

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ PHẾ PHẨM NÔNG NGHIỆP LÀM PHÂN HỮU CƠ VI SINH

Nguyễn Thị Thu Thủy¹, Trần Thị Xuân Phương¹, Cao Thị Dung²,
Lê Thị Hương Xuân¹, Trương Thị Hồng Hải¹

¹Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

² Viện nghiên cứu bông và phát triển nông nghiệp Nha Hồ

Liên hệ email: nguyenthithuthuy@huaf.edu.vn

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là xác định được một số chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose nhằm xử lý phế phẩm nông nghiệp làm phân hữu cơ vi sinh. Kết quả nghiên cứu cho thấy, số lượng của một số loại vi sinh vật có sự biến động lớn và chênh lệch giữa hai nhóm, nấm mốc dao động trong khoảng $0,34 \times 10^7$ đến $102,87 \times 10^7$ CFU/g mẫu, xạ khuẩn dao động trong khoảng $0,01 \times 10^7$ đến $0,04 \times 10^7$ CFU/g mẫu và vi khuẩn dao động trong khoảng $0,36 \times 10^7$ đến $4,61 \times 10^7$ CFU/g mẫu. Trong số 62 chủng nấm mốc, 88 chủng xạ khuẩn và 69 chủng vi khuẩn phân lập từ môi trường đất ở 12 địa điểm khác nhau thuộc Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã tiến hành tuyển chọn được ba chủng có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất là 6NH (nấm mốc), 22TH (xạ khuẩn) và NH1 (vi khuẩn). Sử dụng giá thể cám gạo: bột ngô nhân sinh khối các chủng vi sinh vật tuyển chọn cho đường kính vòng phân giải cellulose cao nhất. Ủ phế phẩm nông nghiệp với các chủng vi sinh vật tuyển chọn cho thấy khả năng phân giải cellulose của chúng rất tốt (giảm 75,0% cellulose so với đối chứng) và hàm lượng đạm, lân, kali tổng số đều tăng hơn so với đối chứng.

Từ khóa: Nấm mốc, xạ khuẩn, cellulose, vi khuẩn

Nhận bài: 18/05/2017

Hoàn thành phản biện: 05/06/2017

Chấp nhận bài: 10/06/2017

1. MỞ ĐẦU

Khoảng một nửa hợp chất carbon trong sinh khối (biomass) trên mặt đất là cellulose, chiếm tới 35 – 50% khối lượng khô sinh khối thực vật. Tất cả sản phẩm sinh khối sẽ được khoáng hóa nhờ hệ thống enzyme được cung cấp bởi vi sinh vật. Hệ thống enzyme phân giải cellulose thường chậm và không hoàn toàn. Tuy nhiên, trong khoảng thời gian ngắn (48 giờ) hệ vi sinh vật trong dạ cỏ bò có thể phân giải 60 – 65% cellulose. Hơn thế nữa, nhờ hệ thống vi sinh vật trong đường ruột mà loài mối có thể tiêu hóa đến 90% cellulose của gỗ (Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Diệp, 2011). Trong hệ thống sinh học phức tạp như rễ cây hoặc những mảnh vỡ thực vật trong đất, cellulose có thể được phân hủy trong khoảng thời gian lâu hơn (Schwarz, 2001). Hệ vi sinh vật phân giải cellulose có thể lên men hiếu khí hoặc kỵ khí, bình nhiệt hoặc ái nhiệt, bao gồm nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn được tìm thấy nhiều trong đất, nước, đường tiêu hóa một số động vật... nơi cung cấp lượng cellulose dồi dào để vi sinh vật phân giải và phát triển.

Việc sử dụng vi sinh vật phân giải cellulose đã và đang được các nhà khoa học trên thế giới và ở Việt Nam nghiên cứu. Ở Ấn Độ, Behera và cs. (2014) đã phân lập được vi khuẩn phân giải cellulose từ đất rừng Đức và xác định đó là các loài *Micrococcus* spp.,

Bacillus spp., và *Pseudomonas* spp.; ở Trung Quốc, Yang Ling Liang và cs. (2011) đã phân lập được 22 đồng vi khuẩn phân lập cellulose. Ở Việt Nam Hà Thanh Toàn và cs. (2011), Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp (2011), Lê Phạm Tường Anh (2012) cũng đã nghiên cứu vi sinh vật phân giải cellulose. Để góp phần làm giàu bộ giống vi sinh vật phân giải cellulose chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phân giải cellulose nhằm mục tiêu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phân giải cellulose từ các mẫu đất thu thập ở 12 địa điểm khác nhau của tỉnh Thừa Thiên Huế và bước đầu đánh giá khả năng phân giải phế phụ phẩm nông nghiệp của các vi sinh vật phân lập được.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Xạ khuẩn, vi khuẩn và nấm mốc có khả năng phân giải cellulose phân lập từ bãi rác, xường mùn cưa và một số vùng đất canh tác khác nhau ở Thừa Thiên Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm và xạ khuẩn phân giải cellulose

