

DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.158

TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HUỖ PHÉ PHỤ PHẨM SAU THU HOẠCH QUẢ VẢI

Đình Hồng Duyên, Nguyễn Thế Bình và Vũ Thanh Hải

Khoa Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/04/2017

Ngày nhận bài sửa: 30/09/2017

Ngày duyệt đăng: 30/11/2017

Title:

Selection of bacterial strains for degrading litchee postharvest wastes

Từ khóa:

Bacillus, cellulase, chế phẩm sinh học, phân ủ hữu cơ, phụ phẩm sau thu hoạch quả vải

Keywords:

Bacillus, bio-product, cellulase, compost, litchee postharvest wastes

ABSTRACT

Bacterial strains which had ability in degrading cellulose were isolated and selected and then used for producing bioproducts to treat litchee postharvest wastes. From 300 samples of natural litchee compost, 98 bacterial strains were isolated. Of which, bacterial strains V19 and V98 were determined dominant cellulase, amylase, and protease enzymatic activities. Both V19 and V98 indicated the significant resistance to antibiotics upto 1000 mg/l culture media. These two strains showed significant growth and extracellular enzymatic in different pH and temperature of culture media. In case of pot experiment, litchee postharvest wastes were decomposed at level 57 - 59% by being applied V19 or V98 bio-product after 35 days (control was 45%). Based on characteristics of culture, morphological, physiological, biochemical, and 16S rRNA nucleotide sequences, V19 was identified as *Bacillus cereus*, V98 was *Bacillus toyonensis*.

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose để tạo nguồn giống sản xuất chế phẩm sinh học xử lý phế phụ phẩm sau thu hoạch quả vải. Từ 300 mẫu phụ phẩm quả vải hoaï mục tự nhiên tại Lục Ngạn - Bắc Giang đã phân lập được 98 chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn được tuyển chọn thông qua đánh giá hoạt tính cellulase, amylase, protease và thông qua đánh giá sinh trưởng, hoạt tính enzyme ngoại bào khi nuôi ở các điều kiện pH, nhiệt độ, kháng sinh khác nhau. Kết quả đã tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn, chủng V19 được định danh là *Bacillus cereus* thuộc nhóm an toàn sinh học cấp 2, chủng V98 là *Bacillus toyonensis* thuộc nhóm an toàn sinh học cấp 1. Bước đầu thử nghiệm chế phẩm sản xuất từ V19 và V98 xử lý phụ phẩm quả vải sau thu cho thấy độ hoaï mục đạt 57 - 59% sau 35 ngày ủ ở quy mô chậu vải. Độ hoaï mục và hàm lượng dinh dưỡng ở công thức có chế phẩm vi khuẩn đều cao hơn công thức đối chứng và cao hơn trước khi ủ.

Trích dẫn: Đình Hồng Duyên, Nguyễn Thế Bình và Vũ Thanh Hải, 2017. Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân huỷ phế phụ phẩm sau thu hoạch quả vải. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 53b: 61-70.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây vải (*Litchi chinensis* Sonn.) là đặc sản của Việt Nam có sản lượng lớn và được nhiều người

tiêu dùng ưu tiên lựa chọn. Quả vải ngoài ăn tươi còn được chế biến thành các sản phẩm rất phong phú như vải sấy khô, rượu vang, đồ hộp, nước giải khát, bánh kẹo... Diện tích trồng vải của Việt Nam

hiện nay khoảng 76.000 ha, tổng sản lượng đạt 362.200 tấn, trong đó Bắc Giang là tỉnh có diện tích trồng vải thiều lớn nhất cả nước, chiếm tới 32.000 ha (Tổng cục Thống kê, 2016).

Thời gian thu hoạch quả vải ngắn (tháng 6 - 7) với sản lượng lớn nên phế phụ phẩm sau thu hoạch quả vải hiện nay được xử lý đơn giản bằng cách đổ ra vườn, lè đường, bờ ruộng và đốt. Lượng phụ phẩm có thể chiếm khoảng 1/4 - 1/3 so với khối lượng quả đem bán; gồm cành quả, cuống quả, lá, quả bị loại và các quả bị hỏng trong quá trình vận chuyển, tiêu thụ... Thành phần chính của loại phụ phẩm này là cellulose và lignin nên cần từ 9-12 tháng mới hoại mục trong môi trường tự nhiên, khi đốt gây ô nhiễm môi trường và làm mất đi lượng lớn dinh dưỡng có trong nguồn phụ phẩm (Đình Hồng Duyên và *ctv.*, 2015).

Mặc dù cellulose và lignin là chất hữu cơ không tan trong nước, bền vững nhưng lại bị thủy phân dễ dàng bởi enzyme cellulase do vi sinh vật (VSV) tiết ra (Coughlan *et al.*, 1979; Kanda, 2003; Nguyễn Xuân Thành và *ctv.*, 2003). Hệ VSV phân huỷ cellulose rất phong phú và đa dạng bao gồm cả vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm. Các vi khuẩn có khả năng phân huỷ mạnh cellulose đã được chỉ ra là *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Archomobacter*,... (Nguyễn Xuân Thành, 2003). Theo Walke (1975), vi khuẩn có vai trò đáng chú ý nhất trong quá trình phân huỷ và giữ vị trí đầu tiên trong giai đoạn phân huỷ chất hữu cơ của đồng ủ, vi khuẩn phân huỷ các chất dinh dưỡng có thể phân huỷ được nhanh hơn so với các chủng VSV khác. Vi khuẩn còn là sinh vật sống nhiều nhất trong đồng ủ chất hữu cơ. Vi khuẩn là hệ thống năng động, chiếm ưu thế ở tầng đáy và bề mặt đồng ủ, hoạt động mạnh mẽ vào giai đoạn trước và sau khi ủ. Trong quá trình ủ chất hữu cơ, khi nhiệt độ trong đồng ủ ở mức dưới 40°C thì số lượng vi khuẩn ưa âm chiếm nhiều nhất 10^8 (CFU/g), nhiều hơn 10^2 đến 10^4 lần so với số lượng xạ khuẩn và nấm; khi nhiệt độ đồng ủ 40-70°C thì số lượng vi khuẩn ưa nóng là 10^9 (CFU/g), lớn hơn 10^7 đến 10^2 lần so với xạ khuẩn và nấm ưa nhiệt (Haug, 1980).

