

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN, ĐỊNH DANH MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT CÓ LỢI VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ PHỤ PHẨM NGỌN LÁ MÍA LÀM PHÂN HỮU CƠ

Lê Thị Thanh Huyền^{1*}, Phạm Thị Thanh Bình¹,

Vũ Thị Hạnh¹, Phùng Thị Tuyết Mai¹

¹ Trường Đại học Hồng Đức

* Email: lethithanhhuyen@hdu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng vi sinh vật có lợi và bước đầu ứng dụng để xử lý phụ phẩm ngọn lá mía làm phân bón hữu cơ. Kết quả đã tuyển chọn được bốn chủng vi khuẩn I5, ĐK18.1, ĐK17.2, CAT1.2 có hoạt tính phân giải cellulose mạnh, ổn định từ các mẫu đất và lá mía đã hoai mục tự nhiên. Định danh loài bằng phương pháp giải trình tự gen rRNA 16s đã xác định được các chủng I5, ĐK18.1, ĐK17.2, CAT1.2 lần lượt thuộc các loài *Bacillus amyloliquefaciens* (độ tương đồng 99,70%); *Bacillus velezensis* (độ tương đồng 99,86%); *Bacillus amyloliquefaciens* (độ tương đồng 99,93%) và *Bacillus siamensis* (độ tương đồng 99,86%). Kết quả thử nghiệm sử dụng các chủng này để xử lý phụ phẩm ngọn lá mía đã nâng cao đáng kể hiệu quả phân hủy chất hữu cơ sau 38 ngày ủ; sản phẩm phân hữu cơ hoai mục, đảm bảo độ chín. Hàm lượng nitơ tổng số và photpho hữu hiệu trong thành phẩm của công thức thực nghiệm có sử dụng các chủng vi khuẩn tuyển chọn được tương ứng là 1,37 và 0,77%, cao hơn so với đối chứng (công thức đối chứng tương ứng là 0,92 và 0,49%)

Từ khóa: Hoạt tính enzym, phân lập, phân hữu cơ, phụ phẩm ngọn lá mía, vi sinh vật.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Hiệp hội Mía đường Việt Nam (2023) [1], diện tích trồng và sản lượng mía, sản lượng đường tại Việt Nam niên vụ 2022 - 2023 đều tăng. Các phụ phẩm từ cây mía ở các nhà máy đường, vùng trồng vẫn là nguồn thải gây ô nhiễm môi trường. Chế biến phụ phẩm này thành phân bón hữu cơ vừa không bỏ phí nguồn phụ phẩm, lại không gây ô nhiễm môi trường là vấn đề cần nhiều nghiên cứu. Hiện nay, tổng diện tích mía của khu vực Bắc Trung bộ đạt khoảng gần 60 nghìn ha, sau mỗi vụ thu hoạch, lượng phụ phẩm gồm: Ngọn mía chiếm khoảng 16 - 18%, lá mía chiếm khoảng 20% để lại tại ruộng. Hàm lượng N, P₂O₅, K₂O và C hữu cơ trong ngọn, lá mía được ghi nhận tương ứng là 15 g/kg; 2,3 g/kg; 5,5 g/kg; 500 g/kg [2].

Việc xử lý, khai thác triệt để các sản phẩm phụ này sẽ làm tăng thu nhập cho người dân do tiết kiệm được tiền mua phân bón hữu cơ, cải tạo được đất canh tác, giảm phát thải khí nhà kính do khói bụi khi đốt lá mía. Tuy nhiên, thành phần chính

