dầu cỏ Vetiver [14,9,10]

Tinh dầu từ cỏ Vetiver có mùi hương ngọt ngào và dễ chịu, đã được sử dụng trong rất nhiều các sản phẩm của ngành công nghiệp hương liệu. Hàm lượng TD ở bộ rễ nằm trong khoảng 2 - 2,5% tính theo trọng lượng khô của rễ và dùng để sản xuất ra loại nước hoa Pure Vetiver với giá tới 880.000 đồng/125ml (Nguyễn Lâm Dũng, 2005).

Người ta thường chưng cất TD cỏ Vetiver từ bộ rễ hoặc cũng có thể chiết xuất TD từ lá của cỏ.

➤ Chưng cất từ lá:

- Lá được sử dụng phải còn tươi, sau đó phơi khô hoặc cắt nhỏ ra, cũng có thể được lên men trước khi đưa vào quy trình ly trích.
- Vật liệu được chuẩn bị xong sẽ cho vào thùng chứa 2/3 lượng nước nóng với nắp đậy kín, đun ở nhiệt độ cao, trên 100°C trong một thời gian tương đối dài.
- Nhiệt độ trên sẽ làm cho các hợp chất phức tạp trở nên không bền và sẽ bốc hơi cùng với các thành phần bay hơi khác.
- Thùng chứa vật liệu được nối với một thiết bị làm lạnh sẽ ngưng tụ các thành phần bay hơi từ thùng chứa.
- Các thành phần bay hơi sau khi ngưng tụ được chuyển vào một bể trong (có thể làm bằng kính), tại đây nước chưng cất và TD được thu nhận.
- Tinh dầu sẽ nổi lên trên và ta có thể thu nhận được bằng tay, số lượng TD được thu nhận nằm trong khoảng 2 - 3% lượng nước chưng cất.

➤ Chung cất từ rễ: bộ rễ chứa hàm lượng TD lớn với nồng độ cao của các chất như bicyclic và tricyclic sesquiterpenes, hydrocarbon, alcohol và carboxylic acids.

- Thu lấy rễ, rửa sạch và phơi khô để giảm hàm lượng nước.
- Cho vào thùng có chứa 2/3 lượng nước tính theo trọng lượng.
- Chung cất giống như phương pháp chung cất từ lá ở trên.

Bảng 2.5 Thành phần tinh dầu từ rễ cỏ Vetiver

Thành phần	Phần trăm (%)
terpinen-4-ol	3,75
5-epiprezizane	0,71
khusimene	0,66
α -muurolene	1,14
khusimone	1,49
calacorene	0,94
β -humulene	2,37
α -longipinene	4,20
γ -selinene	1,43
δ -selinene	4,63
δ -cadinene	4,72
valencene	2,30
calarene,-gurjunene	9,84
α -amorphene	2,07
epizizanal	3,33
3-epizizanol	2,97
khusimol	12,71
Iso-khusimol	0,57
Valerenol	3,93
β -vetivone	1,62
α -vetivone	2,02

(Giống cỏ Sri Lanka)

2.5.6 Tác dụng của tinh dầu từ cỏ Vetiver [17]

❖ **Hương liệu:** TD được sử dụng để sản xuất xà phòng, nước thơm, chất khử mùi, nước hoa, mỹ phẩm...

❖ **Kiểm soát côn trùng:** sử dụng TD có thể bảo vệ quần áo khỏi sâu, bướm, bảo vệ đầu trước cháy và giường nệm khỏi rệp, xua đuổi ruồi và gián...

❖ **Tác dụng dược lý:** có tác dụng hoặc được sử dụng làm thành phần trong một số thuốc điều trị: thuốc phá thai, trị mụn trứng cá, trị bệnh thiếu máu, chứng viêm khớp, bệnh hen, bệnh tim, tiêu chảy, điều kinh, mất ngủ, động kinh, bệnh thấp khớp, viêm màng phổi, bong gân... Ngoài ra, còn một số tác dụng rất đặc biệt như kích thích hưng phấn, làm thuốc bổ cho cơ thể, trị cúm, giúp tiêu hóa, giảm đau, tẩy trùng, pha trà thư giãn tinh thần,...

2.5.7 Nhu cầu về tinh dầu hương liệu

Theo số liệu thống kê, năm 2003 Việt Nam xuất khẩu được 852.000 USD tinh dầu - hương liệu và 2.875.000 USD mỹ phẩm chế biến tổng hợp từ tinh dầu - hương liệu các loại nhưng đã nhập khẩu trở lại với giá trị tương ứng là 1.750.000 và 152.386.000 USD.

Nhu cầu về tinh dầu và hương liệu - mỹ phẩm trên thế giới tăng nhanh do nhu cầu người dân ngày càng có xu hướng quay trở về dùng những hợp chất tự nhiên trong hương liệu - mỹ phẩm, thực phẩm. Trung Quốc và Ấn Độ là 2 quốc gia có sản lượng và xuất khẩu tinh dầu - hương liệu lớn nhất thế giới nhưng hiện nay cũng phải nhập thêm tinh dầu vì đã xây dựng những nhà máy sản xuất đơn hương và mỹ phẩm lớn để đáp ứng yêu cầu sử dụng trong nước và xuất khẩu.

Hương liệu sử dụng cho mỹ phẩm và thực phẩm hàm chứa trong tinh dầu các loại như: bạc hà, hương nhu, bạch đàn, húng quế, hoắc hương, quế, hồi, sả các loại... Ngoài ra, còn có những loại hiếm hoi như xá xí, hương lau, trầm trà, trầm hương. Đây là nguồn nguyên liệu cơ bản để tổng hợp ra nhiều hợp chất tự nhiên quan trọng cho công nghiệp hương liệu - mỹ phẩm. Các hãng dược phẩm trên thế giới ngày càng có nhu cầu nhiều loại tinh dầu chứa các chất chưa được tổng hợp nhân tạo như citronellal, geraniol, citral... Các nghiên cứu cho thấy, những nguyên liệu này đều đang có trong các loại cây cỏ thực vật phong phú của Việt Nam. Cả nước có đến 300 loài cây tinh dầu đã được thu thập, trong đó có đến 50 loài cây đã được trồng mang tính sản xuất hàng hóa. (Nguồn: VnExpress, 12/2004).

2.6 CÁC NGHIÊN CỨU KHOA HỌC LIÊN QUAN

2.6.1 Các nghiên cứu trong nước [3,4,5,12]

Hiện tại ở Việt Nam chưa có nhiều công trình nghiên cứu về khả năng ứng dụng của cỏ Vetiver trong xử lý ô nhiễm nước rỉ rác. Các nghiên cứu về nước rỉ rác chủ yếu tập trung vào các biện pháp xử lý theo hệ thống máy móc, thiết bị để giảm thiểu sự ô nhiễm do nước rỉ rác từ các bãi chôn lấp gây ra.