Phân lập, tuyển chọn VSV có khả năng phân giải cellulose, tạo chế phẩm xử lý rơm rạ (Nguyễn Xuân Thành, 2004) và phế thải nông sản (Lê Văn Nhung và Nguyễn Lan Hương, 2001), nhưng chưa có kết quả nghiên cứu cụ thể cho phụ phẩm sau thu hoạch quả vải. Vì vi khuẩn có vai trò quan trọng trong đồng ủ chất hữu cơ nên trong nghiên cứu này, việc phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân huỷ cellulose từ phụ phẩm sau thu hoạch quả vải đã hoại mục tự nhiên không chỉ xác định được sự có mặt của vi khuẩn phân giải cellulose trong nguồn chất thải này mà còn tạo

nguồn giống để sản xuất chế phẩm sinh học cho xử lý phụ phẩm sau thu hoạch quả vải cũng như định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Ba trăm mẫu dùng để phân lập đã được thu thập gồm: 150 mẫu phụ phẩm sau thu hoạch quả vải hoại mục tự nhiên và 150 mẫu đất trồng, mẫu mùn đất tại Lục Ngạn, Bắc Giang.

2.2 Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân huỷ phế phụ phẩm quả vải

Phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose theo phương pháp loại trực tiếp trên môi trường thạch đĩa (Môi trường CMC, môi trường Hans) (Phương pháp Koch).

Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường dịch thể ở các môi trường nuôi cấy khác nhau (Vi khuẩn tổng số, Ixenhetski và Contrep, Thạch thường - Glucose, Lauria Betani); hoặc ở điều kiện nhiệt độ khác nhau (20, 30, 40, 50, 60°C); hoặc ở pH khác nhau (pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8); hoặc ở nồng độ kháng sinh streptomycin khác nhau (300, 500, 600, 800, 1000 mg/l môi trường nuôi cấy). Sau 5 ngày nuôi, xác định sinh khối và hoạt tính enzyme ngoại bào. Hoạt tính enzyme cellulase, amylase, protease được đánh giá theo phương pháp khuếch tán phóng xạ trên môi trường thạch đĩa (William, 1983). Lọc dịch nuôi qua giấy lọc để thu sinh khối, sấy khô giấy lọc và cân. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh và Nguyễn Thanh Nhân (2016) sử dụng kháng sinh Streptomycin là thuốc bột tiêm lọ 1 g, sản xuất bởi Công ty cổ phần dược phẩm TW1 – Việt Nam để pha tạo nồng độ 1000 mg kháng sinh/lít môi trường nuôi cấy.

Tính an toàn với thực vật của vi khuẩn được xác định bằng cách cấy chấm lên vết thương của cần hành tây đã khử trùng (Nguyễn Thị Minh, 2016). Vi khuẩn được nuôi cấy trực tiếp trên môi trường chuyên tính bán rắn; theo dõi thời gian mọc của vi khuẩn tại các mốc thời gian khác nhau: 16, 24, 48, 60, 72 và sau 72h; sau 5 ngày quan sát hình thái, đo kích thước khuẩn lạc, nhuộm gram và quan sát hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi thường và kính hiển vi điện tử quét.

Vi khuẩn được định danh theo các bước: tách chiết ADN hệ gen theo Marmur (1961) và Saito (1963); phản ứng PCR nhân trình tự gen 16S rRNA đặc thù với mỗi đặc thù cho vi khuẩn; giải trình tự sản phẩm PCR; xây dựng cây phả hệ bằng phương pháp Maximum Parsimony, tính toán bằng thuật toán Bootstrap với 1000 lần lặp trên phần mềm MEGAS 6.0.6.

Mật độ vi khuẩn được xác định khi nuôi trong nồi lên men chìm ở điều kiện khác nhau của thời gian lên men, lưu lượng cấp khí, tốc độ cánh khuấy để tìm ra thông số tối ưu cho nhân sinh khối vi khuẩn. Việc sản xuất và đánh giá chất lượng chế phẩm vi sinh như hướng dẫn trong TCVN6168:2002.

2.3 Thí nghiệm đánh giá khả năng phân huỷ phế phụ phẩm sau thu hoạch quả vải

Thí nghiệm chậu vại đánh giá khả năng chuyển hóa phụ phẩm sau thu hoạch quả vải gồm 3 công thức (CT), 2 kg phụ phẩm quả vải/chậu vại, bổ sung 10% chế phẩm, độ ẩm duy trì 50-60%. CT1 (Đối chứng - không sử dụng chế phẩm); CT2 (chế phẩm vi khuẩn V19); CT3 (Chế phẩm vi khuẩn V98). Các chỉ tiêu theo dõi trước và sau 35 ngày ủ gồm: pH đo trực tiếp bằng máy pH meter; OC (%) theo phương pháp Walkley-Black; độ hoai theo TCVN 7185:2002; K₂O (%) phân tích theo phương pháp quang kế ngọn lửa, công phá bằng hỗn hợp H₂SO₄ + HClO₄; P₂O₅ (%) theo phương pháp so màu, công phá bằng hỗn hợp H₂SO₄ + HClO₄, N (%) theo phương pháp Kjeldhal, công phá bằng H₂SO₄.

2.4 Phân tích kết quả và xử lý thống kê

Số liệu thu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Phân tích thống kê ANOVA, LSD_{0,05} bằng phần mềm CropStat 7.2.