- Thu mẫu đất ở các bãi rác, xường mùn cưa, và các vùng đất canh tác của 12 địa điểm trên địa bàn huyện Phú Vang, Hương Trà, Phong Điền, Quảng Điền và thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế. Mỗi điểm thu 5 mẫu, sau đó trộn 5 mẫu thành 1 mẫu, ghi kí hiệu mẫu, ngày thu mẫu, nơi lấy mẫu, đặc điểm của mẫu. Độ sâu tầng đất thu mẫu 0 - 15 cm.

Bảng 1. Địa điểm và số mẫu thu thập

Kí hiệu mẫu	Địa điểm lấy mẫu	Số mẫu thu thập (mẫu)	Loại mẫu
M1	Hương Sơ, Thành phố Huế	4	Xường cưa
M2	Hương Sơ, Thành phố Huế	4	Xường cưa
M3	Hương An, Hương Trà	5	Bãi rác
M4	Hương An, Hương Trà	5	Bãi rác
M5	Hương Vân, Hương Trà	6	Đất ruộng
M6	Hương Vân, Hương Trà	2	Đất ruộng
M7	Vinh Xuân, Phú Vang	7	Đất vườn
M8	Vinh Xuân, Phú Vang	3	Đất vườn
M9	Phong An, Phong Điền	4	Đất ruộng
M10	Phong An, Phong Điền	5	Đất vườn
M11	Phước Yên, Quảng Điền	3	Đất vườn
M12	Tứ Hạ, Hương Trà	4	Đất ruộng

Phân lập nhóm vi sinh vật phân giải cellulose: Sử dụng môi trường Vinogradski và MPA phân lập vi khuẩn, môi trường Gausies I phân lập xạ khuẩn, môi trường Czapek và PDA phân lập nấm mốc. Thay nguồn carbon trong các môi trường bằng CMC (carboxyl methyl cellulose) (Huỳnh Anh, 2004)

2.2.2. Xác định khả năng phân giải cellulose của các chủng nấm, xạ khuẩn và vi khuẩn

Trên môi trường chứa CMC, vi sinh vật sẽ tiết ra cellulase ngoại bào phân hủy cơ chất để sinh trưởng và làm cho môi trường trong hơn khi nhuộm bằng dung dịch Congo red (1g/lít) trong 15 phút. Độ lớn của khoảng môi trường trong suốt và vết cây phản ánh khả năng sinh trưởng phát triển và phân giải CMC của vi sinh vật. Công thức tính khả năng phân giải: $V \text{ (mm)} = D \text{ (mm)} - d \text{ (mm)}$; Trong đó: V là khả năng phân giải, D là đường

kính vòng phân giải, d là đường kính lỗ khoan (Châu Hoàng Vũ, 2000; Bhat, 2000; Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp, 2011).

2.2.3. Xác định đường kính vòng phân giải cellulose bằng phương pháp khuếch tán trên thạch

Xác định khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật bằng phương pháp khuếch tán enzyme cellulase trên môi trường thạch đĩa (agar, CMC), nhuộm dung dịch Congo red và đo đường kính vòng phân giải (Tolan và cs., 1999; Trần Thanh Phong và cs., 2007).

2.2.4. Xác định giá thể tối ưu cho hoạt động sinh tổng hợp cellulase

Nuôi cấy chủng vi sinh vật tuyển chọn trên các loại giá thể xốp khác nhau gồm cám gạo, trấu, rơm rạ, vỏ lạc, cám gạo: bột ngô (tỷ lệ 3:1), cám gạo: trấu (tỷ lệ 3:1) ở 30 °C, trong 6 ngày, sau đó tách chiết và đánh giá hoạt độ của enzyme cellulase.