Cỏ Vetiver đã được ứng dụng rộng rãi trên 40 tỉnh thành của cả nước, mang lại nhiều lợi ích trong các lĩnh vực: bảo vệ đất chống xói mòn, hấp thụ các kim loại độc trong đất, xử lý các nguồn nước gây ô nhiễm,... Công nghệ cỏ Vetiver vừa mang lại hiệu quả cao, vừa không tốn kém thực sự là một thuận lợi trong tình hình nước ta không thể đầu tư nhiều vào các hạng mục công trình hiện đại để giải quyết vấn nạn ô nhiễm. Với các vùng nông thôn thì khả năng ứng dụng là rất lớn bởi những ích lợi thiết thực mà nó mang lại.

Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về công dụng của cỏ Vetiver mà tôi xin dẫn ra đây một vài ví dụ (xử lý nước ô nhiễm) nhằm làm rõ thêm cái nhìn về một loại cỏ đa năng:

- Xử lý ô nhiễm từ nước thải trong chăn nuôi
- Nước từ kênh Nhiêu Lộc - Thị Nghè
- Nước từ nhà máy chế biến mủ cao su
- Nước thải sinh hoạt từ cư xá

Về vi khuẩn cố định đạm, chủ yếu là mối quan tâm đến vi khuẩn cộng sinh với các loài thực vật thuộc bộ đậu, còn như vi khuẩn *Azotobacter* thì chỉ khai thác làm chế phẩm vi sinh bổ sung cho đất (*Azotobacterin*). Cho đến nay các nghiên cứu về vi khuẩn cố định đạm sống tự do *Beijerinckia* vẫn còn rất hạn chế, tuy nhiên đã có công trình nghiên cứu về vi khuẩn này trên cây mía hứa hẹn một sự quan tâm mới đến tiềm năng của các vi khuẩn này (Lê Văn Tri và Vũ Thị Minh Đức, 2005).

2.6.2 Các nghiên cứu trên thế giới [11,13,16]

Cỏ Vetiver đã được ứng dụng rất sớm, từ nhiều thế kỷ trước ở Ấn Độ. Cho đến nay đã phát triển mạnh mẽ, có mặt ở nhiều nước trên thế giới. Sự ra đời của

Mạng Lưới Vetiver Quốc Tế (The Vetiver Network) đã cho thấy mối quan tâm của nhiều quốc gia đến lợi ích của công nghệ xanh này.

Người ta đã phân lập được khoảng 17 loài liên quan đến vi khuẩn cố định đạm từ rễ của cỏ Vetiver (*Vetiverria zizanioides*) ở hai tỉnh Chiangmai và Chiangrai của Thailand. Tất cả những loài này đều được phân loại dựa trên những đặc điểm hóa sinh, hình thái học và sinh lý học. Một vài loài có những đặc điểm tương tự như *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* spp. and *Azospirillum* spp. Nhiều thí nghiệm đã phát hiện ra rằng khi nhiễm vi khuẩn cố định đạm sẽ làm tăng cường sự sinh trưởng và phát triển của cỏ Vetiver so với nhóm đối chứng sử dụng chất điều hòa sinh trưởng (IAA, gibberellic acid hoặc IBA), và nhóm không nhiễm vi khuẩn. Cỏ Vetiver khi nhiễm vi khuẩn có khuynh hướng kích thích sự đẻ nhánh của sợi rễ và làm tăng trọng lượng khô.

Việc sử dụng thực vật để giảm thiểu ô nhiễm môi trường, trong đó bao gồm sự ô nhiễm từ nước rỉ rác đã được nghiên cứu ở nhiều nước trên thế giới (Đức, Thái Lan, Thụy Sĩ, Bồ Đào Nha, Đan Mạch, Trung Quốc,...). Nghiên cứu về bãi chôn lấp rác tại thành phố Guangzhou-Trung Quốc đã sử dụng cỏ Vetiver để xử lý nước rỉ rác tại hai đầu của hệ thống xử lý nước rỉ rác ngay tại bãi chôn lấp này đem lại hiệu quả cao, loại bỏ được nhiều chất độc hại cho môi trường.

Chương 3

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM THÍ NGHIỆM

Mô hình thí nghiệm được tiến hành từ 04/2007 đến 07/2007 tại khu vườn thực nghiệm thuộc Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao KH-CN, ĐH Nông Lâm Tp.HCM.

Chọn và dưỡng cỏ trong dung dịch dinh dưỡng từ ngày 25/04/2007. Bố trí thí nghiệm, trồng thủy canh cỏ trong nước rỉ rác lấy từ bãi chôn lấp Gò Cát, Tp.HCM từ 03/06/2007 và theo dõi thí nghiệm đến 14/07/2007.

Khảo sát hàm lượng tinh dầu theo quy trình công nghệ của Công ty TNHH Công nghệ hóa học, Tân Sơn Nhì, Tân Phú, Tp.Hồ Chí Minh từ 25/07/2007 đến 17/08/2007.

3.2 BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM

3.2.1 Thí nghiệm 1

Gồm có 3 nghiệm thức, được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Các nghiệm thức này được phân biệt bởi nồng độ của nước rỉ rác sử dụng để thực hiện thí nghiệm trồng thủy canh cỏ (mỗi nghiệm thức này có số tép cỏ như nhau là 4 tép, chiều cao thân 80 - 130 cm, độ dài rễ 35 - 50 cm, được cố định trên các giá đỡ là tấm xốp dày 5 cm, đường kính của tấm xốp là 26 cm). Bố trí cụ thể như sau:

❖ *Nghiệm thức 1:*

Gồm 4 tép cỏ to, khỏe được cố định trên một giá đỡ là những tấm xốp (kích thước như mô tả ở trên) trồng thủy canh vào xô nhựa 25 lít có chứa 20 lít nước rỉ rác đã pha loãng 80% (2 lít nước thải/10 lít).

❖ *Nghiệm thức 2 :*

Tương tự như nghiệm thức 1 nhưng với nước rỉ rác được pha loãng 40% (4 lít nước thải/10 lít).

❖ *Nghiệm thức 3 :*

Tương tự như nghiệm thức 1 nhưng với nước rỉ rác được pha loãng 60% (6 lít nước thải/10 lít).

3.2.2 Thí nghiệm 2

Khảo sát mật độ vi khuẩn cố định đạm từ các nốt sần trên bề mặt rễ cỏ Vetiver của thí nghiệm 1 và rễ trong hai mô hình trồng cỏ:

❖ *Mô hình trồng cỏ 1:*

Gồm 6 tép cỏ to, sau giai đoạn dưỡng cỏ được trồng ngoài đất thành một hàng, mỗi tép cách nhau 50 cm. Các tép cỏ này trước khi được đem đi trồng có các chỉ số về độ dài thân và rễ tương tự như các tép cỏ trong các nghiệm thức 1, 2, 3.

❖ *Mô hình trồng cỏ 2:*

Gồm 20 bụi cỏ Vetiver trên 2 năm tuổi được lựa chọn một cách ngẫu nhiên ở ngoài đồng, tiến hành đào lấy bộ rễ để khảo sát khả năng hình thành nốt sần trên rễ.

3.2.3 Thí nghiệm 3

Khảo sát hàm lượng tinh dầu bằng cách thu rễ cỏ Vetiver trên 2 năm tuổi để chiết xuất tinh dầu.

