

# PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN PHÂN GIẢI XENLULO SẢN XUẤT PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC

Nguyễn Thị Thuý Nga<sup>1</sup>, Phạm Quang Nam<sup>2</sup>, Lê Xuân Phúc<sup>1</sup>,  
Phạm Quang Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Chí<sup>1</sup>

1. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

2. Trường Đại học Quốc gia Hà Nội

## TÓM TẮT

Nước ta ước tính khoảng 10% phế liệu gỗ có thể thu gom và sử dụng được, tuy nhiên chỉ một phần nhỏ được tận dụng cho các mục đích khác nhau còn lại hầu hết bị thải bỏ hoặc xử lý bằng cách đốt, điều này gây lãng phí và ảnh hưởng nghiêm trọng tới môi trường và bảo vệ rừng. Xử lý các phế thải trong lâm nghiệp bằng công nghệ vi sinh vật tỏ ra có nhiều ưu điểm cả về hiệu quả môi trường, kinh tế và kỹ thuật, đồng thời tạo ra sản phẩm phân bón hữu cơ có thể tái sử dụng cho sản xuất nông lâm nghiệp. Trong khuôn khổ thí nghiệm này, chúng tôi đã phân lập được 24 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải xenlulo, tuyển chọn 2 chủng vi khuẩn X1 và X10 có khả năng phân giải xenlulo mạnh được nhân sinh khối để sản xuất phân hữu cơ sinh học. Chủng X1 phát triển tốt nhất, có khả năng phân giải xenlulo cao nhất khi được nuôi cấy trên môi trường PD có 1% CMC với nhiệt độ 30 - 35°C và độ pH = 5,5. Chủng X10 phát triển tốt nhất, có khả năng phân giải xenlulo cao nhất khi được nuôi cấy trong môi trường PD có 1% CMC với nhiệt độ 35°C và độ pH = 6 - 6,5. Vật liệu vỏ và lá keo đưa vào ủ phân hữu cơ sinh học cần sơ chế giập nát với kích thước 2 × 3cm, với độ ẩm đạt từ 50 - 60%, pH = 6 - 7, thời gian tạo phân hữu cơ sinh học khoảng 90 ngày, đạt hàm lượng NPK là cao nhất và hàm lượng hữu cơ đạt tới 23%.

**Từ khoá:** Phân hữu cơ sinh học, vi khuẩn phân giải xenlulo

## Isolating and screening cellulolytic microorganisms to produce organic biofertilizer

Estimatedly, in Vietnam, there are at least 10% of scrap wood can be collected and reused. However, just a small amount was reused for different purposes and the rest was discarded or burned, which not only caused serious financial and enviromental damage but also affected forest protection. Composting forestry scrap with mircobiological technique has shown various environmental and economic advantages. Moreover, the process also produced organic biofertilizer which can apply to agricutural and forestry soil. In this study, 24 cellulose degrading strains were isolated, in which microbial strain X1 and X2 had the highest activity and were applied to produce organic bioferilizer. Strain X1 showed the greatest development and cellulose degration in PD 1% CMC medium at 30 - 35°C and pH level 5.5. Strain X10 showed the greatest development and cellulose degration in PD 1% CMC medium at 35°C and pH level 6 - 6.5. In composting process, to yield the highest NPK content and organic content of 23%, Acacia bark and leaf materials need to crush into 2 × 3cm pieces, maintain the humidity at 50 - 60%, pH = 6 - 7 and composting time last for 90 days.

**Keywords:** Microbes decompose celulose, microbes decompose cellulose

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hàng năm lượng chất thải được thải ra từ việc khai thác và chế biến gỗ là rất lớn. Theo bài báo “Chất thải trong Nông nghiệp”, đăng trên báo Nông thôn ngày nay (2006) ở Tây Nguyên sinh khối thải ra từ cây cà phê là 0,3 - 0,5 triệu tấn/năm, ở vùng Tây Bắc hàng năm đã thải ra khoảng 55.000 - 60.000 tấn mùn cưa từ việc khai thác và chế biến gỗ. Những chất thải trên đã gần như chưa được sử dụng hoặc chỉ có thể để chúng ngoài môi trường để chúng tự phân hủy. Trong quá trình khai thác, chế biến gỗ đã hình thành một lượng vô cùng lớn phế thải sinh khối, chủ yếu là dăm mảnh vụn gỗ, cành nhánh, lá cây chưa được tận dụng một cách hiệu quả, gây lãng phí và ảnh hưởng đến môi trường. Mặc dù chưa có nghiên cứu và thống kê nào về tỉ lệ phế thải khi khai thác, song theo đánh giá có ít nhất 10% phế liệu gỗ (bao gồm cành nhánh khi khai thác và mùn vụn gỗ khi chế biến nguyên liệu) có thể thu gom và sử dụng được, tuy nhiên chỉ một phần nhỏ được tận dụng cho các mục đích khác nhau (sản xuất ván nhân tạo, củi đốt, phân bón hữu cơ), còn lại hầu hết bị thải bỏ hoặc xử lý bằng cách đốt, gây lãng phí và ảnh hưởng nghiêm trọng tới môi trường. Do đó việc nghiên cứu đưa ra những phương pháp xử lý các phế thải gỗ bằng vi sinh tạo ra phân bón hữu cơ hay hữu cơ vi sinh không những mang lại hiệu quả kinh tế mà còn góp phần vào giải quyết vấn đề môi trường trong ngành khai thác và chế biến lâm sản.