2.2.5. Thử nghiệm khả năng phân giải phế phụ phẩm nông nghiệp của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Các công thức thí nghiệm ủ phân hữu cơ:

Công thức	Khối lượng phế phụ phẩm (kg)	Thành phần vi sinh vật phân giải cellulose	Tỷ lệ cây giồng (%)
I (Đối chứng)	100	Không bổ sung vi sinh vật	0
II	100	Bổ sung các chủng nấm 6NH, xạ khuẩn 22 TH và vi khuẩn NH1	5

- Nguyên liệu ủ: trong 100 kg nguyên liệu phế phụ phẩm bao gồm:

- + Rơm rạ, phế thải sau trồng nấm: 50 kg
- + Bèo lục bình: 30 kg
- + Thân cây ngô, đậu, lạc: 20 kg

- Phương pháp ủ hỗn hợp: Trên nền xi măng, trộn đều 100 kg nguyên liệu ủ + 0,2 kg vôi và 0,3 kg supe lân, ủ trong 7 ngày, sau đó trộn đều với vi sinh vật tuyển chọn, nén chặt, xếp thành đống cao 70 cm, phủ kín bạt. Thời gian ủ 45 ngày.

Sau 30 ngày ủ đánh giá hàm lượng chất khô, đạm tổng số (N%), lân tổng số (P₂O₅ %), kali tổng số (K₂O) và hàm lượng cellulose của công thức ủ có bổ sung các chủng vi sinh vật tuyển chọn so với đối chứng (không bổ sung vi sinh vật) để đánh giá hiệu quả của các chủng vi sinh vật tuyển chọn.

- + Hợp chất khô: so sánh khối lượng trước và sau sấy ở 105°C
- + N tổng số: phương pháp Kjeldahl;
- + P₂O₅ tổng số: phương pháp so màu;
- + K₂O tổng số: phương pháp quang kế ngọn lửa;

+ Sử dụng phương pháp Koch để phân lập và đếm mật độ khuẩn lạc nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn thí nghiệm khi bắt đầu ủ và 7, 14, 21, 28 ngày sau ủ để đánh giá sự biến động mật độ vi sinh vật trong khối ủ theo thời gian.

- Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2010 và Statistic 10.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và xác định số lượng tế bào

Từ các mẫu mùn cưa, mẫu đất thu thập được chúng tôi đã tiến hành phân lập, đếm số lượng khuẩn lạc nấm và xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose trên môi trường thạch đĩa chứa nguồn carbon là CMC. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 2. Số lượng vi sinh vật trong các mẫu đất phân lập

Mẫu	CFU/g đất (10^7)		
	Nấm	Xạ khuẩn	Vi khuẩn
M1	30,55	0,032	0,36
M2	5,54	0,044	0,81
M3	1,047	0,01	2,97
M4	2,61	0,013	2,78
M5	11,42	0,018	2,66
M6	4,23	0,04	3,63
M7	102,87	0,02	4,61
M8	16,31	0,014	3,51
M9	57,43	0,017	2,25
M10	4,67	0,024	3,59
M11	0,34	0,019	3,42
M12	0,41	0,017	4,08

(CFU: Colonies Forming Unit)

Kết quả phân tích cho thấy, số lượng nấm mốc phân giải cellulose trong các mẫu đất ở những vùng khác nhau có sự biến động rất lớn từ $0,34 \times 10^7$ đến $102,87 \times 10^7$ CFU/g đất. Mẫu đất thu thập ở Vinh Xuân, Phú Vang có mật độ tế bào nấm mốc cao nhất đạt $102,87 \times 10^7$ CFU/g đất. Trong khi đó ở các mẫu đất ở Tứ Hạ có số lượng nấm mốc phân giải cellulose rất thấp, chỉ đạt $0,41 \times 10^7$ CFU/g đất và Phước Yên $0,34 \times 10^5$ CFU/g đất. Số lượng xạ khuẩn phân giải cellulose trong đất dao động trong phạm vi $0,01 - 0,044 \times 10^7$ CFU/g đất. Số lượng xạ khuẩn nhiều nhất ở mẫu M2, thu tại xưởng cưa ở Hương Sơ, thành phố Huế. Các mẫu thu ở Hương Trà và Phú Vang có số lượng xạ khuẩn phân giải cellulose rất thấp. Số lượng vi khuẩn phân giải cellulose trong các mẫu đất dao động $0,36 \times 10^7$ đến $4,61 \times 10^7$ CFU/g đất, trong đó mẫu có số lượng vi khuẩn cao nhất thu thập ở Vinh Xuân, Phú Vang, còn mẫu có số lượng vi khuẩn thấp nhất thu thập ở Hương Sơ. Sự khác nhau về số lượng nấm, xạ khuẩn và vi khuẩn phân giải cellulose trong đất có thể do nhiều yếu tố như: pH mẫu, điều kiện thời tiết khi lấy mẫu, loại đất, chế độ canh tác... Kết quả này so với các mẫu khác như mùn rác, mẫu nước, chất thải... thì số lượng vi sinh vật ở đây thấp hơn (Nguyễn Thị Lan Hương, 1999; Phạm Thị Ngọc Lan và cs., 1999).