3 KẾT VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn phân giải cellulose

3.1.1 Kết quả phân lập vi khuẩn phân giải cellulose

Từ 300 mẫu phụ phẩm sau thu hoạch quả vải hoai mục tự nhiên, mẫu đất trồng, mẫu mùn đất tại Lục Ngạn - Bắc Giang đã phân lập và thuần khiết được 98 chủng vi khuẩn với ký hiệu từ V1 đến V98 có khả năng phân giải cellulose. Năm 2015, cũng từ 300 mẫu vật trên, Đinh Hồng Duyên công bố đã phân lập được 20 chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose. Theo Walke (1975), vi khuẩn trong 1 gram phân ủ chiếm khoảng 80-90% tổng số VSV và có vai trò quan trọng trong quá trình ủ. Qua đó khẳng định vi khuẩn rõ ràng chiếm số lượng lớn trong các đồng ủ phụ phẩm sau thu hoạch quả vải, nên việc phân lập vi khuẩn có khả năng phân huỷ cellulose để làm giống sản xuất chế phẩm xử lý phụ phẩm là hướng đi khả thi.

Bảng 1: Thời gian mọc và hoạt tính enzyme ngoại bào của 18 chủng vi khuẩn phân lập từ phụ phẩm quả vải sau thu hoạch và đất trồng tại Lục Ngạn, Bắc Giang

Tên chủng vi khuẩn	Thời gian mọc (h)	Kích thước khuẩn lạc sau 5 ngày (cm)	Hoạt tính enzyme (D-d, mm)		
			Cellulase	Amylase	Protease
V3	36,0	0,40	21,5	17,0	16,0
V4	24,0	0,55	20,0	18,0	20,0
V11	24,0	0,50	22,0	14,0	16,0
V19	24,0	0,55	27,0	17,0	18,0
V25	36,0	0,57	21,0	0,0	15,0
V27	24,0	0,34	22,0	14,0	12,0
V31	24,0	0,45	19,0	0,0	17,0
V34	24,0	0,42	21,0	16,0	15,0
V37	36,0	0,51	22,0	14,0	18,0
V41	48,0	0,39	22,0	16,0	14,0
V42	24,0	0,47	22,0	0,0	16,0
V54	24,0	0,33	22,0	12,0	17,0
V57	24,0	0,55	25,0	17,0	19,0
V60	24,0	0,53	21,0	0,0	0,0
V65	36,0	0,39	22,0	10,0	15,0
V67	36,0	0,46	21,5	18,0	13,0
V96	24,0	0,51	23,0	18,0	18,0
V98	24,0	0,50	27,0	17,0	18,0

Khi kiểm tra hoạt tính cellulase của 98 chủng vi khuẩn theo phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch đĩa, 18 chủng có vòng phân giải lớn hơn 20 mm được giữ lại, đồng thời tiến hành đánh

giá thêm hoạt tính protease và amylase ngoại bào của 18 chủng vi khuẩn này vì trong các chất hữu cơ, ngoài cellulose, còn có protein và tinh bột.

Kết quả Bảng 1 cho thấy 4 chủng vi khuẩn (V19, V57, V96, V98) có hoạt tính cellulase, protease và amylase cao. Hoạt tính enzyme cellulase của 4 chủng vi khuẩn phân lập từ phụ phẩm sau thu hoạch quả vải tương đồng với kết quả nghiên cứu về kích thước vòng phân hủy cellulose của vi khuẩn phân lập từ phụ phẩm nông nghiệp là 29,3 mm (Đình Hồng Duyên và Nguyễn Xuân Thành, 2010) và từ chất thải rắn của nhà máy Fococev là 24,5 mm (Nguyễn Ngọc Trúc Ngân và

Phạm Thị Ngọc Lan, 2014). Bốn chủng vi khuẩn trên có thời gian mọc nhanh (khuẩn lạc xuất hiện sau 24 giờ nuôi cấy), và kích thước khuẩn lạc sau 5 ngày nuôi cấy lớn (đạt 0,50 - 0,55 cm). Đặc tính trên thể hiện khả năng nhân nhanh số lượng và khả năng hoạt động mạnh của enzyme ngoại bào trong phân hủy chất xơ sợi. Bốn chủng trên được chọn để tiếp tục đánh giá hoạt tính sinh học khác.

3.1.2 Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp

Bảng 2: Ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy đến 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Môi trường	Chủng vi khuẩn	Sinh khối (g/l)	Hoạt tính enzyme (D-d, mm)		
			Cellulase	Amylase	Protease
Môi trường vi khuẩn tổng số		6,02	31,5	20,5	25,0
Môi trường Ixenhetski và Contrep	V19	2,25	27,5	19,5	30,0
Môi trường thạch thường – glucose		4,32	31,5	17,0	23,0
Môi trường Lauria Betani (LB)		3,43	31,0	21,5	27,0
Môi trường vi khuẩn tổng số		5,32	30,3	17,3	22,0
Môi trường Ixenhetski và Contrep	V57	1,31	22,0	16,5	19,0
Môi trường thạch thường – glucose		4,85	26,0	17,5	25,0
Môi trường Lauria Betani (LB)		3,32	23,0	12,5	18,5
Môi trường vi khuẩn tổng số		3,62	21,5	19,5	24,0
Môi trường Ixenhetski và Contrep	V96	1,24	17,0	12,0	20,0
Môi trường thạch thường – glucose		4,44	25,3	21,0	23,5
Môi trường Lauria Betani (LB)		6,40	30,0	16,0	25,0
Môi trường vi khuẩn tổng số		4,13	31,3	20,3	26,7
Môi trường Ixenhetski và Contrep	V98	1,80	16,0	13,0	22,5
Môi trường thạch thường – glucose		3,47	31,0	19,0	25,5
Môi trường Lauria Betani (LB)		4,29	27,0	17,5	21,0

Đối với từng chủng vi khuẩn cần tìm ra môi trường nuôi cấy tối ưu và đánh giá được các hoạt tính sinh học. Bảng 2 cho thấy chủng V19, V57 sinh trưởng và có hoạt tính enzyme mạnh trên môi trường VKTS; chủng V98 có hoạt tính enzyme vượt trội trên môi trường VKTS, sinh khối lớn nhất trên môi trường LB rồi đến môi trường VKTS. Từ kết quả nghiên cứu, môi trường VKTS được lựa chọn để nuôi cấy 3 chủng và đánh giá ở các bước tiếp theo. Riêng với chủng V96, môi trường nuôi cấy thích hợp hơn theo tuần tự là LB, thạch thường-glucose và VKTS. Tuy nhiên, khi so sánh chi phí sản xuất cho thấy chi phí để chuẩn bị môi trường thạch thường-glucose và VKTS thường thấp hơn chi phí để chuẩn bị môi trường LB. Điều này ảnh hưởng trực tiếp đến việc tiết kiệm chi phí sản xuất chế phẩm trên quy mô công nghiệp nên môi trường thạch thường-glucose được lựa chọn để nuôi cấy chủng V98.