Xử lý các phế thải trong lâm nghiệp bằng công nghệ vi sinh vật tỏ ra có nhiều ưu điểm, cả về hiệu quả môi trường, kinh tế và kỹ thuật, lại tạo ra sản phẩm phân bón hữu cơ có thể tái sử dụng cho sản xuất nông lâm nghiệp. Theo Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp (2011) việc xử lý các chất thải hữu cơ chứa xenlulo

bằng công nghệ sinh học, đặc biệt sử dụng các enzyme xenlulo peroxidase ngoại bào từ vi sinh vật đem lại rất nhiều lợi ích. Các loài vi sinh vật này đều sẵn có trong tự nhiên mà số lượng rất phong phú (Gautam S. P *et al.*, 2012). Chúng thuộc nhóm nấm sợi, xạ khuẩn, vi khuẩn và trong một số trường hợp còn thấy cả nấm men cũng tham gia quá trình phân giải này. Công trình nghiên cứu này đề cập đến việc tuyển chọn những chủng vi khuẩn đặc hiệu, nhân nuôi sinh khối để tạo chế phẩm vi sinh vật phân hủy các vỏ, lá cây sau khai thác gỗ rừng trồng Keo tai tượng và keo lai tạo phân hữu cơ sinh học phục vụ trồng rừng.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Các vỏ, cành nhánh, lá cây keo thu thập tại rừng trồng sau khai thác.
- Mẫu đất có các cành lá keo đang phân hủy, tại lớp đất mặt rừng trồng cây keo.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật phân giải xenlulo

##### 2.2.1.1. Phương pháp phân lập chủng vi sinh vật phân giải xenlulo

Các mẫu thu thập về được nghiền nhỏ, lấy 1g cho vào bình tam giác chứa 9ml nước cất vô trùng, lắc đều trong 15 phút. Tiếp tục hút 1ml sang ống nghiệm chứa 9ml nước cất vô trùng được nồng độ  $10^{-2}$ , cứ như vậy pha loãng tới nồng độ  $10^{-6}$ . Sau đó hút 0,1ml dịch ở các nồng độ  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  trang dàn đều lên bề mặt môi trường Hans (Schaad N. W. *et al.*, 2000) đã được đổ sẵn ra đĩa petri, mỗi nồng độ phân lập trên 3 đĩa petri. Thường xuyên theo dõi và quan sát sự phát triển của các vi sinh vật, khi thấy vi khuẩn xuất hiện, tách riêng từng chủng và ghi rõ ký hiệu cho từng chủng, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### 2.2.1.2. Phương pháp tuyển chọn vi sinh vật phân giải hợp chất hữu cơ xenlulo

Chuẩn bị dịch chiết chứa enzyme : Cây các chủng vi sinh vật đã phân lập ở trên vào các bình tam giác chứa 100ml môi trường PD vô trùng, nuôi ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 10-12 ngày. Tách dịch chiết chứa enzyme ngoại bào bằng phương pháp ly tâm với vận tốc 5000 vòng/phút trong 20 phút, chất lấy nước trong.

Môi trường CMC đã được đổ sẵn ra các đĩa petri, khoan 1 lỗ thạch đường kính 10mm ở chính giữa của đĩa petri . Đổ đầy giếng thạch bằng dịch enzyme thô , sau đó để trong tủ lạnh trong 2 ngày để enzyme ngoại bào khuếch tán đều ra môi trường . Sau đó lấy 5ml dung dịch thuốc thử công gô đỏ (0,25g:100ml nước) dàn đều trên bề mặt thạch. Nếu enzyme có hiệu lực thì xung quanh lỗ khoan sẽ xuất hiện một vòng trong suốt hay còn gọi là vòng thủy phân.

Khả năng phân giải được tính theo công thức:  
 $V(\text{mm}) = D(\text{mm}) - d(\text{mm})$

Trong đó: V là khả năng phân giải, D là đường kính vòng phân giải, d là đường kính lỗ khoan. Chỉ số V càng lớn cho thấy hoạt lực của enzym ngoại bào càng mạnh, phân cấp hoạt lực theo chỉ tiêu sau:

V<10mm	Khả năng phân hủy xenlulo yếu (-),
15mm >V≥10mm	Khả năng phân hủy xenlulo trung bình (+),
20mm >V≥15mm	Khả năng phân hủy xenlulo khá (++) ,
V ≥ 20mm	Khả năng phân hủy xenlulo mạnh (+++).