3.3 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.3.1 Thí nghiệm 1

Phương pháp được thực hiện trong đề tài này là phương pháp trồng thủy canh cỏ Vetiver trong dung dịch cố định để theo dõi các chỉ tiêu đánh giá về khả năng tạo nốt sần trên rễ cỏ và sự sinh trưởng của cỏ trong nước rỉ rác.

3.3.1.1 Giai đoạn tiền thí nghiệm

Cỏ Vetiver đang mọc ở ngoài đồng (trên 1 năm tuổi) được chọn làm thí nghiệm. Tách bụi to thành những tép nhỏ, chú ý nên chọn những tép to sau đó cắt

rễ, thao tác cắt rễ phải đảm bảo yêu cầu nhanh để đảm bảo độ ẩm cho phần rễ còn lại, rễ được cắt sao cho phần được cắt cách gốc rễ khoảng 1 cm.

Sau khi chọn được những tép cỏ đảm bảo yêu cầu thì tiến hành cố định cỏ trên các giá đỡ là các tấm xốp có gắn lưới sắt nhỏ và trồng vào trong các xô nhựa có chứa dung dịch dinh dưỡng Knop. Trong giai đoạn dưỡng cỏ này dung dịch dinh dưỡng Knop cần được bổ sung liên tục sao cho mực nước luôn cao ngang cổ rễ và tránh xảy ra hiện tượng phát sinh rong rêu vì tình trạng dư thừa dinh dưỡng.

Bảng 3. 1 Thành phần dung dịch Knop

STT	Công thức hóa học	Khối lượng
1	KNO_3	250 mg/l
2	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000 mg/l
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 mg/l
4	KH_2PO_4	250 mg/l

3.3.1.2 Giai đoạn thí nghiệm

Sau thời gian dưỡng cỏ trong dung dịch dinh dưỡng, cỏ Vetiver được đưa vào trồng thủy canh trong nước rỉ rác lấy từ bãi chôn lấp rác Gò Cát.

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Khả năng sinh trưởng của cỏ Vetiver thông qua các số liệu: chiều cao thân, độ dài rễ, số chồi mới trong quá trình thí nghiệm.
 - Sự xuất hiện của nốt sần trên hệ rễ của cỏ Vetiver.
- Quá trình thí nghiệm tiến hành qua các bước sau:
- Xô nhựa 25 lít (9 xô) được chôn xuống đất sao cho phần miệng xô cách mặt đất một khoảng 20 cm và được che chắn bởi khung nhà có mái che bằng nhựa polyethylen trong.
 - Lấy 80 lít nước rỉ rác từ bãi chôn lấp rác Gò Cát, pha loãng theo các nồng độ rồi chứa trong các xô theo nghiệm thức.
 - Cỏ Vetiver sau giai đoạn dưỡng và được cố định trên các giá thể thì tiến hành trồng thủy canh trong các xô thí nghiệm. Trong suốt quá trình thí nghiệm không bổ sung thêm nước thải.

3.3.2 *Thí nghiệm 2*

Thực hiện nuôi cấy vi khuẩn từ các nốt sần trên bề mặt rễ cỏ Vetiver trong hai mô hình trồng cỏ và mẫu rễ của thí nghiệm 1.

3.3.2.1 *Mẫu*

❖ Yêu cầu của mẫu:

- Mẫu được sử dụng là rễ lấy từ cỏ Vetiver.
- Mẫu phải đảm bảo có chứa các nốt sần và mẫu phải còn nguyên vẹn, không bị dập nát.

- Nốt sần là những khối tròn nhỏ hiện diện trên bề mặt của rễ.

❖ Phương pháp lấy mẫu:

- Dụng cụ dùng để lấy rễ bao gồm: cuốc, kéo, bao nylon sạch để đựng mẫu.
- Tiến hành lấy mẫu vào buổi sáng để đảm bảo độ ẩm cho mẫu.
- Rửa sạch toàn bộ rễ trước khi cắt nhỏ mẫu rễ.
- Để có thể lấy được rễ trồng ngoài đất, trước hết ta chọn một bụi cỏ và dùng liềm hoặc kéo cắt hết thân cỏ sao cho chiều cao của bụi cỏ chỉ còn khoảng 20 cm. Sau đó, dùng cuốc đào xung quanh bụi cỏ thành một đường tròn, sâu khoảng 30 - 50 cm và chỉ thực hiện việc nhổ bụi cỏ khi không còn nhiều rễ bám chặt vào đất.

3.3.2.2 *Điều kiện nuôi cấy*

- Nhiệt độ: thao tác ở nhiệt độ phòng, nhiệt độ nuôi cấy là 30°C.
- Bảo đảm các dụng cụ và thao tác không làm lây nhiễm vi sinh vật từ bên ngoài vào môi trường nuôi cấy.
- Chuẩn bị sẵn dung dịch pha loãng trước khi thí nghiệm: dung dịch Saline Peptone Water (SPW) gồm: 8.5 gam NaCl + 1.0 gam peptone + 1000 ml nước cất. Pha 1 lít và hấp thanh trùng trước khi sử dụng, sau đó phân phối 9 ml/ống nghiệm vô trùng.
- Thời gian nuôi cấy: 5 - 10 ngày.

3.3.2.3 Môi trường nuôi cấy [20]

- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Azotobacter*

Bảng 3. 2 Môi trường Ashby's Glucose Agar

Thành phần	Số lượng (g/l)
Agar	15.0
CaCO ₃	5.0
K ₂ HPO ₄	0.2
Glucose	20.0
MgSO ₄	0.2
K ₂ SO ₄	0.1
NaCl	0.2

- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Beijerinckia*

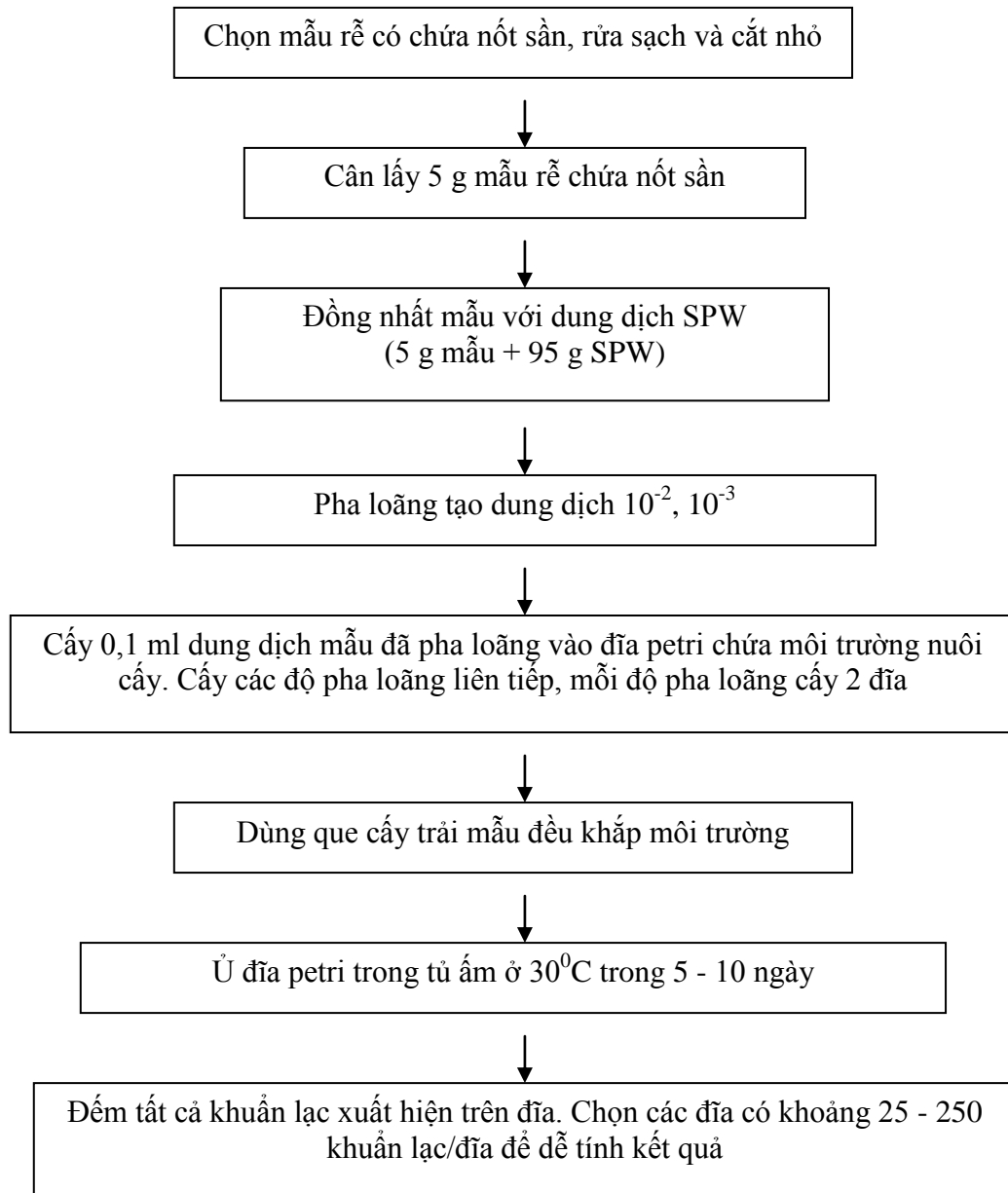
Mặc dù ít được nghiên cứu nhưng cũng đã có một số tác giả sử dụng phương pháp nuôi cấy trên môi trường thạch cho kết quả tốt.

Bảng 3. 3 Môi trường Beijerinckia medium

Thành phần	Số lượng (g/l)
Agar	15.0
K ₂ HPO ₄	0.2
FeCl ₃	0.1
MgSO ₄	0.5
K ₃ PO ₄	0.8
Na ₂ Mo ₄ . 2H ₂ O	0.005
Sucrose	20.0

3.3.2.4 Quy trình nuôi cấy

Quy trình nuôi cấy vi khuẩn được xây dựng dựa trên phương pháp nuôi cấy bề mặt và định lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí (Nguồn: Giáo trình Kiểm phẩm, Bộ môn CNSH, trường ĐH Nông Lâm, Tp.HCM).



Hình 3. 1 Quy trình nuôi cấy vi khuẩn

➤ Tổng số vi khuẩn (CFU/g):

$$A = N / (n_1 \times V_1 \times f_1 + \dots + n_i \times V_i \times f_i)$$

Với:

- ❖ A: số lượng vi khuẩn trong 1g mẫu.
- ❖ N: tất cả các khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn.
- ❖ n_i : số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i

- ❖ V: thể tích dịch mẫu cấy vào trong 1 đĩa.
- ❖ f_i : độ pha loãng tương ứng.

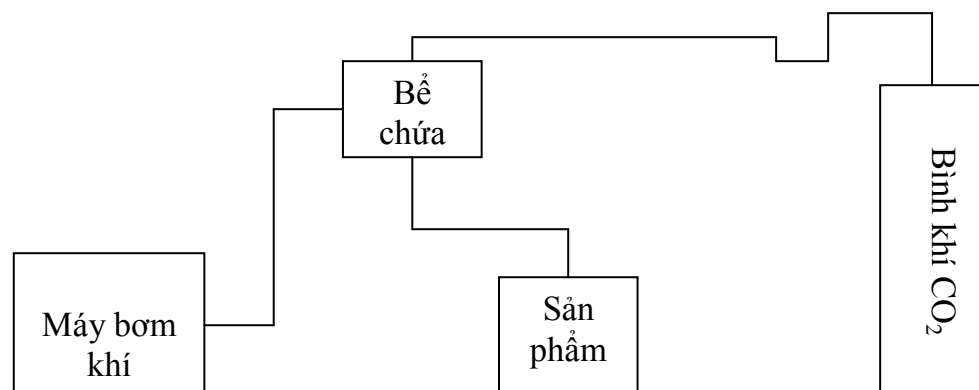
Đối với việc phân lập vi khuẩn trong mẫu nước thải ta cũng thực hiện tương tự như quy trình nuôi cấy trên (Hình 3.1). Tiến hành lấy mẫu nước cần xác định cho vào ống nghiệm, sau đó pha loãng và nuôi cấy.

3.3.3 Thí nghiệm 3

Để khảo sát hàm lượng tinh dầu trong rễ cỏ Veiver, chúng tôi đã áp dụng theo quy trình công nghệ mới nhất tại Việt Nam, đang được triển khai tại Công ty TNHH Công nghệ hóa học, Tân Sơn Nhì, Tân Phú, Tp.HCM. Quy trình này không giống các biện pháp kỹ thuật truyền thống dùng để chiết xuất tinh dầu hiện vẫn còn đang sử dụng. Cơ chế chung của quy trình này là sử dụng khí CO₂ tạo áp suất lớn bằng cách nén khí để phá vỡ tế bào, giải phóng tinh dầu ra ngoài.

Mức độ ổn định và hiệu suất cao đã được ghi nhận theo một nghiên cứu đang tiến hành tại một công ty chuyên về Y - Dược phẩm ở tỉnh Tây Ninh. Nghiên cứu cho biết sự thay đổi hàm lượng tinh dầu trên một loại nguyên liệu chủ yếu do sự khác biệt về độ ẩm và dạng ban đầu của nguyên liệu. Thông thường, độ ẩm yêu cầu của nguyên liệu vào khoảng 7 - 10 %. Cho đến nay quy trình này đã chiết xuất khoảng 20 loại tinh dầu có nguồn gốc khác nhau (như gừng, quế, trầm hương,...).

Mô hình của quy trình chiết xuất này có thể được hình dung một cách khái quát như sau:



Hình 3. 2 Mô hình quy trình chiết xuất tinh dầu

Quy trình này bao gồm 3 thiết bị chính là bình chứa khí CO₂, máy bơm khí và thiết bị chiết xuất. Dung tích của bể chứa vào khoảng 2 lít.

Các bước cơ bản để thực hiện quy trình:

- Cho nguyên liệu vào bể chứa
- Xả khí CO₂ vào bể chứa đạt áp suất 70 kg/cm²
- Sử dụng máy bơm để bơm khí vào bể chứa
- Tổng áp suất cần thiết là 110 kg/cm²
- Giữ nguyên (ngâm) trong thời gian 15 - 20 phút
- Thu tinh dầu ở đầu ra sản phẩm.