3.1.3 Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến vi khuẩn tuyển chọn

Trong quá trình xử lý chất thải hữu cơ theo công nghệ ủ đồng, yếu tố sinh học có tính quyết định đến tốc độ phân hủy của đồng ủ. Bên cạnh đó, hai yếu tố phi sinh học pH và nhiệt độ cũng ảnh hưởng đến tốc độ phân hủy chất hữu cơ, do tác động trực tiếp đến VSV thực hiện quá trình phân hủy. Chính vì vậy, khi lựa chọn VSV làm giống, cần phải lựa chọn các chủng VSV có khả năng thích ứng cao với sự thay đổi của pH và nhiệt độ.

Bảng 3 cho thấy 4 chủng vi khuẩn đều có sinh khối và hoạt tính enzyme ngoại bào cao nhất tại pH 7, kết quả này đồng nhất với công bố vi khuẩn thường sinh trưởng thuận lợi ở pH dao động từ 6 đến 7,5 (Boyd, 1984).

Bảng 3: Ảnh hưởng của pH đến 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Mức pH	Chủng vi khuẩn	Sinh khối (g/l)	Hoạt tính enzyme (D-d, mm)		
			Cellulase	Amylase	Protease
4	V19	1,60	18,5	16,2	17,3
	V57	1,09	17,5	17,0	18,0
	V96	1,16	18,0	15,0	21,0
	V98	1,23	21,2	14,3	17,8
5	V19	2,34	24,3	17,5	19,6
	V57	2,25	19,0	14,0	20,0
	V96	2,06	21,4	14,5	20,5
	V98	2,31	23,7	16,0	22,5
6	V19	2,94	28,0	19,2	24,0
	V57	2,51	25,5	20,5	21,0
	V96	2,67	23,5	17,0	23,0
	V98	3,05	26,9	22,8	25,0
7	V19	3,02	31,5	20,5	25,0
	V57	3,32	30,3	20,3	22,0
	V96	3,62	28,5	19,5	24,0
	V98	3,13	31,3	20,3	26,7
8	V19	3,15	29,0	22,0	27,4
	V57	2,48	26,4	21,5	17,0
	V96	2,53	26,5	22,4	20,0
	V98	3,78	28,7	20,0	30,0

Rynk *et al.* (1992) khẳng định trong quá trình ủ phân hữu cơ, pH của đồng ủ thường dao động từ 5,5 đến 9. Trong suốt giai đoạn đầu của quá trình ủ phân hữu cơ, vi khuẩn phân huỷ các chất hữu cơ tạo ra các gốc axit hữu cơ, nên pH trong môi trường trở thành axit, có thể xuống đến mức 5. Tại thời điểm này, nấm phân huỷ axit hoạt động và sớm làm cho pH môi trường tăng lên mức trung

tính hoặc thậm chí sang môi trường kiềm. Khi đó, vi khuẩn đóng vai trò trung tâm một lần nữa khi pH tăng. Kết quả đánh giá ở Bảng 3 cho thấy 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều sinh trưởng và có hoạt tính 3 enzyme ngoại bào ở tất cả các mức pH từ 4 đến 9. Như vậy, 4 chủng này chịu được sự thay đổi pH trong đồng ủ và vẫn sống, phát huy tốt vai trò khi pH môi trường thấp và trung tính.

Bảng 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Các chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn	Nhiệt độ nuôi cấy (°C)				
		20	30	40	50	60
Sinh khối (g/l)	V19	2,97	3,27	3,05	2,65	1,59
	V57	3,01	3,22	2,96	2,32	1,65
	V96	2,89	3,25	2,98	2,19	1,71
	V98	3,39	3,58	2,75	2,11	1,05
Hoạt tính Cellulase (D-d, mm)	V19	28,5	32,3	27,7	25,0	20,0
	V57	22,5	29,5	27,5	25,0	19,5
	V96	24,3	30,2	26,5	24,0	19,8
	V98	31,0	31,0	28,7	24,6	19,7
Hoạt tính Amylase (D-d, mm)	V19	17,2	25,0	19,8	13,4	9,8
	V57	18,4	22,4	20,3	15,2	18,0
	V96	16,7	21,5	19,7	15,7	18,5
	V98	19,5	20,0	16,7	14,3	11,4
Hoạt tính Protease (D-d, mm)	V19	24,0	24,0	18,4	13,5	10,2
	V57	25,1	24,5	19,7	15,6	19,5
	V96	27,3	19,3	21,4	0,0	0,0
	V98	26,7	24,3	22,0	17,6	13,8

Thông thường, khi ủ các nguyên liệu hữu cơ theo kiểu ủ đồng, có giai đoạn nhiệt độ lên đến 60-65°C (Eliot, 1997). Thời gian để nhiệt độ đồng ủ

đạt ngưỡng cao nhất và thời gian kéo dài phụ thuộc vào loại vật liệu ủ, kích thước đồng ủ, và điều kiện môi trường. Nguyên nhân của sự tăng nhiệt trong đồng ủ là do hoạt động của các VSV phân huỷ và

sự tăng nhiệt độ trong quá trình ủ phân hữu cơ là cần thiết và nó thể hiện rằng quá trình ủ đang hoạt động mạnh. Do đó, các chủng VSV được chọn làm giống cần phải là những chủng ưa nhiệt hoặc không chết khi nhiệt độ lên cao.