### 2.2.1.3. Phương pháp xác định điều kiện sinh trưởng tối ưu cho chủng vi khuẩn phân giải xenlulo.

- *Phương pháp xác định môi trường dinh dưỡng:* Vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên 3 loại môi

trường MT 1: môi trường Hans , MT2: môi trường PD + 1% CMC, MT3: môi trường Hutchinson. Với Xạ khuẩn hoặc nấm được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, điều kiện môi trường tĩnh. Sau 48 giờ đem xác định mật độ tế bào các chủng vi sinh vật phân giải xellulo (CFU/ml).

- *Phương pháp xác định ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật độ tế bào vi khuẩn:* Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường dinh dưỡng tối ưu như đã chọn ở trên nhưng có bổ sung agar , nuôi ở các thang nhiệt độ không khí khác nhau: 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C. Sau 120 giờ xác định số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

- *Phương pháp xác định ảnh hưởng của pH môi trường :* Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường dinh dưỡng tối ưu , nhiệt độ 30°C, lắc 200 vòng/phút (với vi khuẩn) và nuôi trong điều kiện tĩnh (với xạ khuẩn và nấm ). Điều chỉnh để được pH môi trường đạt 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5. Sau 120 giờ xác định khả năng sinh tổng hợp enzyme xenlulo thông qua đường kính vòng phân giải.

### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu lựa chọn các yếu tố thích hợp cho quá trình phân hủy xenlulo của vỏ và lá keo.

- *Xác định mức độ kích thước của các nguyên liệu đưa vào thí nghiệm gồm 3 công thức:* Công thức 1 (CT1) để cả vỏ và cành lá dài đưa vào thí nghiệm: Công thức 2 băm cả vỏ và lá với kích thước 2 × 3cm<sup>2</sup>; Công thức 3 băm vỏ với kích thước 2 × 3cm<sup>2</sup>. Sau 90 ngày thí nghiệm xác định, hàm lượng các chất: hữu cơ tổng số (OM<sub>TS</sub>), nitơ tổng số (N<sub>TS</sub>), photpho tổng số (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sub>TS</sub>), kali tổng số (K<sub>2</sub>O<sub>TS</sub>), thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- *Xác định độ ẩm cơ chất được thí nghiệm với 5 công thức:* độ ẩm 50%; độ ẩm 55%; độ ẩm 60%; độ ẩm 65%; độ ẩm 70%. Sau 90 ngày thí nghiệm với mỗi thang độ ẩm khác nhau xác

định hàm lượng các chất: hữu cơ tổng số (OM<sub>TS</sub>), nitơ tổng số (N<sub>TS</sub>), photpho tổng số (P<sub>2</sub>O<sub>5TS</sub>), kali tổng số (K<sub>2</sub>O<sub>TS</sub>), thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- *Xác định ảnh hưởng của độ pH được tiến hành cho 5 công thức:* ở các độ pH = 4; pH = 5; pH = 6; pH = 7; pH = 8. Sau 90 ngày thí nghiệm ở các độ pH khác nhau xác định hàm lượng các chất: hữu cơ tổng số (OM<sub>TS</sub>), nitơ tổng số (N<sub>TS</sub>), photpho tổng số (P<sub>2</sub>O<sub>5TS</sub>), kali tổng số (K<sub>2</sub>O<sub>TS</sub>), thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật phân giải hợp chất hữu cơ xenlulo

Phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải hợp chất hữu cơ xenlulo từ lớp đất mùn dưới vật rơi rụng của cây lâm nghiệp, kết quả phân lập được tổng số 24 chủng vi sinh vật với hình dạng , kích thước , màu sắc khuẩn lạc khác nhau . Kết quả được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1.** Các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải xenlulo phân lập