3.2. Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật

Từ 12 mẫu chúng tôi đã phân lập được 62 chủng nấm mốc, 88 chủng xạ khuẩn và 69 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose. Qua đánh giá sơ bộ khả năng phân giải cellulose trên môi trường thạch đĩa cho thấy, các chủng nấm có khả năng phân giải yếu và trung bình chiếm tỷ lệ cao (87,09% và 3,23%) trong khi các chủng nấm phân giải cellulose

manh và rất manh chỉ chiếm tỷ lệ 6,46% và 3,23%. Khả năng phân giải cellulose của các chủng xạ khuẩn cao hơn so với các chủng nấm, tỷ lệ các chủng xạ khuẩn phân giải cellulose yếu và trung bình chỉ chiếm 48,86% và 25,0%, trong khi tỷ lệ các chủng xạ khuẩn phân giải manh và rất manh chiếm khá cao 18,18% và 7,95%. Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn là yếu hơn nấm và xạ khuẩn, trong đó các chủng phân giải yếu và trung bình chiếm tỷ lệ cao (89,85% và 7,3%), số chủng phân giải khá chiếm 1,45 % và manh chiếm 1,45%.

Bảng 3. Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật

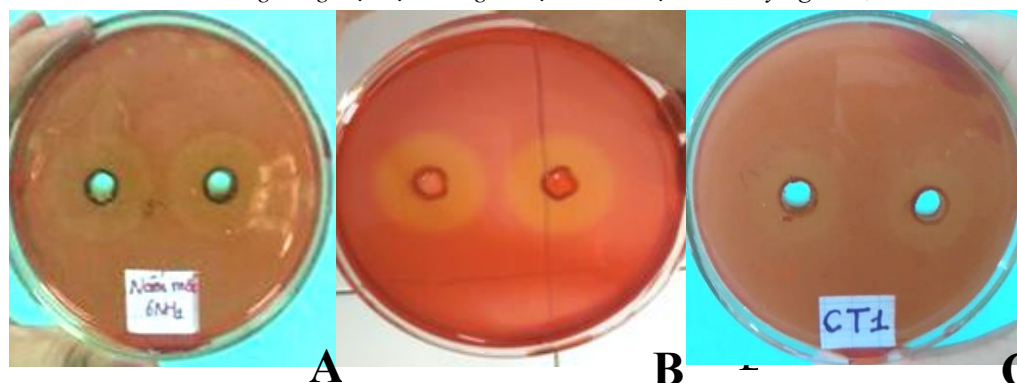
Khả năng phân giải	Đường kính vòng phân giải (mm)	Nấm		Xạ khuẩn		Vi khuẩn	
		Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Yếu	< 10	54	87,09	43	48,86	62	89,85
Trung bình	10 – 15	2	3,23	22	25,0	5	7,3
Khá	15–20	4	6,46	16	18,18	1	1,45
Manh	> 20	2	3,23	7	7,95	1	1,45

Từ kết quả kiểm tra khả năng thủy phân CMC của các chủng vi sinh vật chúng tôi lựa chọn 2 chủng nấm (6NH và 16NH), 2 chủng xạ khuẩn (17TH và 22TH) và 1 chủng vi khuẩn (NH1) có khả năng phân giải cellulose manh nhất để tiến hành nuôi cấy trên môi trường xốp, thu dịch chiết enzyme nhằm kiểm tra lại khả năng phân giải cellulose thông qua sự đánh giá hoạt tính của enzyme cellulase của các chủng vi sinh vật tuyển chọn. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Đường kính vòng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Chủng vi sinh vật	Kí hiệu	Đường kính vòng phân giải D - d (mm)
Nấm mốc	6NH	24 ^c ± 0,1
Nấm mốc	16XC	21 ^a ± 0,2
Xạ khuẩn	22TH	24,3 ^c ± 0,1
Xạ khuẩn	17 TH	22,6 ^b ± 0,1
Vi khuẩn	NH1	22,8 ^b ± 0,2

Ghi chú: D: vòng phân giải ngoài, d: đường kính khuẩn lạc, a, b, c: chỉ ra trong các công thức có cùng kí tự trong cùng một cột không có sự sai khai tại mức có ý nghĩa 0,05