của lá mía là cellulose (32 - 44%), hemicellulose (24 - 30%), lignin (12 - 36%) và tỉ lệ C/N của lá mía khoảng 150 [3] nên rất khó bị phân hủy sinh học. Theo Weil và Brady (2017) [4], tốc độ phân hủy của các loại nguyên liệu phụ thuộc nhiều vào tỉ lệ C/N, nếu lớn hơn 60 thường là rất lâu. Vì vậy, trong nghiên cứu này, đã tiến hành phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật có hoạt tính enzym cao từ hệ vi sinh vật trong môi trường tự nhiên, góp phần làm giàu thêm bộ giống vi sinh vật có khả năng phân hủy mạnh các hợp chất cellulose; phối hợp các chủng đã tuyển chọn để ứng dụng vào xử lý phụ phẩm ngọn lá mía tạo ra nguồn phân bón hữu cơ có giá trị cao trong ngành nông nghiệp.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy nhanh và mạnh ngọn lá mía được phân lập và tuyển chọn từ 11 mẫu đất và lá mía thu thập tại huyện Ngọc Lặc, tỉnh Thanh Hóa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có lợi trong mẫu đất và lá mía hoai mục bằng phương pháp pha loãng thập phân và cấy gọt trên đĩa Petri chứa môi trường chuyên biệt. Môi trường chuyên biệt được sử dụng trong quá trình phân lập là môi trường Hans (đối với vi khuẩn), Gauze's medium No 1 (đối với xạ khuẩn) và Asparagine (đối với nấm). Mẫu đất và lá mía hoai mục sau khi được pha loãng đến độ pha loãng thích hợp sẽ được cấy lên bề mặt môi trường chứa trong các đĩa Petri, sau đó nuôi ở điều kiện nhiệt độ 28 – 30°C trong thời gian 1 - 3 ngày đối với các chủng vi khuẩn, 7 - 14 ngày với xạ khuẩn và 5 -10 ngày đối với các chủng nấm. Khi các khuẩn lạc xuất hiện, tiến hành tuyển chọn các khuẩn lạc mọc tách biệt, hình dạng to, khỏe... để cấy chuyển vào các đĩa Petri đã chứa sẵn môi trường. Quan sát đặc điểm hình thái của vi sinh vật bằng phương pháp làm tiêu bản giọt ép và nhuộm Gram [5].

2.2.2. Định danh loài bằng phương pháp giải trình tự gen rRNA 16s

Tách ADN tổng số của mẫu vi sinh vật cần định danh bằng bộ kit Genomic DNA Purification Kit của Fermentas. PCR khuếch đại gen 16S. Sản phẩm PCR gen 16S sau khi được tinh sạch tiến hành đọc trình tự bằng bộ kit Bigdye V3.1 trên máy 3130xl (ABI- Mỹ).

2.2.3. Xác định một số đặc điểm sinh học của các chủng tuyển chọn

- Xác định khả năng chịu nhiệt độ: Các chủng thử nghiệm được nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung agar ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau: 40, 25, 37, 45°C. Sau 2 ngày, quan sát kết quả thí nghiệm thông qua đánh giá khả năng sinh trưởng của chúng.

- Xác định khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật: Áp dụng theo phương pháp xác định định tính hoạt tính CMC-aza [6].

- Xác định khả năng phân giải phot phat khó tan: Áp dụng theo TCVN 8565:2010 [7].

- Xác định khả năng đối kháng nấm gây bệnh trong đất:

+ Vi khuẩn đối kháng giả định được nuôi cấy trên môi trường LB (Luria-Bertani medium) không có agar ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên máy lắc ổn nhiệt trong thời gian 2 ngày. Đồng thời, nuôi cấy trên môi trường LB (Luria-Bertani medium) có chứa agar ở nhiệt độ 28°C trong tủ ẩm.

+ Chủng nấm kiểm định *Fusarium moniliforme* Sheldon, No.: 38159 – ATCC, gây bệnh thối ngọn, xoắn cổ lá mía và *Ustilago scitaminea* Sydow DSM No.: 11941, gây bệnh than đen trên cây mía sẽ được cấy trên môi trường PDA agar. Quan sát kết quả thí nghiệm: Chủng có khả năng đối kháng nấm gây bệnh sẽ tạo vòng vô khuẩn; nếu không ức chế được, nấm sẽ phát triển bình thường.

2.2.4. Thử nghiệm khả năng phân giải phụ phẩm ngọn lá mía của các chủng vi sinh vật được tuyển chọn

- Nguyên vật liệu thử nghiệm:

+ Phụ phẩm ngọn, lá mía được thu từ huyện Ngọc Lặc, tỉnh Thanh hoá. Các phụ phẩm này được băm tạo kích thước từ 1 – 3 cm trước khi tiến hành xử lý chế phẩm (trước khi ủ), kết hợp với phân NPK, phân gia súc (phân bò).

+ Chế phẩm vi sinh chứa 4 chủng vi sinh vật vật đã được tuyển chọn. Mật độ mỗi loại $\geq 10^8$ CFU/g.

- Công thức (CT) thí nghiệm:

+ Công thức 1: Công thức đối chứng (0,2 tấn ngọn lá mía + nước + phụ gia).

+ Công thức 2: Công thức thực nghiệm (0,2 tấn ngọn lá mía + nước + phụ gia + chế phẩm vi sinh vật được tuyển chọn).