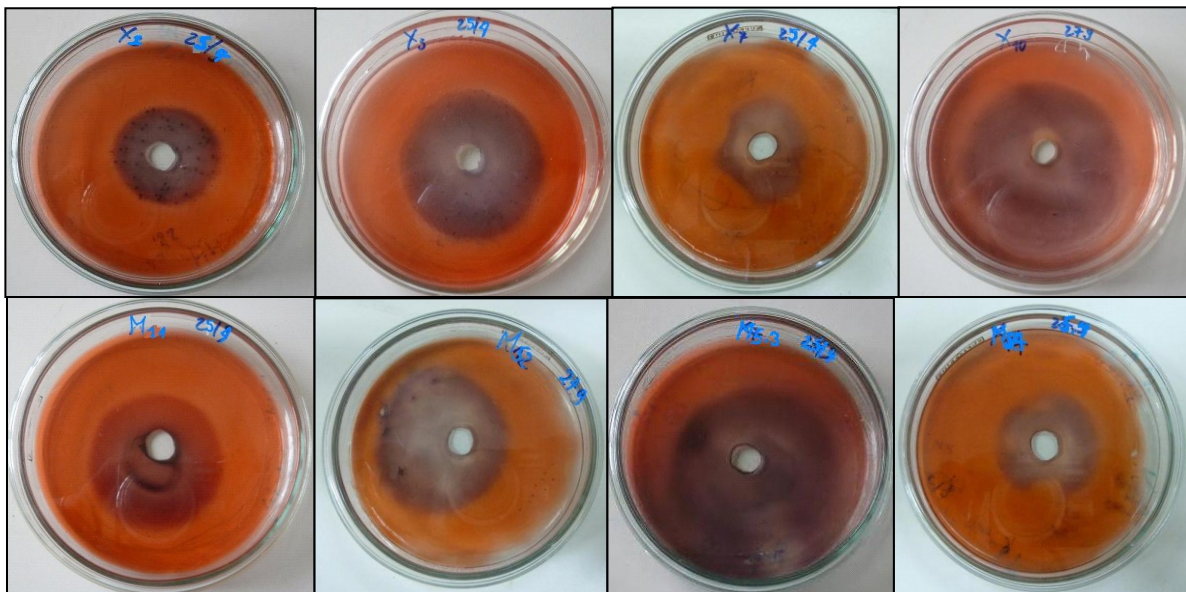
TT	Ký hiệu chủng	Mật độ (CFU/g)	Hình dạng khuẩn lạc	Màu sắc	V (mm)	Nguồn phân lập	Hiệu lực
1	X1	3,9 x 10 <sup>2</sup>	Mọc xù xì,	Xanh lục, vành trắng	30,4	đất	+++
2	X3	6,1 x 10 <sup>2</sup>	Mọc sun sun	Xám có vành trắng	26,7	đất	++
3	X7	4,1 x 10 <sup>2</sup>	Mọc sun sun	Trắng đục	25,3	đất	++
4	X10	3,9 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tua	Xanh lục có vành trắng	29,2	đất	+++
5	X12	4,7 x 10 <sup>2</sup>	Mọc dích dắc	Màu nâu	20,0	đất	+
6	X14	10 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Nâu sẫm	20,0	đất	+
7	M1.1	3,1 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tua	Xanh rêu	25,1	lá	++
8	M2.1	4,5 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tua	Xám nâu	10,0	lá	+
9	M2.2	3,7 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Vàng nhạt	15,3	lá	+
10	M3.1	5,0 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Trắng vàng	12,7	lá	+
11	M3.2	4,1 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tua	Xanh lục	15,1	lá	+
12	M4.2	4,0 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Vàng	15,4	lá	+
13	M4.3	5,5 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Vàng nhạt	13,1	lá	+
14	M4.4	3,0 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Vàng nhạt	9,3	lá	-
15	M4.5	4,1 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Trắng tím	20,0	lá	+
16	M4.6	10 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Vàng nhạt	20,0	lá	+
17	M4.7	6,0 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tua	Đen nhạt	6,5	lá	-
18	M5.1	5,2 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Hồng nhạt	9,5	lá	-
19	M5.2	3,4 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Hồng nhạt	26,2	lá	++
20	M5.3	4,6 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Vàng	25,1	lá	++
21	M5.4	6,5 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Vàng nhạt	25,3	lá	++
22	M5.5	5,4 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tua	Nâu	13,6	lá	+
23	M5.6	7,0 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Vàng nhạt	12,5	lá	+
24	M5.7	10 x 10 <sup>2</sup>	Mọc tròn	Tím hồng nhạt	10,4	lá	+

Qua bảng 1 cho thấy từ các mẫu phân lập được tổng số 24 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải xenlulo. Trong đó mẫu đất thu được 6 chủng, còn các chủng còn lại thu được từ mẫu cành và lá keo đang phân hủy. Mật độ của các chủng cũng rất khác nhau, một số chủng có mật độ bào tử vi sinh vật cao hơn như chủng X14, M4.6, M5.7, mật độ lên đến  $10 \times 10^2$  (CFU/g). Một số chủng như M 4.3, M4.7, M5.1, M5.4, M5.5, M5.6, có mật độ vi sinh vật trung bình, với mật độ dao động từ  $5,0 - 7,0 \times 10^2$  (CFU/g). Các chủng mật độ vi sinh vật còn lại có mật độ bào tử thấp hơn dao động từ  $3,0 - 5,0 \times 10^2$  (CFU/g). Như vậy có thể thấy các chủng vi sinh ở trong mẫu phân tích có mật độ cao chỉ có 3/24 chủng chiếm 12,5%, chủng có mật độ trung bình chiếm 7/24 chủng tương đương 29,2%, và cuối cùng chủng vi sinh vật có mật độ thấp là nhiều nhất, có tới 14/24 chủng chiếm 58,3%. Qua kết quả trên cũng cho thấy, mật độ vi sinh vật phân lập được có khả năng phân giải xenlulo ở đây là khá khiêm tốn và chủ yếu tập trung tại vùng lá cây đang phân hủy ở lớp đất mặt rừng trồng.