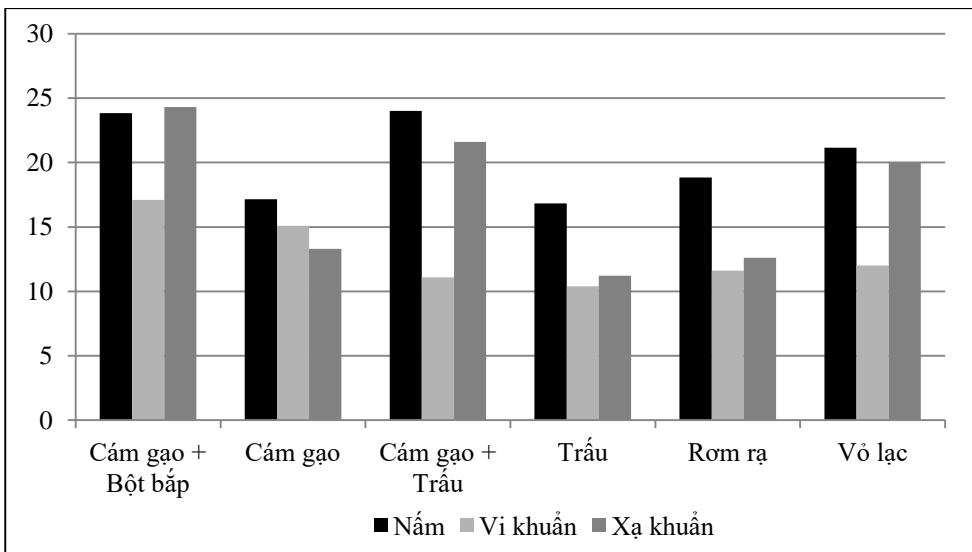
Hình 1. Đường kính vòng phân giải cellulose của các vi sinh vật tuyển chọn.

A: Vòng thủy phân cellulose của chủng nấm 6NH, B: Vòng thủy phân cellulose của chủng xạ khuẩn 22TH, C: Vòng thủy phân cellulose của chủng vi khuẩn NH1

Qua bảng 4 cho thấy đường kính vòng phân giải của 2 chủng nấm lần lượt đạt 21 mm và 24 mm, của xạ khuẩn lần lượt đạt 22,6 mm và 24,3 mm và của chủng vi khuẩn 22,8 mm. So sánh đường kính vòng phân giải của các dịch chiết enzyme 2 chủng nấm mốc (6NH và 16XC), 2 chủng xạ khuẩn (17TH và 22TH) và 1 chủng vi khuẩn NH1 cho thấy chủng nấm 6NH, chủng xạ khuẩn 22TH và chủng vi khuẩn NH1 có hoạt lực mạnh hơn nên chúng tôi chọn ba chủng này cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Chọn lọc giá thể tối ưu cho hoạt động sinh tổng hợp cellulase

Xác định giá thể nhân nuôi thích hợp cho các chủng vi sinh vật tuyển chọn được chúng tôi tiến hành nghiên cứu, kết quả được trình bày ở hình 2. Qua hình 2 cho thấy, khả năng phân giải cellulose của chủng nấm mốc 6NH thay đổi khi được nuôi trên các loại giá thể khác nhau. Trên giá thể cám gạo + trấu và cám gạo + bột bắp khả năng phân giải cellulose của chủng nấm 6NH đạt cao nhất thể hiện ở đường kính vòng phân giải lần lượt đạt 24 mm và 23,83 mm. Trên giá thể vỏ lạc và rom rạ khả năng phân giải cellulose đạt khá cao. Tuy nhiên, khi nuôi cấy trên môi trường chỉ thuần cám gạo hoặc trấu, khả năng phân giải cellulose thấp, đường kính vòng phân giải chỉ đạt lần lượt từ 17,16 mm và 16,83 mm.



Hình 2. Ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau đến đường kính vòng phân giải của các chủng vi sinh vật tuyển chọn.

Tương tự đối với chủng xạ khuẩn 22TH, trên giá thể cám gạo + bột bắp khả năng phân giải cellulose đạt cao nhất với đường kính vòng phân giải lần lượt là 24,3 mm, tiếp đến là trên giá thể cám gạo + trấu hay vỏ lạc, đường kính vòng phân giải lần lượt đạt 21,6 mm và 20 mm. Trên các môi trường còn lại, khả năng phân giải cellulose đạt thấp hơn và thấp nhất trên giá thể trấu.

Chủng vi khuẩn NH1 có đường kính vòng phân giải cao nhất trên môi trường cám gạo + bột bắp, tiếp đến là môi trường cám gạo, các môi trường còn lại có đường kính vòng phân giải thấp (<12 mm).