Thời gian ngâm và số lần lặp lại có thể tùy thuộc vào người sử dụng. Sau khi chiết xuất ta có thể thu hồi khí CO₂ vào bình chứa.

Quy trình này thường dùng để chiết xuất tinh dầu từ nguồn nguyên liệu với số lượng ít, chúng tôi tạm gọi là quy trình 1 bể, thích hợp với quy mô nhỏ như ở phòng thí nghiệm hay các đơn vị nghiên cứu khoa học, sử dụng cho mục đích khảo sát hàm lượng tinh dầu từ các nguồn nguyên liệu khác nhau.



Hình 3. 3 Mô hình chiết xuất 2 bể

Với quy trình 2 bể này (đang sử dụng tại Công ty CP Y - Dược phẩm Vimedimex, Trảng Bàng, Tây Ninh) ta có thể sử dụng cho mục đích chiết xuất tinh dầu với số lượng lớn, vì ở mỗi bể số lượng nguyên liệu tối thiểu phải đạt là 10 kg.

Quy trình 2 bể này giống quy trình 1 bể ở chỗ lượng khí CO₂ sử dụng bằng nhau và được thu hồi lại. Lượng khí CO₂ được dịch chuyển qua lại giữa 2 bể trong quá trình chiết xuất thông qua các van. Thông thường, tổng số lần chiết xuất đối với một lần chạy là 4 lần, nghĩa là thực hiện chiết xuất tinh dầu 2 lần/bể trước khi thu hồi CO₂ và kết thúc quy trình.

3.4 VẬT LIỆU

- Khung nhà bằng tre và mái che bằng nhựa polyethylen trong.
- Tấm xốp (dày 5 cm) làm giá đỡ, vật liệu nổi.
- Xô nhựa 25 lít dùng để đựng nước rỉ rác (9 xô), dụng cụ đo thể tích nước.
- Cỏ Vetiver được cung cấp bởi Trung tâm nghiên cứu và Chuyển giao KHCN, ĐH Nông Lâm Tp.HCM.
- Nước rỉ rác được lấy tại bãi chôn lấp rác Gò Cát, trước khi lấy mẫu nước dụng cụ lấy mẫu và bình đựng nước rỉ rác phải tráng qua với nước thải 3 lần, lấy ở độ sâu từ 20 - 30 cm, đồng thời không gây ra bọt khí trong bình đựng nước thải.

3.5 THIẾT BỊ PHÒNG THÍ NGHIỆM

- | | |
|----------------------|---------------------|
| – Cân điện tử | – Đèn cồn |
| – Nồi hấp môi trường | – Que trải tam giác |
| – Tủ ẩm | – Đĩa petri |
| – Máy vortex | – Ống nghiệm |
| – Đầu tip | – Bình tam giác. |
| – Tủ lạnh | – Micropipette |

3.6 PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2003

Chương 4

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 THÍ NGHIỆM 1

Về cảm quan, sau thời gian 15 ngày thì nước rỉ rác trong nghiệm thức 1 đã không còn mùi hôi. Trong các nghiệm thức còn lại (nghiệm thức 2 và 3) xảy ra hiện tượng cỏ héo và chết dần, đến ngày thứ 24 mới không còn mùi hôi từ nước rỉ rác.

❖ *Nghiệm thức 1:*

Sau 7 ngày trồng trong nước rỉ rác bộ rễ của cỏ không phát triển tiếp mà chết dần, thay vào đó là sự phát triển của rễ mới. Chiều dài của lá cũng không tăng bởi hiện tượng lá úa và héo vàng.

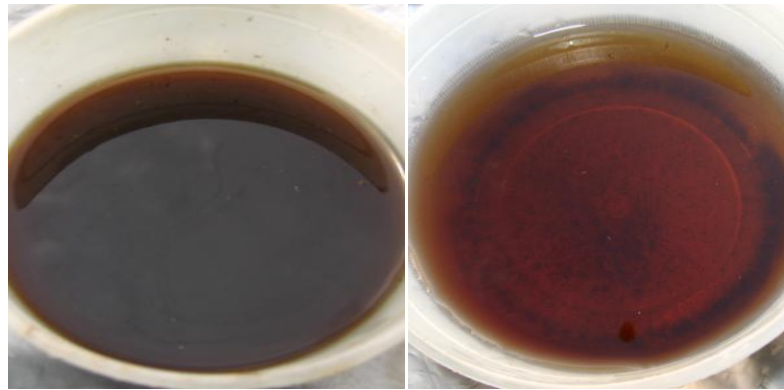


Hình 4.1 Chiều cao thân và độ dài rễ cỏ của NT1
a) sau 7 ngày; b) sau 42 ngày

Cho đến khi kết thúc quá trình thí nghiệm chỉ có một vài lá lầy lại màu xanh hoàn toàn, sự phát sinh chồi không ghi nhận được qua thí nghiệm.

Sự phát triển của rễ không diễn ra liên tục mà tăng hoặc giảm theo số lượng và sự phát triển của rễ mới cùng với sự chết đi của các rễ mới hình thành trước đó. Ở giai đoạn cuối của quá trình thí nghiệm số lượng và chiều dài của rễ đạt mức cao nhất.

Ở nghiệm thức 1, khả năng sinh trưởng và phát triển của cỏ đã trực tiếp làm cho chất lượng nước thải được cải thiện đáng kể. Chúng tôi ghi nhận sự thay đổi này thông qua màu sắc của nước và số lượng chất lắng trong nước thải.