Ngoài ra có thể thấy các chủng vi sinh vật ở đây có màu sắc rất phong phú và đa dạng như :

màu trắng, vàng, lục, nâu, đen, hồng... Các chủng này cũng có hình dạng mọc rất khác nhau: mọc tròn như các chủng : X14, M2.2, M3.1, M4.2, M4.3, M4.4, M4.5, M4.6, M5.1, M5.2, M5.3, M5.4, M5.6, M5.7 mọc tua như các chủng: X10, M1.1, M2.1, M3.2, M4.7, M5.5 mọc xù xì, mọc sun sun hay mọc dích dắc như các chủng: X1, X3, X7, X12.

Các chủng vi sinh vật tuyển chọn thì khả năng phân hủy xenlulo là rất khác nhau, mạnh yếu tùy thuộc vào từng chủng. Trong 24 chủng được phân lập, tuyển chọn 8 chủng có hiệu lực phân giải xenlulo khá và mạnh với đường kính vòng thủy phân lớn hơn 25mm bao gồm các chủng M 1.1, M5.2, M5.3, M5.4, X7, X3, X1, X10 chiếm khoảng 33,0%, đặc biệt chủng X 1 trị số V rất cao lên đến 30,4mm chủng X10 trị số V = 29,2mm. Có 13 chủng có khả năng phân giải xenlulo trung bình với đường kính vòng thủy phân trong khoảng 10 đến 20mm, chiếm 54,17% trong tổng số chủng vi sinh vật phân lập được và chỉ có 3 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải xenlulo ở mức độ yếu bao gồm chủng M4.4, M4.7, M5.1 với đường kính vòng thủy phân từ 6,5 đến 9,5 (V < 10) (Hình 1).



**Hình 1.** Vòng phân giải xellulo của các chủng vi sinh vật

Như vậy trong 24 chủng vi sinh vật tuyển chọn thì có 8 chủng vi sinh vật có hiệu lực phân giải xenlulo khá và mạnh, bao gồm: X1, X3, X7, X10, M1.1, M5.2, M5.3, M5.4. Nghiên cứu lựa chọn 2 chủng vi khuẩn xenlulo mạnh nhất là chủng **X1** và **X10** đưa vào các nghiên cứu điều kiện sinh trưởng để tìm ra khả năng phát triển tối ưu ở các điều kiện môi trường khác nhau.

**3.2. Kết quả xác định điều kiện sinh trưởng tối ưu cho các chủng vi khuẩn phân giải xenlulo**

**3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn**

Mỗi sinh vật đều có môi trường dinh dưỡng tối ưu khác nhau, sự thích hợp cho sinh trưởng của vi sinh vật thể hiện mật độ hữu hiệu trên 1ml dung dịch nuôi cấy là lớn nhất. Chính vì vậy nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến mật độ tế bào vi sinh vật giúp chúng ta biết được trên môi trường nào nó có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt nhất, từ đó lựa chọn được môi trường nhân sinh khối thích hợp. Thí nghiệm được thực hiện trên 3 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau là MT1, MT2, MT3. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến mật độ tế bào các chủng VK phân giải xenlulo

TT	Tên chủng	Mật độ tế bào vi sinh vật (CFU/ml)		
		MT1	MT2	MT3
1	X1	$9,85 \times 10^7$	$9,98 \times 10^7$	$7,4 \times 10^6$
2	X10	$9,56 \times 10^7$	$9,78 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7$

Từ kết quả bảng 2 cho thấy: Khi các chủng vi sinh vật được cấy vào 3 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau, ban đầu chúng đều ở dạng dịch trong và lỏng, sau thời gian nuôi cấy 120 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C các chủng khuẩn trở nên đục và đặc sánh. Điều này cho thấy cả 2 chủng vi sinh vật