Bảng 4 cho thấy ở nhiệt độ 50°C và 60°C mật độ và hoạt tính của các chủng vi khuẩn nghiên cứu đều giảm đi, trong đó chủng V96 mất khả năng thể

hiện hoạt tính amylaza và proteaza. Chủng vi khuẩn V19, V98 đều có khả năng sinh trưởng và có hoạt tính enzym mạnh trong phạm vi nhiệt độ từ 20 - 60°C, như vậy chủng vi khuẩn V19 và V98 là những chủng ưa nhiệt, có thể sử dụng tốt cho việc ủ chất thải hữu cơ.

3.1.4 Khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Bảng 5: Khả năng kháng kháng sinh Streptomycin của 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn

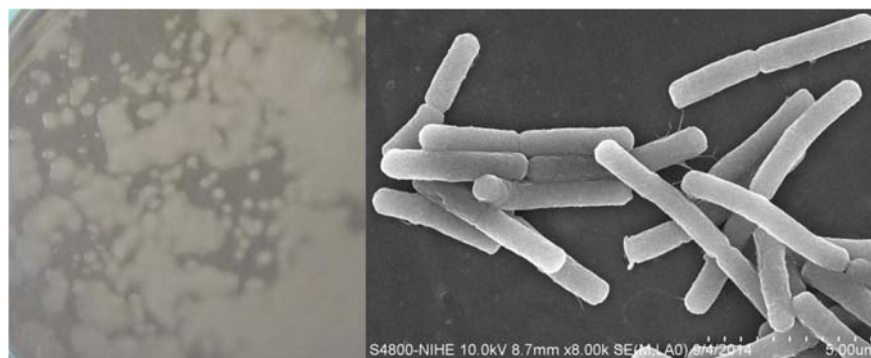
Chủng vi khuẩn	Chỉ tiêu	Mức kháng sinh (mg/l)				Chỉ tiêu	Mức kháng sinh (mg/l)			
		300	500	800	1000		300	500	800	1000
V19	Sinh khối (g/l)	1,97	1,67	1,34	1,23	Hoạt tính Amylase (D-d, mm)	15	13,3	12,0	6,7
V57		1,88	1,51	1,27	0,83		10,8	6,5	3,3	0,0
V96		2,05	1,78	1,42	1,25		13,4	8,7	4,5	0,0
V98		1,78	1,46	1,24	1,18		16,5	14,3	9,6	5,0
V19	Hoạt tính cellulase (D-d, mm)	23,6	21,0	16,2	11,3	Hoạt tính Protease (D-d, mm)	19,8	16,2	11,7	9,3
V57		12,3	10,0	5,7	0,0		11,7	9,8	5,2	0,0
V96		15,4	13,0	8,4	3,7		13,5	10,2	8,0	4,8
V98		24,0	20,8	14,0	11,5		20,3	16,4	10,0	8,5

Môi trường tự nhiên là môi trường có nhiều biến động, vì vậy các chủng VSV được lựa chọn làm chế phẩm sử dụng trong điều kiện thực tế cần phải có khả năng đề kháng với sự bất lợi của môi trường. Một trong những bất lợi đó là có nhiều VSV có khả năng tiết ra chất kháng sinh, là chất mà có thể giết hoặc ức chế sự sinh trưởng của VSV, đặc biệt là nhóm vi khuẩn. Theo Nguyễn Xuân Thành (2003), các chủng VSV có khả năng kháng kháng sinh cao có chống chịu tốt hơn với điều kiện ngoại cảnh. Bảng 5 cho thấy 2 chủng V19, V98 có khả năng kháng kháng sinh tới nồng độ 1000 mg kháng sinh/lít môi trường; chủng V57 và V96 có khả năng kháng kháng sinh thấp hơn. Vì vậy, chủng V19 và V98 được chọn để nghiên cứu các bước tiếp theo là định danh và sản xuất chế phẩm vi sinh.

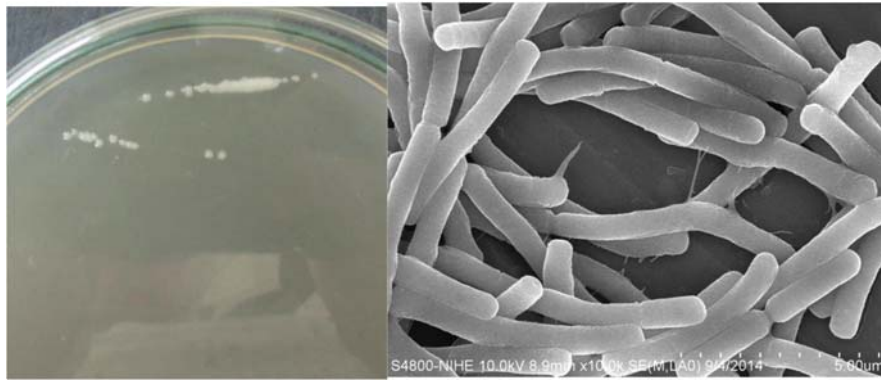
3.2 Định danh chủng vi khuẩn V19 và V98

3.2.1 Định danh dựa vào đặc điểm hình thái

Vi khuẩn V19 và V98 đều có khuẩn lạc tròn lồi, bóng nhầy, màu trắng đục, sinh trưởng rất nhanh trên môi trường nuôi cấy. Vi khuẩn nhuộm màu Gram dương, hình que, có khả năng di chuyển; sinh trưởng trong môi trường glucose, không sinh trưởng trong môi trường arabinose, mannitol, xylose; có khả năng chịu muối tới nồng độ NaCl 7%. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét thấy tế bào vi khuẩn V19 và V98 có dạng hình que kích thước đo được 2,81 µm × 0,8 µm, có roi (flagellum). Các tế bào hình que thường tập trung thành cụm từ 2 đến 4 tế bào cùng nhau. V19 và V98 có khả năng hình thành bào tử, khi hình thành bào tử kích thước tế bào hình que rút ngắn, tạo cấu trúc bào tử đặc trưng. Roi gần như tiêu biến, tế bào hình que co ngắn. Màng trong dạng như mái chèo bản chất là màng sinh chất chưa tiêu biến hết. Kích thước bào tử khoảng 1 µm x 0,8 µm. Sơ bộ nhận định V19 và V98 thuộc giống *Bacillus*.