Kết quả trên cho chúng ta thấy, các vi sinh vật tuyển chọn có khả năng phân giải cellulose tốt nhất trên giá thể cám gạo + bột bắp, vì vậy chúng ta có thể sử dụng giá thể này để nhân sinh khối các vi sinh vật tuyển chọn.

3.4. Khả năng phân giải phế phụ phẩm nông nghiệp của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Để tìm hiểu khả năng phân giải phế phụ phẩm nông nghiệp giàu cellulose của 3 chủng vi sinh vật tuyển chọn, chúng tôi tiến hành thí nghiệm ủ hỗn hợp các phế phụ phẩm nông nghiệp với chủng nấm mốc 6NH, chủng xạ khuẩn 22TH và chủng vi khuẩn NH1 ở điều kiện tự nhiên trong 45 ngày. Một số chỉ tiêu được chúng tôi theo dõi và có kết quả như sau:

3.4.1. Hàm lượng chất khô

Hợp chất khô là một chỉ tiêu quan trọng trong đánh giá chất lượng của phân hữu cơ khi ủ, nó cho biết hàm lượng nước còn lại trong phân là bao nhiêu. Kết quả ở bảng 5 cho thấy hàm lượng chất khô có sự thay đổi theo thời gian ủ và theo công thức ủ. Hàm lượng chất khô ở 2 công thức thí nghiệm trước lúc ủ là như nhau, nhưng 30 ngày sau ủ, hàm lượng chất khô ở 2 công thức đều tăng lên và có sự sai khác có ý nghĩa. Trong đó, công thức 2 có hàm lượng chất khô là 47,39% cao hơn công thức 1 (44,56%).

Bảng 5. Hàm lượng chất khô trong các công thức thí nghiệm

Công thức	Hàm lượng hợp chất khô (%)	
	Trước khi ủ	Sau ủ 30 ngày
CT1	30,14	44,56
CT2	30,14	47,39

3.4.2. Hàm lượng cellulose

Kết quả phân tích hàm lượng cellulose của đồng ủ trước và sau xử lý các chủng vi sinh vật được thể hiện ở bảng 6. Bảng 6 cho thấy sự khác biệt về hàm lượng cellulose ở 2 công thức thí nghiệm sau khi ủ 30 ngày. Công thức 2 (xử lý đồng ủ với 3 chủng vi sinh vật tuyển chọn) cho thấy hàm lượng cellulose sau ủ giảm so với đối chứng đạt rất cao (75,0%). Điều này phản ánh khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ khó tiêu rất tốt của các chủng vi sinh vật tuyển chọn.

Bảng 6. Hàm lượng cellulose của đồng phế phụ phẩm nông nghiệp trước và sau ủ

Công thức	Hàm lượng cellulose (%)		Giảm so với ĐC (%)
	Trước ủ	Sau ủ	
CT1 (đ/c)	11,3	10,4	-
CT2	11,3	2,9	75,0

3.4.3. Hàm lượng đạm, lân, kali tổng số

Đạm, lân, kali là nguyên tố dinh dưỡng cần thiết và quyết định năng suất của cây trồng. Xác định hàm lượng đạm, lân, kali tổng số trong phân hữu cơ để xem xét khả năng cung cấp N, P, K từ trong phân, làm cơ sở bổ sung lượng phân bón hóa học cho cây.

Kết quả ở bảng 7 cho thấy, hàm lượng đạm, lân, kali tổng số ở 2 công thức thí nghiệm trước lúc ủ là như nhau, nhưng khi bổ sung vi sinh vật tuyển chọn vào để ủ, hàm lượng N, P, K tổng số đều tăng lên và cao hơn so với công thức không bổ sung vi sinh vật ở mức sai khác có ý nghĩa. Điều này chứng tỏ khi ủ phế phụ phẩm có bổ sung vi sinh vật phân giải cellulose giúp cho quá trình khoáng hóa diễn ra thuận lợi hơn.