đều có khả năng sinh trưởng trên 3 môi trường dinh dưỡng thử nghiệm, tuy nhiên khả năng sinh trưởng đó có thể nhanh hoặc chậm, tùy thuộc vào từng chủng. Ví như không có sự khác biệt lớn giữa MT 1 và MT 2. Nhưng sự khác nhau này thể hiện rất rõ khi so sánh mật độ của cả 2 chủng vi sinh vật ở môi trường MT1, MT2 với môi trường MT 3. Mật độ tế bào ở MT 3 thấp hơn rất nhiều so với 2 môi trường còn lại. Cụ thể chủng X1 mật độ tế bào của chúng cực đại đạt là  $9,98 \times 10^7$  (CFU/ml) khi chúng được nuôi cấy trên môi trường MT 2 (PD có 1% CMC) và MT 1 (PD), còn ở MT 3 mật độ chỉ đạt  $7,4 \times 10^6$  (CFU/ml). Chủng X10 cũng thích hợp trên 2 loại môi trường là PD và PD có 1% CMC, mật độ tế bào khá lớn đạt cực đại là  $9,78 \times 10^7$  (CFU/ml), trong khi nuôi trên môi trường 3 mật độ tế bào chỉ đạt  $5,2 \times 10^7$  (CFU/ml). Như vậy, chủng X10 và chủng X1 có khả năng phát triển tốt nhất trên môi PD có 1% CMC.

**3.2.2. Kết quả xác định ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn phân giải xenlulo**

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển và sinh tổng hợp enzyme xenlulo. Khả năng hoạt động của các chủng vi sinh vật thay đổi theo sự biến thiên của nhiệt độ, hoạt động sống của chúng dựa trên sự chuyển hóa của hàng loạt các phân hủy theo những trình tự xác định. Khi nhiệt độ tăng cao thì tốc độ các quá trình này cũng tăng theo. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng quá một giới hạn nhất định nào đó thì tốc độ các phản ứng trong cơ thể sẽ giảm đi. Điều này là do cấu trúc của protein enzyme chỉ được ổn định trong một giới hạn nhiệt độ nhất định và cũng như vậy khi nhiệt độ xuống đến mức quá thấp cho phép. Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng vi sinh vật phân giải xenlulo được thể hiện ở (bảng 3).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến mật độ tế bào các chủng VK phân giải xenlulo

TT	Tên chủng	Mật độ tế bào vi sinh vật (CFU/ml)				
		25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
1	X1	$5,0 \times 10^7$	$6,7 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$7,8 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7$
2	X10	$2,8 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$5,5 \times 10^8$	$5,6 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$

Qua bảng 3 cho thấy chủng X 1 sinh trưởng được trong khoảng nhiệt thích hợp từ 25 - 45°C, nhưng ở nhiệt độ thích hợp nhất 30 - 35°C mật độ tế bào đạt cực đại là  $6,5 - 6,7 \times 10^8$  (CFU/ml). Trong khi ở thang nhiệt độ 25°C mật độ tế bào chỉ đạt  $5,0 \times 10^7$  (CFU/ml), bằng 10% so với ở thang nhiệt độ từ 30 - 35°C. Khi được nuôi ở thang nhiệt độ cao hơn từ 40 - 45°C mật độ tế bào cũng giảm đáng kể đạt  $7,8 \times 10^7$  (CFU/ml). Như vậy chủng X1 đạt nhiệt độ tối thích là 30 - 35°C.

Chủng X10 có sự khác biệt đáng kể, chúng phát triển tốt nhất là nhiệt độ từ 35°C, ở thang nhiệt độ này chúng đạt mật độ tế bào tối đa là  $5,5 \times 10^8$  (CFU/ml), trong khi ở thang nhiệt độ thấp hơn chúng chỉ đạt mật độ tế bào là  $2,8 - 4, \times 10^7$  (CFU/ml). Như vậy chủng X10 đạt nhiệt độ tối thích là 35°C.

**3.2.3. Kết quả xác định ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn phân giải xenlulo**

Giá trị pH của môi trường ảnh hưởng đến sinh trưởng và sinh tổng hợp của vi sinh vật không giống nhau. Có những giá trị pH mà ở đó vi sinh vật phát triển bình thường nhưng quá trình sinh tổng hợp enzyme lại ít hoặc không tạo thành. Sự thay đổi pH phụ thuộc chủ yếu vào hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật và khả năng đệm của cơ chất. pH môi trường ít làm ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme ở vi sinh vật vì môi trường rắn có tính đệm cao. Do đó việc xác định pH môi trường ban đầu cho các chủng vi sinh vật là rất quan trọng. Muốn phát triển và sinh tổng hợp enzyme mạnh nhất thì các chủng vi sinh vật phân giải xenlulo cũng đòi hỏi phải có một dải pH thích hợp, thí nghiệm được tiến hành trên 6 mức pH môi trường khác nhau. Thông qua đường kính vòng phân giải của vi khuẩn phân giải xenlulo sau 4 -5 ngày nuôi cấy trên môi trường có pH khác nhau để đánh giá khả năng thích nghi của chúng. Kết quả của được thể hiện ở bảng 4.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của độ pH môi trường đến mật độ tế bào các chủng VK phân giải xenlulo