- Quy mô thí nghiệm: Lượng ngọn lá mía: 0,2 tấn ngọn lá mía/công thức x 2 CT x 3 lần nhắc lại = 1,2 tấn ngọn lá mía. Lượng chế phẩm: 4 kg/tấn nguyên liệu x 0,2 tấn nguyên liệu/công thức x 3 lần nhắc lại = 2,4 kg. Lượng phụ gia tính cho 1 tấn nguyên liệu (kể thừa nghiên cứu về xử lý rơm rạ của bộ môn Vi sinh, Viện Thổ nhưỡng Nông hóa): 10 kg NPK + 1,0 tấn phân gia súc (phân bò).

- Chỉ tiêu phân tích chất lượng phân bón sau thí nghiệm (5 mẫu/công thức): N tổng số: Phân

tích bằng phương pháp Kjeldahl; P tổng số: Phân tích bằng phương pháp so màu; K tổng số: Phân tích bằng phương pháp quang phổ ngọn lửa; pH: Theo TCVN 5979:2021 [8]; kiểm tra độ chín của khối ủ theo TCVN 7185-2002 [9] theo đó độ chín (hoai) của phân hữu cơ vi sinh được xác định bằng phương pháp đo nhiệt độ đơn vị bao gói phân hữu cơ vi sinh vật trong 3 ngày liên tiếp, nhiệt độ của đơn vị bao gói không thay đổi mới đạt yêu cầu. Kiểm tra độ độc của khối ủ thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Zucchini và cs (1981) [10].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1. Kết quả tuyển chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải cellulose mạnh

STT	Ký hiệu chủng ban đầu	Mã hóa chủng sau tuyển chọn	Mật độ (CFU/ml)	Khả năng phân giải cellulose (kích thước vòng phân giải (D-d) (mm))
1	B09	I5	$5,2 \times 10^8$	54
2	B12	ĐK 18.1	$3,6 \times 10^8$	52
3	B21	ĐK 17.2	$4,4 \times 10^9$	54
4	B25	CA T1.2	$2,2 \times 10^9$	60

Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật được đánh giá theo phương pháp của Williams, 1983 [6]. Kết quả thực nghiệm cho thấy, nhìn chung, hoạt tính phân giải xenlulo của các chủng vi sinh vật sau khi sàng lọc dao động mạnh từ 52 - 60 mm. Điều này thể hiện được sự đa dạng về tiềm năng các chủng có khả năng phân giải xenlulo trong tự nhiên. Trong số các chủng vi khuẩn, đã nhận thấy chủng vi khuẩn CA T1.2 (*Bacillus siamensis*) có vòng phân giải cellulose cao nhất, đạt 60 mm; chủng I5 (*Bacillus amyloliquefaciens*); ĐK 18.1 (*Bacillus velezensis*); ĐK 17.2 (*Bacillus amyloliquefaciens*) có đường

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có lợi trong đất và lá mía

Từ mẫu đất và ngọn lá mía đã hoai mục đã phân lập được các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose gồm: 66 chủng vi khuẩn được ký hiệu từ B01 đến B66; 28 chủng xạ khuẩn được ký hiệu từ A01 đến A28; 22 chủng nấm được ký hiệu từ F01 đến F22. Từ đó đã sàng lọc, tuyển chọn được bốn chủng vi sinh vật có khả năng mọc nhanh (sinh trưởng tốt), đường kính khuẩn lạc lớn, vòng phân giải cellulose ≥ 50 mm (Bảng 1) và các chủng được ký hiệu lại như sau:

kính vòng phân giải đạt 52 - 54 mm. Với đường kính vòng phân giải này, đã nhận thấy khả năng phân giải xenlulo của các chủng là rất cao. Như vậy, cả 4 chủng tuyển chọn được đều có tiềm năng ứng dụng xử lý cơ chất hữu cơ giàu các-bon để sản xuất phân hữu cơ từ nguồn nguyên liệu có thành phần là cellulose cũng như xử lý môi trường bị ô nhiễm chất hữu cơ.

3.2. Kết quả định danh các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Các chủng vi sinh vật được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen rRNA 16s, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả định danh các chủng vi sinh vật

Chủng vi sinh vật	Kết quả định danh	
	Tên loài	Độ tương đồng
I5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,70%
ĐK 18.1	<i>Bacillus velezensis</i>	99,86%
ĐK 17.2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,93%
CA T1.2	<i>Bacillus siamensis</i>	99,86%

Như vậy, bốn chủng tuyển chọn đều là vi khuẩn, thuộc giống *Bacillus*. Theo hệ thống phân

loại an toàn sinh học TRBA 466 (Technical Rule for Biological Agents - The Federal Institute of

Occupational Safety and Health) của Cộng hòa Liên bang Đức, cả 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn này đều thuộc nhóm an toàn I, được phép sử dụng trong sản xuất. Do đó, bốn chủng vi khuẩn *Bacillus* đã tuyển chọn đáp ứng được yêu cầu an toàn và hoàn toàn có thể ứng dụng được trong xử lý phụ phẩm ngọn lá mía thành phân bón hữu cơ.