Hình 4.2 Nước rỉ rác trước và sau thí nghiệm của NT1

❖ *Nghiệm thức 2:*

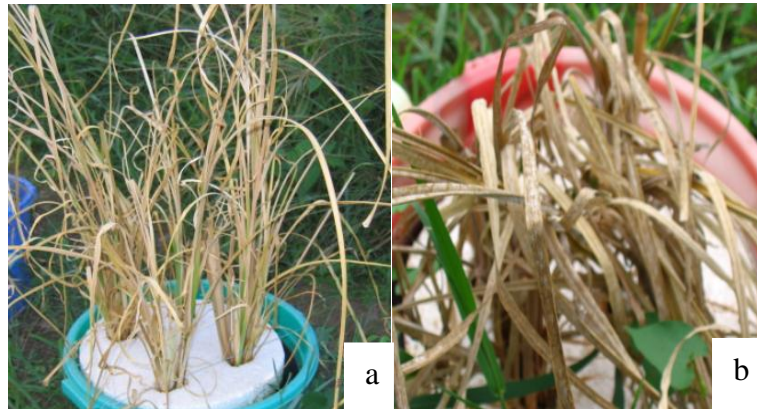


Hình 4.3 Chiều cao thân cỏ NT2
a) sau 7 ngày; b) sau 42 ngày

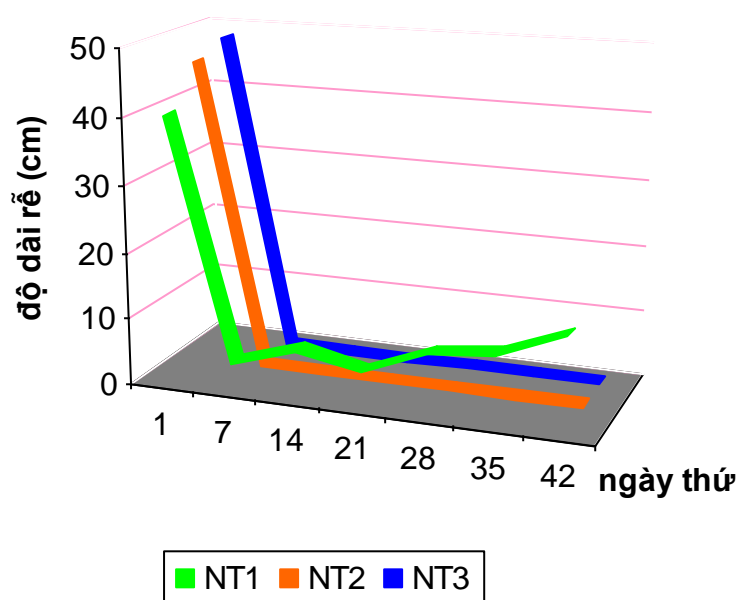
Ở nghiệm thức này sau 7 ngày không thấy xuất hiện rễ mới, thân và lá chưa chuyển hoàn toàn sang màu vàng héo. Sau 21 ngày cỏ chết hoàn toàn, bộ rễ cỏ bị thối và mục rã trong nước thải.

❖ *Nghiệm thức 3:*

Tương tự như nghiệm thức 2 nhưng sau 14 ngày cỏ đã chết hoàn toàn.



Hình 4.4 Chiều cao thân cỏ của NT3
a) sau 7 ngày; b) sau 42 ngày



Hình 4.5 Biểu đồ sự phát triển của rễ qua các NT

Bảng 4.1 Sự phát triển độ dài rễ của các NT trong quá trình thí nghiệm (cm)

NT	Ngày							
	1	7	14	21	28	35	42	
1	40	4	7	5	9	10	14	
2	46	-	-	0	0	0	0	
3	48	-	0	0	0	0	0	

Bảng 4.2 Sự thay đổi màu sắc lá của các NT trong quá trình thí nghiệm

NT	Ngày							
	1	7	14	21	28	35	42	
1	xanh	vàng	vàng	vàng	xanh	xanh	xanh	
2	xanh	vàng	vàng	khô	khô	khô	khô	
3	xanh	vàng	khô	khô	khô	khô	khô	

➤ *Biện luận:*

Sự sinh trưởng và phát triển của cỏ Vetiver trong các nồng độ pha loãng của nước rỉ rác bị ngừng lại là do tình trạng cỏ bị sốc khi chuyển từ môi trường đang giàu chất dinh dưỡng sang môi trường có nhiều chất độc hại.

Rễ mới được sinh ra và phát triển cho thấy sự thích nghi của cỏ đối với nước rỉ rác. Sự phát triển không đều của rễ trong thời gian thực hiện thí nghiệm có thể do bởi cỏ được trồng với mật độ thấp nên khả năng thích nghi của cỏ chưa đạt được mức cao nhất. Khả năng thích nghi của cỏ được thấy rõ ở giai đoạn cuối của quá trình thí nghiệm, không còn rễ bị chết và số lượng nhánh phát sinh từ rễ tăng lên nhanh chóng.

4.2 THÍ NGHIỆM 2

Ngoài hai nghiệm thức 2 và 3 không có sự sinh trưởng và phát triển của cỏ thì ở nghiệm thức 1 chúng tôi không nhận thấy sự xuất hiện nốt sần trên bề mặt của rễ.

❖ *Mô hình trồng cỏ 1:*

Ở mô hình trồng cỏ 1 sự sinh trưởng và phát triển của cỏ là rất tốt, tuy nhiên kết thúc quá trình thí nghiệm vẫn không ghi nhận được sự có mặt của nốt sần trên bề mặt rễ cỏ Vetiver.

❖ *Mô hình trồng cỏ 2 :*



Hình 4. 6 Mô hình trồng cỏ 1 và 2

Qua quá trình khảo sát trên mô hình trồng cỏ 2 chúng tôi cho rằng khả năng hình thành nốt sần trên rễ cỏ Vetiver là không tồn tại. Do đó, mục tiêu tìm hiểu mật độ vi khuẩn cố định đạm trên các nốt sần vẫn chưa đem đến một số liệu mang ý nghĩa cụ thể nào.

Bảng 4. 3 So sánh sự khác nhau giữa hai mô hình trồng cỏ

Mô hình	Chiều cao thân (cm)	Độ dài rễ (cm)	Sự hiện diện nốt sần
1	120	34	0
2	136	42	0

Mặc dù có sự khác biệt rất lớn giữa hai mô hình trồng cỏ nhưng kết quả khảo sát sự hiện diện của nốt sần là giống nhau.

Kết quả nuôi cấy vi khuẩn từ mẫu rễ trong quá trình thí nghiệm không cho thấy sự hiện diện của hai loại vi khuẩn cố định đạm *Azotobacter spp.* và *Beijerinckia spp.*

Bảng 4. 4 Sự hiện diện của nốt sần trên bề mặt rễ cỏ qua các NT

Nghiệm thức	1	2	3
Sự hiện diện của nốt sần	0	0	0

➤ *Biện luận:*

Như vậy, câu hỏi được đặt ra là có hay không có sự tồn tại của nốt sần trên rễ cỏ Vetiver. Thực sự câu hỏi này vẫn chưa thể trả lời một cách chắc chắn, cần có thêm nhiều nghiên cứu bổ sung khác, tuy nhiên theo nghiên cứu và cơ sở lý thuyết tôi cho rằng khả năng hình thành nốt sần trên rễ cỏ Vetiver là có tồn tại.

Theo Giáo sư Nguyễn Lâm Dũng (Vi sinh vật học, 1965) vi khuẩn *Azotobacter* và *Beijerinckia* là những vi khuẩn sống tự do trong đất nên không có khả năng tạo ra nốt sần. Mặt khác, một số nghiên cứu ở nước ngoài ([15,18]) chỉ ra rằng các loại vi khuẩn trên không chỉ hiện diện trên bề mặt rễ mà còn tồn tại trong các khoảng gian bào của tế bào rễ; do đó chúng tôi nghĩ đến khả năng ở một mật độ nhất định nào đó các vi khuẩn này có thể tạo thành các nốt sần hay các khối u trên bề mặt rễ cỏ. Vấn đề cần được giải quyết là với một mật độ nào thì có sự xuất hiện của nốt sần. Chúng tôi cho rằng các loại vi khuẩn trên tuy tồn tại trong các khoảng gian bào của tế bào rễ nhưng không đủ khả năng tạo thành nốt sần, vì như ta đã biết rễ cỏ Vetiver chứa hàm lượng tinh dầu khá cao đồng thời tinh dầu từ cỏ này còn có tác dụng như một chất diệt khuẩn. Vì vậy, khả năng hình thành nốt sần trên rễ cỏ Vetiver được ghi nhận trong đề tài này là không có.