TT	Tên chủng	Đường kính vòng phân giải (mm)					
		pH = 5	pH = 5,5	pH = 6	pH = 6,5	pH = 7	pH = 7,5
1	X1	19,6	29,5	20,4	24,3	15,5	16,5
2	X10	23,5	21,2	27,6	25,1	17,6	18,7

Thông qua bảng 4 có thể thấy biên độ pH môi trường của các chủng vi sinh vật có sự khác nhau, cũng cho khả năng phân giải xenlulo là khác nhau. Chủng X10 thích nghi với pH môi trường có trị số 6 - 6,5, tại biên độ pH này đường kính vòng phân giải đạt cực đại là 25,1- 27,6mm, trong khi nuôi chúng trong điều kiện pH cao hơn hay thấp hơn, đường kính vòng phân giải đạt

được là rất thấp 17,6mm đạt 60% so với vòng phân giải khi nuôi ở pH = 6. Chủng X1 có đường kính vòng phân giải cao nhất khi chúng được nuôi cấy ở điều kiện pH = 5,5 đạt 29,5mm và chỉ đạt đường kính vòng phân giải 15,5mm khi nuôi cấy ở điều kiện pH = 7. Vậy chủng X1 sinh tổng hợp enzyme xenlulo cao nhất khi chúng được nuôi cấy trong điều kiện pH = 5,5.

**3.3. Kết quả nghiên cứu lựa chọn các yếu tố công nghệ khác thích hợp cho quá trình sản xuất phân hữu cơ sinh học**

**3.3.1. Kết quả xác định mức độ kích thước của các nguyên liệu đưa vào thí nghiệm**

Khi lựa chọn chủng X1 và X10 nhân sinh khối tạo chế phẩm phân huỷ xenlulo tạo phân hữu cơ sinh học, nguyên liệu đưa vào thử nghiệm ủ bao gồm vỏ và lá cây keo. Thí nghiệm được thực hiện với 3 loại công thức về hình dạng kích thước khác nhau: Công thức 1 (CT1) để cả vỏ và cành lá dài đưa vào ủ thí nghiệm; Công thức 2 (CT2) băm lá và vỏ với kích thước 2 × 3cm<sup>2</sup>; Công thức 3 (CT3) băm vỏ với kích thước 2 × 3cm<sup>2</sup>. Sau 90 ngày thí nghiệm hàm lượng các chất được sinh ra ở bảng 5.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của kích thước vật liệu ủ đến khả năng tạo phân hữu cơ sinh học.

STT	Công thức	OM <sub>TS</sub> (%)	N <sub>TS</sub> (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> TS (%)	K <sub>2</sub> O TS (%)
1	CT1	10,23	0,82	0,12	0,11
2	CT2	22,56	1,33	0,21	0,19
3	CT3	12,43	0,91	0,11	0,12

Thông qua bảng 5 cho thấy sự khác biệt giữa kích thước vật liệu ủ đến sự lên men của các VSV trong đồng ủ. Khi thí nghiệm được tiến hành sau 3 tháng cứ 2 tuần tiến hành đo nhiệt độ đồng ủ 1 lần cho thấy ở thời gian ủ 90 ngày (3 tháng) nhiệt độ đồng ủ lên cao nhất là 50°C, ở công thức khi vật liệu ủ được băm giập với kích thước nhỏ hơn, hàm lượng hữu cơ tổng số được tạo ra là lớn nhất đạt hơn 22%, trong khi ở kích thước vật liệu lớn hàm lượng hữu cơ chỉ đạt khoảng 10%. Ảnh hưởng của kích thước vật liệu ủ đến sự lên men là quá rõ ràng, có thể kết luận vật liệu đưa vào ủ phân hữu cơ sinh học cần băm giập nát cả vỏ và lá kích thước khoảng 2 × 3cm (CT2).

**3.3.2. Kết quả xác định độ ẩm cơ chất tạo phân hữu cơ sinh học**

Thí nghiệm được tiến hành với các thang độ ẩm khác nhau và đo nhiệt độ lên men theo

định kỳ ở các mức thời gian khác nhau. Sau thí nghiệm 90 ngày tiến hành kiểm tra các chất được sinh ra ở bảng 6.

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của độ ẩm cơ chất đến khả năng tạo phân hữu cơ sinh học

STT	Độ ẩm (%)	OM <sub>TS</sub> (%)	N <sub>TS</sub> (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> TS (%)	K <sub>2</sub> O <sub>TS</sub> (%)
1	45	9,23	0,62	0,14	0,01
2	50	12,13	1,03	0,11	0,16
3	55	17,33	1,05	0,16	0,23
4	60	20,11	1,18	0,21	0,13
5	65	13,20	0,91	0,12	0,05

Qua bảng 4 cho thấy hàm lượng hữu cơ tổng số được sinh ra ở thang độ ẩm từ 55-60%, là lớn nhất đạt từ 17-20%. Trong khi ở các dải độ ẩm khác, khả năng tạo hàm lượng hữu cơ thấp chỉ khoảng từ 10 - 13%. Cũng như vậy hàm lượng NPK tổng số khi độ ẩm trong khoảng từ 55- 60% hàm lượng này đạt cao nhất. Như vậy có thể kết luận khi ủ phân hữu cơ sinh học độ ẩm tối ưu là từ 55- 60%.