Hình 1: Khuẩn lạc và hình thái vi khuẩn V19 nhìn dưới kính hiển vi điện tử quét



Hình 2: Khuẩn lạc và hình thái vi khuẩn V98 nhìn dưới kính hiển vi điện tử quét

3.2.2 Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

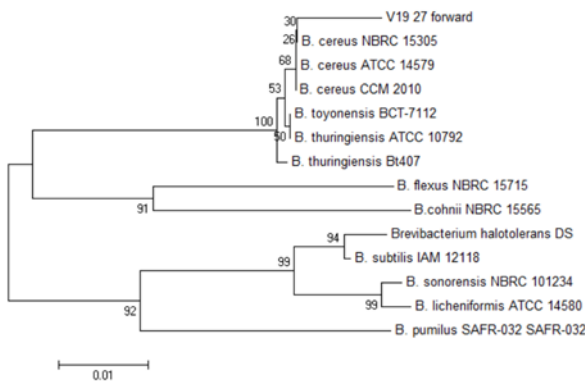
Phần định tên sơ bộ cho thấy V19 và V98 đều thuộc giống *Bacillus*. Tuy nhiên, nhằm biết rõ hơn về các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được, so sánh với các công bố khác và để ứng dụng cụ thể thì cần định danh các chủng vi khuẩn này bằng phương pháp sinh học phân tử.

Căn cứ kết quả giải trình tự gen đề tài đã xây dựng cây phả hệ của chủng V19 và V98. Kết quả cho thấy: Theo cây phân loại V19 nằm cùng nhánh gần nhất với *B.cereus* NBRC 15305 với giá trị bootstrap 30, so với giá trị ý nghĩa là thấp hơn nhưng kết quả căn trình tự cho thấy không có sự sai khác lớn giữa V19 và *B.cereus* NBRC 15305. Do vậy, chúng có quan hệ ở mức độ loài. Kết hợp với các kết quả nghiên cứu hình thái, sinh lý, sinh hóa và trình tự nucleotit 16S rRNA cho thấy chủng V19 là vi khuẩn thuộc loài *Bacillus cereus*. Theo cây phân loại V98 cùng nhánh với loài *B. toyonensis* BCT-7112 giá trị bootstrap 91, giá trị có ý nghĩa cao. Kết quả này chứng tỏ V98 luôn luôn đi cùng *B. toyonensis* BCT-7112. Do vậy, chúng có quan hệ ở mức độ loài. Kết hợp với các kết quả

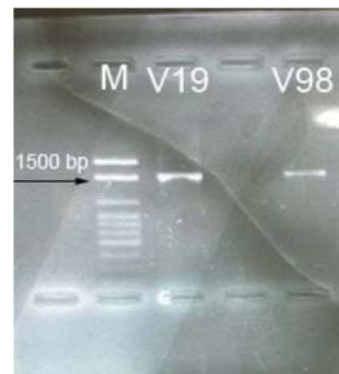
nghiên cứu hình thái, sinh lý, sinh hóa và trình tự nucleotit 16S rRNA, xác định chủng V98 là vi khuẩn thuộc loài *Bacillus toyonensis*.

Khi kiểm tra theo phương pháp cấy chấm chủng V19 và V98 trên mô cấy hành tây cho thấy không chủng nào gây tổn thương cho mô thử nghiệm nên chúng an toàn với cây trồng. Tiến hành tra trên cơ sở dữ liệu của Trung tâm Nghiên cứu và Thu thập tài nguyên sinh học (The Bioresource Collection and Research Center (BCRC)), , chủng V19 thuộc nhóm an toàn cấp 2, chủng V98 thuộc nhóm an toàn cấp 1.

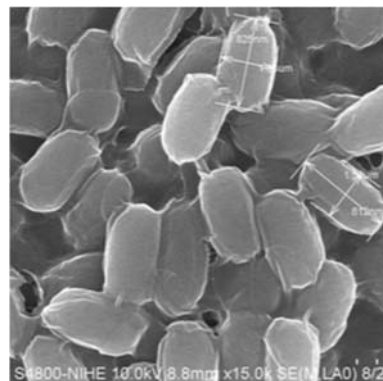
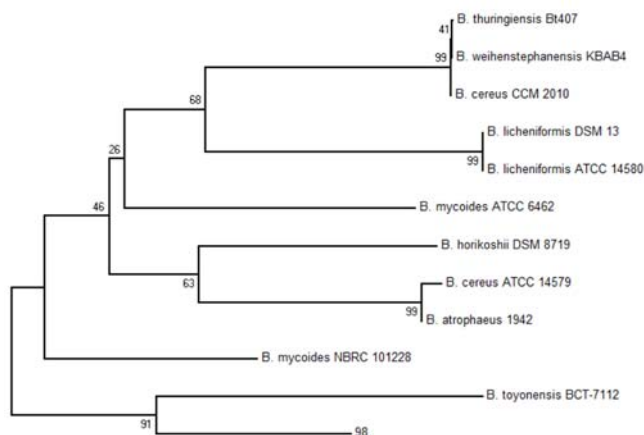
Theo Nghị định 103/2016/NĐ-CP, VSV nhóm 2 là nhóm có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể ở mức độ trung bình nhưng nguy cơ cho cộng đồng ở mức độ thấp bao gồm các loại VSV có khả năng gây bệnh nhưng ít gây bệnh nặng cho người, có khả năng lây truyền sang người và có biện pháp phòng, chống lây nhiễm, điều trị hiệu quả trong trường hợp mắc bệnh. Kết quả này cũng cho thấy V19 khi sử dụng mặc dù an toàn với cây trồng nhưng có khả năng gây bệnh cho người, cần cần nhắc khi sử dụng.