Bảng 7. Hàm lượng đạm, lân, kali tổng số trong khối lượng khô của các công thức thí nghiệm

Công thức	Trước khi ủ			Sau khi ủ 30 ngày		
	N tổng (%)	P tổng (% P ₂ O ₅)	K tổng (% K ₂ O)	N tổng (%)	P tổng (% P ₂ O ₅)	K tổng (% K ₂ O)
CT1	0,82	0,26	0,51	0,83 ^a	0,32 ^a	0,53 ^a
CT2	0,82	0,26	0,51	0,92 ^b	0,41 ^b	0,60 ^b

a, b, chỉ ra trong các công thức có cùng kí tự trong cùng một cột không có sự sai khác tại mức có ý nghĩa 0,05

3.4.4. Mật độ vi sinh vật

Mật độ vi sinh vật trong khối ủ được kiểm tra theo thời gian, kết quả được trình bày ở bảng 8. Với tỷ lệ cây giống vào khối ủ là 5% khối lượng, mật độ nấm mốc trong khối ủ giảm đều theo thời gian. Bắt đầu ủ, mật độ nấm mốc đạt khoảng $4,85 \times 10^8$ CFU/g. Tỷ lệ này giảm không đáng kể sau 1 tuần ủ. Tuy nhiên, mật độ nấm mốc giảm xuống còn $0,32 \times 10^8$ CFU/g sau 4 tuần ủ. Tỷ lệ này vẫn đảm bảo mật độ vi sinh trong khối ủ khoảng 10^8 tế bào. Mật độ xạ khuẩn trong khối ủ cũng giảm dần nhưng không đáng kể. Sau 28 ngày ủ mật độ xạ khuẩn giảm từ $6,32 \times 10^8$ xuống còn $0,44 \times 10^8$. Mật độ vi khuẩn trong khối ủ cũng giảm dần và sau 28 ngày ủ mật độ xạ khuẩn giảm từ $5,72 \times 10^9$ xuống còn $0,43 \times 10^8$. Mật độ vi khuẩn trong khối ủ giảm nhiều hơn so với mật độ của nấm mốc và xạ khuẩn, nhưng nhìn chung mật độ vi sinh vật tuyển chọn sau 4 tuần ủ vẫn đạt 10^8 .

Bảng 8. Diễn biến mật độ vi sinh vật tuyển chọn trong khối ủ theo thời gian

Thời gian ủ	Mật độ vi sinh vật (CFU/g)		
	Chủng nấm 6NH	Chủng xạ khuẩn 22TH	Chủng vi khuẩn NH1
Bắt đầu ủ	$4,85 \times 10^8$	$6,32 \times 10^8$	$5,72 \times 10^9$
7 NSU	$2,90 \times 10^8$	$3,54 \times 10^8$	$3,39 \times 10^8$
14 NSU	$1,52 \times 10^8$	$2,06 \times 10^8$	$2,46 \times 10^8$
21 NSU	$0,75 \times 10^8$	$0,93 \times 10^8$	$1,14 \times 10^8$
28 NSU	$0,32 \times 10^8$	$0,44 \times 10^8$	$0,43 \times 10^8$

Ghi chú: NSU: ngày sau ủ

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Số lượng vi sinh vật trong các mẫu nghiên cứu có sự biến động lớn: nấm mốc: $0,34 \times 10^7$ đến $102,87 \times 10^7$ CFU/g đất, xạ khuẩn: $0,01 \times 10^7 - 0,04 \times 10^7$ CFU/g đất và vi khuẩn: $0,36 \times 10^7$ đến $4,61 \times 10^7$ CFU/g đất.

Trong 62 chủng nấm mốc, 88 chủng xạ khuẩn và 69 chủng vi khuẩn phân lập được, các chủng có khả năng phân giải cellulose mạnh chiếm 1,45 - 7,95%. Trong đó, chủng nấm 6NH, chủng xạ khuẩn 22TH và chủng NH1 có khả năng phân giải cellulose cao nhất nên được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

Các vi sinh vật tuyển chọn có khả năng phân giải cellulose tốt nhất trên giá thể cám gạo + bột bắp vì vậy có thể sử dụng cám gạo + bột bắp để làm giá thể nhân sinh khối các vi sinh vật này.

Ủ phế phụ phẩm nông nghiệp với các chủng vi sinh vật tuyển chọn cho thấy khả năng phân giải cellulose của chúng rất tốt (giảm 75,0% cellulose so với đối chứng), hàm lượng đạm, lân, kali tổng số đều tăng hơn so với đối chứng. Mật độ các chủng vi sinh vật giảm dần qua 4 tuần ủ, tuy nhiên vẫn đảm bảo mật độ vi sinh vật trong khối ủ khoảng 10^8 CFU/g.

4.2. Đề nghị

Ứng dụng phương pháp công nghệ sinh học để định danh loài các chủng nấm 6NH, xạ khuẩn 22TH và vi khuẩn NH1.