**3.3.3. Kết quả xác định ảnh hưởng của độ pH môi trường đồng ủ**

Quá trình lên men của vi sinh vật diễn ra nhanh hay chậm, mạnh hay yếu phụ thuộc rất lớn vào độ pH của môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Để biết khả năng phân hủy của vi sinh vật phân giải xenlulo trong thí nghiệm trên, thử với 5 giải pH môi trường cơ chất khác nhau kết quả được thể hiện tại bảng 7.

**Bảng 7.** Ảnh hưởng của độ pH cơ chất đến khả năng tạo phân hữu cơ sinh học

STT	Độ pH (%)	OM <sub>TS</sub> (%)	N <sub>TS</sub> (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> TS (%)	K <sub>2</sub> O TS (%)
1	4	12,21	0,87	0,16	0,21
2	5	10,14	0,93	0,09	0,09
3	6	19,45	1,35	0,26	0,14
4	7	23,01	0,58	0,11	0,17
5	8	10,30	1,71	0,15	0,08



Kết quả ở bảng 5 cho thấy sự khác biệt khi thí nghiệm ủ phân hữu cơ sinh học với các dải pH khác nhau. Vi khuẩn phân giải xenlulo thích hợp với môi trường trung tính, ở khoảng dải pH = 6-7, tại dải pH này nhiệt độ đồng ủ lớn

nhất lên đến 52°C, hàm lượng hữu cơ tổng số đạt cao nhất khoảng 20 - 23%. Trong khi ở độ pH = 4 hàm lượng hữu cơ được sinh ra chỉ đạt từ 10 - 12%. Như vậy có thể kết luận độ pH hữu cơ cần đạt 6 - 7 khi ủ phân hữu cơ sinh học.



**Hình 2.** Vỏ cây keo trước khi thí nghiệm



**Hình 3.** Lá cây keo trước khi thí nghiệm



**Hình 4.** Vỏ cây keo sau 4 tháng ủ không có vi sinh vật



**Hình 5.** Lá cây keo sau 4 tháng ủ không có vi sinh vật



**Hình 6.** Vỏ cây keo sau 2 tháng ủ với VSV



**Hình 7.** Lá cây keo sau 2 tháng ủ với VSV



**Hình 8.** Vỏ cây keo sau 4 tháng ủ với VSV



**Hình 9.** Lá cây keo sau 4 tháng ủ với VSV

#### IV. KẾT LUẬN

- Phân lập được 24 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải xenlulo.
- Tuyển chọn 2 chủng vi khuẩn **X1** và **X10** có khả năng phân giải xenlulo mạnh. Chủng X1 phát triển tốt nhất, có khả năng phân giải xenlulo cao nhất khi được nuôi cấy trên môi trường PD có 1% CMC với nhiệt độ 30 - 35°C và độ pH = 5,5. Chủng X10 phát triển tốt nhất, có khả năng phân giải xenlulo cao nhất khi

được nuôi cấy trên môi trường PD có 1% CMC với nhiệt độ 35°C và độ pH = 6 - 6,5. Chủng vi khuẩn **X1** và **X10** được nhân sinh khối để sản xuất phân hữu cơ sinh học.

- Vật liệu đưa vào ủ phân hữu cơ sinh học cần sơ chế giập nát với kích thước 2 × 3cm, với độ ẩm đạt từ 50 - 60%, pH = 6 - 7, thời gian tạo phân hữu cơ sinh học khoảng 90 ngày, đạt hàm lượng NPK là cao nhất và hàm lượng hữu cơ đạt tới 23%.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Phước Quê; Cao Ngọc Điệp, 2011. Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. Tạp chí Khoa học: 18a, Trường Đại học Cần Thơ, 177-184.
2. Nguyễn Vũ Thành, 2006. Chất thải trong nông nghiệp. Báo Nông thôn ngày nay số ra ngày 21 tháng 03 năm 2006.
3. Gautam S. P., Bundela P. S., Pandey A. K., Jamaluddin, Awasthi M. K., Sarsaiya S., 2012. Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain. International. Journal of, Microbiol., article ID 325907.
4. Schaad N. W., Jones J. B., and Chun W., 2000. Plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological society.

**Người thẩm định:** TS. Trần Hồ Quang