Hình 3: Cây phân loại dựa trên trình tự 16SrRNA-V19 được xây dựng bằng phần mềm MEGAS



Hình 4: Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc thù cho vi khuẩn



Hình 5: Cây phân loại dựa trên trình tự 16S rRNA-V98 được xây dựng bằng phần mềm MEGAS

Hình 6: Bào tử vi khuẩn V98 nhìn dưới kính hiển vi điện tử quét



Hình 7: Vết thương trên cành hành của chủng V19 và V98

Với chủng *Bacillus toyonensis*, Tallur *et al.* (2016) đã công bố phát hiện chủng này có hoạt tính lipase, cellulase và chitinase mạnh; Sonawale (2014) đã công bố nghiên cứu tách enzyme amylase từ vi khuẩn *Bacillus toyonensis* để ứng dụng trong công nghiệp; Ủy ban An toàn Thực phẩm Châu Âu năm 2014 công bố hiệu quả của sản phẩm Toyocerin sản xuất từ *Bacillus toyonensis* như là phụ gia thức ăn cho gà, lợn, gia cầm. Như vậy, cùng với các công bố trên thế giới cho thấy tiềm năng có thể ứng dụng V98 không chỉ làm giống tạo chế phẩm xử lý phụ phẩm sau thu hoạch quả vải mà còn có thể định hướng ứng dụng khác.

3.3 Thử nghiệm khả năng phân giải phụ phẩm sau thu hoạch quả vải từ chế phẩm của chủng V19 và V98

Hai chủng vi khuẩn V19 và V98 được kiểm tra an toàn với cây trồng nên đã được sử dụng để sản xuất chế phẩm VSV theo phương pháp của Nguyễn Xuân Thành và *ctv.* (2004).

Bảng 6 thể hiện thông số tối ưu nhân sinh khối V19 và V98, thông số cơ bản đối với các chủng vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, kết quả này tương đồng với Trịnh Thành Trung và *ctv* (2013).

Bảng 6: Thông số tối ưu để nhân sinh khối hai chủng vi khuẩn

Thông số kỹ thuật	Vi khuẩn V19	Vi khuẩn V98
Môi trường nuôi cấy tối ưu *	Vi khuẩn tổng số	Vi khuẩn tổng số
pH *	7,0	7,0
Nhiệt độ (°C)*	30,0	30,0
Tỷ lệ tiếp giống (%)	5,0	5,0
Lưu lượng cấp không khí (lít không khí/lít môi trường/phút)	0,65	0,70
Tốc độ cánh khuấy (vòng/phút)	300	250
Thời gian (giờ)	36,0	36,0

Ghi chú: * Lấy kết quả từ mục 3.1

Bảng 7: Chất lượng của chế phẩm từ V19 và V98 sau sản xuất

Chỉ tiêu	Chế phẩm từ V19	Chế phẩm từ V98	TCVN 6168:2002
Độ ẩm (%)	-	-	20 – 35
pH	6,71	7,12	6 – 8
VSV hữu ích (CFU/g)	3,18x10 ⁹	1,7x10 ⁹	≥1,0 x 10 ⁸
VSV tạp (CFU/g)	1,61x10 ²	3,3x10 ⁴	≤1,0 x 10 ⁵

Chú thích: - không xác định

Bảng 8: Khả năng chuyển hóa phụ phẩm sau thu hoạch quả vải của chế phẩm VSV

Công thức	Chỉ tiêu					
	pH	Độ hoai (%)	OC%	N%	P ₂ O ₅ %	K ₂ O%
Trước thí nghiệm	6,39	0,0	32,48	0,26	0,12	1,06
Đối chứng (không dùng chế phẩm)	6,52	45,0	27,46	0,31	0,16	1,21
Chế phẩm từ V19	6,98	59,0	29,43	0,35	0,22	1,24
Chế phẩm từ V98	7,01	57,0	27,32	0,29	0,27	1,30
LSD _{0,05}	0,24	2,77				

Bảng 7 là kết quả kiểm tra chất lượng chế phẩm so sánh với TCVN6168:2002 đã đạt yêu cầu, trong đó mật độ VSV hữu ích đạt 3,18.10⁹ và 1,7.10⁹ CFU/ml.

Thử nghiệm khả năng xử lý phế phụ phẩm sau thu hoạch quả vải quy mô chậu vải của chế phẩm VSV từ chủng V19 hoặc V98 cho thấy sau 35 ngày ủ, hai công thức sử dụng chế phẩm VSV có chỉ tiêu về độ hoai, hàm lượng dinh dưỡng cao hơn công thức đối chứng - không sử dụng chế phẩm và cao hơn trước khi ủ.

Chế phẩm V19 và V98 cho hiệu quả xử lý tương đương nhau, mức độ hoai mục của vật liệu ủ của 2 chế phẩm vi khuẩn này cao hơn so với dùng chế phẩm từ xạ khuẩn cũng được phân lập từ phụ phẩm quả vải (*X10 - Streptomyces virginiae*) (Đinh Hồng Duyên và ctv., 2015). Trên cơ sở kết quả nghiên cứu này, vi khuẩn V19 và V98 có thể dùng để làm giống sản xuất chế phẩm VSV xử lý phụ phẩm sau thu hoạch quả vải.

4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu phân lập được 98 chủng vi khuẩn phân giải cellulose từ 300 mẫu phụ phẩm sau thu hoạch quả vải hoai mục tự nhiên, mẫu đất trồng và mẫu mùn đất. Trong đó, xác định được hai chủng vi khuẩn V19 và V98 có hoạt tính cellulase, amylase, protease cao; có khả năng sinh trưởng và thể hiện các hoạt tính enzyme ngoại bào tốt trên môi trường nuôi cấy, ở các điều kiện pH, nhiệt độ khác nhau. Kết quả định tên V19 thuộc loài *Bacillus cereus*, là nhóm an toàn bậc 2; V98 thuộc loài *Bacillus toyonensis*, là nhóm an toàn bậc 1.