4.3 THÍ NGHIỆM 3

Khối lượng vật liệu ban đầu được sử dụng có trọng lượng 1 kg, sau khi chiết xuất theo quy trình công nghệ, sản phẩm được thu nhận vào một ống eppendoff.

Thể tích của sản phẩm thu được: 0,44 ml.

Tinh dầu cỏ Vetiver có màu nâu vàng.

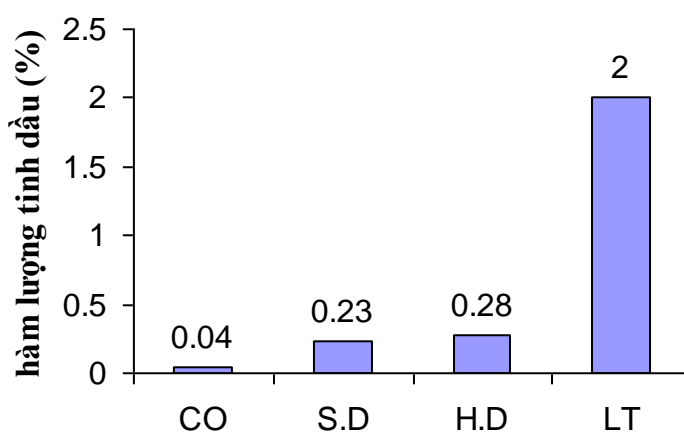
Hàm lượng tinh dầu tính theo phần trăm: 0,04%.

So sánh hàm lượng tinh dầu được chiết xuất từ các quy trình khác nhau:

- CO: quy trình chiết xuất sử dụng khí CO₂.
- S.D: quy trình chưng cất tinh dầu bằng hơi nước (Steam Distillation).
- H.D: quy trình chưng cất lỏng (Hydrodistillation).
- LT: hàm lượng tinh dầu theo lý thuyết.

Bảng 4.5 Hàm lượng tinh dầu theo các quy trình chiết xuất

Nguồn	Phương pháp	Hàm lượng (%)
Thí nghiệm 3	CO	0,04
Parameters of Vetiver Oil Distillation, 1999	S.D	0,23
Parameters of Vetiver Oil Distillation, 1999	H.D	0,28
Nguyễn Lâm Dũng, 2005	LT	2



Hình 4.7 Biểu đồ so sánh hàm lượng tinh dầu qua các quy trình

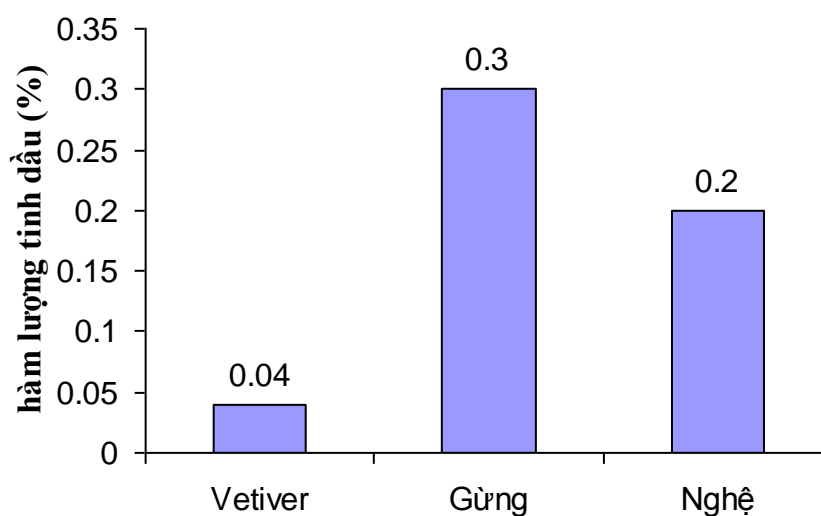
Thông qua biểu đồ trên ta có thể thấy hàm lượng tinh dầu chiết xuất theo quy trình sử dụng khí CO₂ cho ra sản phẩm thấp hơn rất nhiều so với các phương pháp khác.

Theo quy trình chưng cất tinh dầu bằng hơi nước, khoảng biến động của hàm lượng tinh dầu rất lớn. Số liệu trong hình 4.8 được lấy từ cùng một nguồn, nhưng trong nhiều tài liệu khác hàm lượng tinh dầu lại ở mức cao hơn. Có thể dao động trong khoảng 0,15 - 0,29% (trọng lượng khô) hoặc 0,3 - 1%, hoặc ở một giá trị khác như 0,5 - 4%. Như vậy, số liệu là rất khác nhau, do đó cần có một nghiên cứu cụ thể và chính xác.

Ngay cả trong một quy trình chiết xuất cũng cho thấy sự khác biệt giữa hàm lượng các loại tinh dầu đã được chiết xuất.

Bảng 4. 6 Hàm lượng tinh dầu chiết xuất của các cơ chất theo quy trình CO

Cơ chất	Hàm lượng (%)
Rễ cỏ Vetiver	0,04
Gừng	0,3
Nghệ	0,2



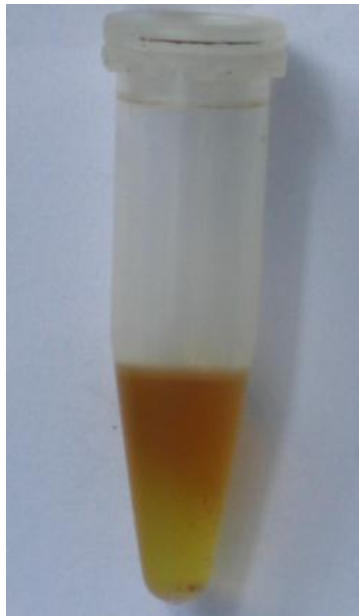
Hình 4. 8 Biểu đồ hàm lượng các loại tinh dầu đã chiết xuất theo CO

Để giải thích cho sự khác biệt về hàm lượng tinh dầu trong 2 biểu đồ trên, chúng tôi xin đưa ra các nguyên nhân sau:

- Khối lượng nguyên liệu đầu vào là quá ít, không đủ để thực hiện ở quy mô lớn hơn nhằm giảm bớt tỷ lệ hao hụt của sản phẩm.

- Không đảm bảo được số lần lặp lại cần thiết để có thể đưa ra một số liệu khoa học.

Vì vậy, việc khảo sát hàm lượng tinh dầu từ rễ cỏ Vetiver trong đề tài này chỉ dừng lại ở việc bước đầu đánh giá hàm lượng tinh dầu có trong rễ cỏ. Nhưng có thể khẳng định rằng rễ cỏ Vetiver chứa hàm lượng tinh dầu ở mức cao, cần có kế hoạch và thiết bị khai thác hiệu quả để nâng cao giá trị kinh tế.



Hình 4.9 Tinh dầu Vetiver sau khi chiết xuất

Chương 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 KẾT LUẬN

Cỏ Vetiver trồng thủy canh trong nước rỉ rác có khả năng sống và phát triển tốt ở nồng độ pha loãng 80%.

Sự xuất hiện của nốt sần trên rễ cỏ Vetiver không được ghi nhận trong quá trình thực hiện đề tài.

Hàm lượng tinh dầu thu được khi áp dụng quy trình chiết xuất sử dụng khí CO₂ là 0,04%.