Sử dụng 3 chủng vi sinh vật tuyển chọn trong nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp làm phân hữu cơ vi sinh.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Đại học Huế đã tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

- Huỳnh Anh, (2004). *Nghiên cứu về nấm sợi Trichoderma reesei sinh tổng hợp enzyme cellulose trên môi trường lỏng với nguồn cacbon là CMC*. Tp.HCM: Nhà xuất bản ĐH Quốc gia.
- Nguyễn Lan Hương, (1999). *Phân lập và hoạt hóa vi sinh vật ưa nhiệt có hoạt tính cellulase cao để bổ sung vào khối ủ, rút ngắn chu kỳ xử lý rác thải sinh hoạt*. Báo cáo khoa học hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 531 – 536.
- Phạm Thị Ngọc Lan, Phạm Thị Hòa, Lý Kim Bằng, (1999). *Tuyển chọn một số giống xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ mùn rác*. Báo cáo khoa học hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 177 – 182.
- Trần Thanh Phong, Hoàng Quốc Khánh, Võ Thị Hạnh, Lê Bích Phượng, Nguyễn Duy Long, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân, (2007). Thu nhận enzyme cellulase của T. Reesei trên môi trường bán rắn. *Tạp chí Phát triển Khoa Học và Công Nghệ*, 07(10).
- Hà Thanh Toàn, Cao Ngọc Điệp, Trần Lê Kim Ngân, Nguyễn Thu Phương, Mai Thu Thảo, Bùi Thế Vinh, (2008). Phân lập vi khuẩn phân giải xenlulo, tinh bột và protein trong nước rỉ từ bãi rác ở thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Nông Nghiệp*, 10, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Ngọc Trúc, (2015). *Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn phân giải xenlulo từ cành cây Thanh Long*. Báo cáo khoa học hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ 2, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 972-982.
- Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp, (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 18a, 177-184.

Tài liệu tiếng Anh

- Behera B. C., Parida S., Dutta S. K., Thatoi H. N., (2014). Isolation and Identification of xenlulo degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi River Delta and their cellulase production ability. *American Journal of Microbiological Research*, 2(1), 41-46.
- Tolan J. S., Foody B., (1999). *Cellulase from submerged fermentation*. In: *Advances in Biochemical Engineering*. Biotechnology Vol 65. Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics. Berlin: SpringerVerlag, 41-67.
- Schwarz, W. H., (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 634-649.
- Yang Ling Liang, Zheng Zhang, Min Wu and Jia Xun Feng, (2014). *Isolation, screening and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of china and optimization of cellulose production by Paenibacillus terrae ME27-1*. BioMed Research International Volume 2014, Article ID 512497.

ISOLATION AND SELECTION OF SOME CELLULOSE DECOMPOSITION MICROORGANISMS IN AGRICULTURAL WASTE TO MAKE MICROBIAL ORGANIC FERTILIZER

Nguyen Thi Thu Thuy¹, Le Thi Huong Xuan¹, Cao Thi Dung²,
Tran Thi Xuan Phuong¹, Truong Thi Hong Hai¹

¹Agronomy Faculty, University of Agriculture and Forestry, Hue University

²Nha Ho Institute for Cotton and Agricultural

Contact email: nguyenthithuthuy@huaf.edu.vn

ABSTRACT

The objectives of this study are to isolate and select the microorganisms which have cellulase – producing the ability to decompose cellulose and initial application of these selected microorganisms in making compost from agricultural waste to produce microbial organic fertilizer. The results show that the density of microorganisms in the collected samples highly fluctuates. Mold density ranges from $0,34 \times 10^7$ to $102,87 \times 10^7$ CFU/g of sample, actinomycetes are $0,01 \times 10^7$ - $0,04 \times 10^7$ CFU/g of sample and bacteria are from $0,36 \times 10^7$ to $4,61 \times 10^7$ CFU/gram of sample. Among of 62 molds, 88 Streptomyces and 69 bacteria isolate from collected soils samples at 12 different locations of Thua Thien Hue province, three strains including 6NH (mold), 22TH (actinomycetes) and NH1 (bacteria) are selected indicating the highest diameter of the cellulose-clearing zone. The study of using some formulations to produce the biomass of three selected strains shows that the formulation of rice bran: corn flour (ratio 1:1) having the highest cellulose-clearing zone by testing the extract from biomass at in vitro condition. Composting these selected strains composted with agricultural waste shows that the content of cellulose decreases 75% in comparison with control and nutrient content (the total of N, P₂O₅, K₂O) was also higher than the control.

Key words: Actinomycetes, bacteria, cellulose, molds

Received: May 18, 2017

Reviewed: June 5, 2017

Accepted: June 10, 2017