Thông số tối ưu nhân sinh khối cho chủng V19 là môi trường vi khuẩn tổng số, pH 7, nhiệt độ 30 °C, tỷ lệ tiếp giống 5%, lưu lượng cấp khí 0,65 lít không khí/lít môi trường/phút, tốc độ cánh khuấy

300 vòng/phút, thời gian nuôi 36 giờ. Thông số tối ưu cho nhân sinh khối cho chủng V98 chỉ khác chủng V19 ở lưu lượng cấp khí là 0,7 lít không khí/lít môi trường/phút và tốc độ cánh khuấy là 250 vòng/phút.

Chế phẩm từ V19 và V98 sau sản xuất đạt TCVN 6168:2002, chế phẩm khi xử lý phụ phẩm quả vải sau thu hoạch cho kết quả tương đương nhau, độ hoai mục đạt 57 - 59% và hàm lượng dinh dưỡng đều cao hơn công thức đối chứng và cao hơn trước khi ủ 35 ngày ở quy mô chậu vải.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Boyd, R.F., 1984. *General microbiology*. Mosby: 197.
 Chính phủ, Nghị định 103/2016/NĐ-CP ngày 1/7/2016, Quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm.
 Coughlan, M.P., Folan, M.A., 1979. Cellulose and Cellulase: Food for thought, food for future? *International Journal of Biochemistry*, 10(2): 103-168.
 Đinh Hồng Duyên và Nguyễn Xuân Thành, 2010. Phân lập tuyển chọn vi sinh vật để xử lý phế thải trên đồng ruộng. *Tạp chí Khoa học đất*, 34: 68-73.
 Đinh Hồng Duyên, Nguyễn Thế Bình và Vũ Thanh Hải, 2015. Tuyển chọn và đánh giá khả năng sử dụng xạ khuẩn để xử lý phụ phẩm sau thu hoạch quả vải. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 15: 42-48.
 Eliot, E., 1997. *The science of composting*. CRC Press: 504.
 European Food Safety Authority (EFSA), 2014. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Toyocerin® (*Bacillus toyonensis*) as a feed additive for chickens for fattening, weaned piglets, pigs for fattening, sows for reproduction, cattle for fattening and calves for rearing and for rabbits for fattening. *EFSA journal*, 12 (7): 3766-3782.

- Haug, R.T., 1980. *Compost engineering principles and practice*. Ann Arbor Science publisher: 18 -19.
- Kanda, T., 2003. Mechanism of cellulase action on cellulose structure. *Journal of Applied Glycoscience*, 50 (1): 77-81.
- Lê Văn Nhung và Nguyễn Lan Hương, 2001. *Công nghệ xử lý một số phế thải nông sản chủ yếu (vỏ mía, vỏ thái cà phê, rác thải nông nghiệp) thành phân bón hữu cơ sinh học*. Báo cáo tổng kết đề tài cấp nhà nước KHCN.02-B04.
- Marmur, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organism, *Journal of Molecular Biology*, 3(2): 208-218.
- Nguyễn Ngọc Trúc Ngân và Phạm Thị Ngọc Lan, 2014. Tìm hiểu khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật phân lập từ chất thải rắn của nhà máy Fococev Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Trường Đại học Khoa học Huế, 1(1): 135-142.
- Nguyễn Thị Minh, 2016. Nghiên cứu xử lý phế phụ phẩm trồng nấm làm giá thể hữu cơ trồng rau an toàn. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 14(11): 1781-1788
- Nguyễn Thị Minh và Nguyễn Thanh Nhân, 2016. Tuyển chọn giống *Arbuscular mycorrhizae* và *Rhizobium* dùng để sản xuất vật liệu sinh học nhằm tái tạo thảm thực vật làm tiêu cánh trong khuôn viên. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 14(8): 1238-1247.
- Nguyễn Xuân Thành, Lê Văn Hưng và Phạm Văn Toàn, 2003. *Giáo trình công nghệ vi sinh vật trong nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội: 105 trang.
- Nguyễn Xuân Thành và ctv, 2004. *Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý tàn dư thực vật trên đồng ruộng thành phân hữu cơ tại chỗ bón cho cây trồng*. Báo cáo đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ, B2004-32-66.
- Rynk, R., Kamp, M., Wilson, G.B., and *et al.*, 1992. *On-Farm Composting Handbook, Northeast Regional Agricultural Engineering Service*. Cooperative Extension, Ithaca, NY. 186: 10.
- Saito, M. and Miura, K.I., 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim Biophys Acta*, 72: 619.
- Sonawale, S.B., 2016. Studies on enzymes extracted from microbes isolated from mangrove sediments, *Res J. Chem. Environ. Sci.* 4(2): 27-31
- Tallur, P.N., Sajjan D.B., Mulla S.I., and *et al.*, 2016. Characterization of antibiotic resistant and enzyme producing bacterial strains isolated from the Arabian Sea. *Biotech*, 6(1): 28.
- The Bioresource Collection and Research Center (BCRC). Ngày truy cập 15/04/2017. <http://strain.berc.firdi.org.tw/BSAS/>
- Tổng cục Tiêu chuẩn đo lường Chất lượng, Bộ Khoa học và Công nghệ, 2005. TCVN 6168:2002 về Chế phẩm vi sinh vật phân giải cellulose.
- Tổng cục Thống kê, 2016. Báo cáo sơ bộ kết quả Tổng điều tra Nông thôn, nông nghiệp và thủy sản năm 2016. NXB Thống kê.
- Trịnh Thành Trung, Phan Lạc Dũng, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp, Đào Thị Lương, 2013. Đặc điểm sinh học và tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum sp 1901 phân lập tại rừng Quốc gia Hoàng Liên. *Tạp chí khoa học ĐHQGHN*, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 29(3): 59-70.
- Walke, R., 1975. *The preparation, characterization and agricultural use of bark-sewage compost*. Ph.D. dissertation, University of New Hampshire, Durham.