Với mật độ trồng cỏ 170 tép cỏ/1m² quá trình sinh trưởng và phát triển của cỏ diễn ra chậm, do đó sự phục hồi và tăng trưởng của lá cũng như sự phát sinh của chồi không xảy ra liên tục. Mặt khác, sự phát triển của rễ có lúc bị gián đoạn nhưng nhìn chung sức sống của cỏ là rất mạnh mẽ, chịu đựng rất tốt với môi trường nước thải chứa nhiều thành phần gây ô nhiễm.

5.2 ĐỀ NGHỊ

Để khả năng xử lý nước thải của cỏ Vetiver đạt hiệu quả cao, trước khi đưa cỏ vào quy trình xử lý cần dưỡng cỏ trong dung dịch dinh dưỡng Knop giúp cỏ tăng khả năng hút chất dinh dưỡng và các chất hữu cơ khác, đồng thời khi áp dụng trên mô hình lớn cần thay cỏ theo định kỳ để chất lượng nước được xử lý theo hiệu quả mong muốn.

Kết quả thu được từ thí nghiệm cho thấy khả năng sử dụng cỏ Vetiver theo phương pháp thủy canh để xử lý nguồn ô nhiễm từ nước rỉ rác. Tuy nhiên cần có nghiên cứu cụ thể hơn về mật độ trồng cỏ thích hợp để hiệu quả xử lý là cao nhất cũng như xây dựng được mô hình áp dụng trong thực tế.

Khả năng xử lý ô nhiễm từ nước rỉ rác của cỏ Vetiver mang lại hiệu quả cao, cần được nghiên cứu ở quy mô rộng hơn và ghi nhận được sự thay đổi của các thông số liên quan đến nước thải.

Sự hình thành của nốt sần trên rễ cỏ Vetiver tuy không ghi nhận được nhưng có thể nghiên cứu thêm theo một hướng khác, sau khi dưỡng cỏ trong dung dịch Knop chúng ta có thể gây nhiễm cho bộ rễ bằng cách ngâm chúng vào trong dung dịch có chứa vi khuẩn *Azotobacter* spp. và vi khuẩn *Beijerinckia* spp. để theo dõi mật độ của hai vi khuẩn này trong các khoảng gian bào của tế bào rễ, từ đó khảo sát khả năng hình thành nốt sần khi đem cỏ trồng ngoài đất.

Nghiên cứu các giống cỏ Vetiver chứa ít hoặc không chứa tinh dầu, để ghi nhận khả năng hình thành nốt sần trên rễ cũng như tác động của hàm lượng tinh dầu từ rễ cỏ đến vi khuẩn *Azotobacter* spp. và *Beijerinckia* spp.

Định lượng hàm lượng tinh dầu trong rễ cỏ Vetiver bằng các phương pháp khác nhau, và xác định được thành phần các chất trong tinh dầu của cỏ *Vetiveria zizanioides* L. tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Nguyễn Lâm Dũng. *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia, Hà Nội, Việt Nam. Tập II. Trang 354 – 371.
2. Phạm Động Điện, 2006. *Chưng cất tinh dầu bằng hơi nước*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội, Việt Nam. 75 trang.
3. Dương Thành Lam, 2005. *Thử nghiệm cỏ Vetiver (Vetiveria zizanioides L.) trong xử lý nước thải sinh hoạt từ ký túc xá sinh viên*. Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao KH-CN Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
4. Lê Nguyễn, 2006. *Ảnh hưởng của mật độ trồng đến sinh trưởng và khả năng xử lý nước của cỏ Vetiver (Vetiveria zizanioides L.) trồng trong nước kênh Nhiêu Lộc - Thị Nghè*. Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao KH-CN, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.
5. Nguyễn Nguyên Thắng, 2006. *Khảo sát ảnh hưởng của chế phẩm sinh học Enchoice và Sanjiban trong quá trình xử lý nước rỉ rác tại bãi chôn lấp rác Phước Hiệp, Củ Chi*. Khóa luận tốt nghiệp ngành Công nghệ sinh học, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam. 55 trang.
6. Trường Đại học Cần Thơ. *Giáo trình vi sinh vật đất (Chương 5)*. 19 trang.

TIẾNG NƯỚC NGOÀI

7. K. K. Aggarwal, Aparbal Singh, A. P. Kahol and Man Singh, 1999. *Parameters of Vetiver Oil Distillation*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. Volume 6. Issue 2. ISSN 1049 - 6475.
8. Benjar Chutintrasri, Somnuk Promdaeng and Teeranud Romphopak. *Extraction and analysis of volatile compounds and post harvest treatment of Ya Prak Hin roots*. Scientific Equipment Center, Kasetsart University Research and Development Institute, Thailand.

9. Narong Chomchalow, 2001. *The utilization of Vetiver as medicinal and aromatic plants*. Office of the Royal Development Projects Board, Thailand. 27 pages.
10. Stephen V. Dowthwaite and Samjamjaras Rajani. *Vetiver: Perfumers' liquid gold*. Thai - China Flavours and Fragrances Co. Ltd. Bangkok. 3 pages.
11. Xia Hanping, Ao Huixiu, Liu Shizhong and He Daoquan. *A preliminary study on Vetiver's purification for garbage leachate*. South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China.
12. Tri Levan and Duc Vuthiminh; 2005. *Preliminary results of isolation of nitrogen fixing bacteria in sugar-cane (Saccharum officinarum L.)*. VietNam Information for Science and Technology Advance. Vol 43. -No 1. - p. 93-97. -(vie). -ISSN 0866-708X.
13. A. Muthusankaranarayanan, U. Solaiappan and S. Senthivel. *Planting techniques for Vetiver slips in rainfed Vertisols*. Regional Research Station, Agricultural University, Arnpukkottan 626107, Tamilnadu, India.
14. Ngwainmbi Simon, 2000. *Utilization of Vetiver grass roots for medicinal and other purposes*. Cameroon Vetiver Network (CAVN).
15. Settha Siripin. *Microbiology associated with the Vetiver plant*. Maejo University, Chiang Mai, Thailand. 3 pages
16. Sinkangam, B. Siripin, S. Teeratorn and A. Pintarak; 1999. *Evaluation of plant growth regulators and effect of nitrogen fixing bacteria on growth of vetiver grass*. The 37th Kasetsart University Annual Conference, 3 - 5 February, 1999: 40 - 44, Thailand. 4 pages.
17. Sirinan Thubthimthed, Krittiya Thisayakorn, Ubon Rerk-am, Sinn Tangstirapakdee and Taweesak Suntorntanasat. *Vetiver oil and its sedative effect*. Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR, Bangkok, Thailand). 3 pages

18. Office of The Royal Development Projects Board in cooperation with Fund Donated by The Heineken Breweries Co.ltd, 19 - 30 November 2000. *The Vetiver System*. Bangkok, Thailand. 139 pages.

TRANG WEB

19. <http://www.biotechvnu.edu.vn>
20. <http://www.himedialabs.com>
21. <http://sonongnghiep.angiang.gov.vn>
22. <http://www.vetiver.org>
23. <http://www.wikipedia.com>