3.3. Một số đặc điểm sinh học của chủng tuyển chọn

Bảng 3. Khả năng chịu nhiệt độ của các chủng vi sinh vật được tuyển chọn

TT	Kí hiệu chủng	Nhiệt độ (°C)			
		4	37	45	60
1	I5 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	KPT	PT	PTT	PTT
2	ĐK 18.1 (<i>Bacillus velezensis</i>)	KPT	PT	PTT	PTT
3	ĐK 17.2 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	KPT	PT	PTT	PTT
4	CA T1.2 (<i>Bacillus siamensis</i>)	KPT	PTY	PTT	PTT

Ghi chú: KPT: Không phát triển; PT: Phát triển; PTT: Phát triển tốt.

Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của vi khuẩn. Mỗi loại vi sinh vật phát triển trong một giới hạn nhiệt độ nhất định, dựa vào khoảng nhiệt độ phát triển tối ưu, vi khuẩn có thể được chia làm 3 nhóm: Nhóm ưa ấm, nhóm ưa lạnh và nhóm ưa nóng có nhiệt độ tối ưu trên 45°C. Các chủng nghiên cứu đều phát triển ở nhiệt độ 37°C và phát triển tốt ở khoảng nhiệt độ từ 45 – 60°C. Ở nhiệt độ 4°C không chủng nào phát triển được nên có thể xếp chúng vào nhóm vi khuẩn ưa nhiệt.

3.3.2. Khả năng phân giải hợp chất photphat khó tan của các chủng tuyển chọn

Từ các chủng I5 (*Bacillus amyloliquefaciens*); ĐK 18.1 (*Bacillus velezensis*); ĐK 17.2 (*Bacillus amyloliquefaciens*); CA T1.2 (*Bacillus siamensis*), tiến hành đánh giá khả năng phân giải photphat trên môi trường đặc hiệu Picoskaya có thành phần $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ trong môi trường. Sau 48 giờ, quan sát kết quả thí nghiệm, không xuất hiện vòng trong bao quanh lỗ thạch có bổ sung dịch vi khuẩn I5; ĐK 18.1; ĐK 17.2; CA T1.2.

3.3.1. Khả năng chịu nhiệt của các chủng tuyển chọn

Khả năng chịu nhiệt của các chủng được tuyển chọn bằng cách cấy các chủng sang môi trường LB và ủ lần lượt ở nhiệt độ khác nhau: 4, 37, 45, 60°C và theo dõi sự phát triển của chúng trong vòng 24 - 48 giờ [6]. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả thử nghiệm cho thấy, các chủng I5, CAT 1.2 không có khả năng phân giải các hợp chất photpho vô cơ khó tan. Chủng ĐK 18.1; ĐK 17.2 phân giải các hợp chất photpho vô cơ khó tan mức độ trung bình; đường kính vòng phân giải nhỏ hơn 1,5 cm.

3.3.3. Xác định khả năng đối kháng nấm trong đất gây bệnh cho cây mía

- Với chi nấm *Fusarium* gây bệnh thối ngọn xoắn cổ lá mía: Chủng CA T1.2 (*Bacillus siamensis*) có khả năng đối kháng với nấm *Fusarium moniliforme* Sheldon mạnh nhất, đường kính vòng đối kháng đạt 17 mm; chủng ĐK 18.1 (*Bacillus velezensis*) có đường kính vòng đối kháng khá, đạt 12 mm; chủng ĐK 17.2 (*Bacillus amyloliquefaciens*) có đường kính vòng đạt 11 mm. Chủng I5 (*Bacillus amyloliquefaciens*) không có khả năng đối kháng nấm *Fusarium moniliforme* Sheldon.

- Với chi nấm *Ustilago scitaminea* Sydow gây ra bệnh than.

Bảng 4. Khả năng đối kháng nấm *Fusarium moniliforme* Sheldon gây bệnh thối ngọn xoắn cổ lá mía của 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn

TT	Ký hiệu chủng	Đường kính vòng đối kháng nấm <i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon (mm)
1	I5 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	Không kháng nấm
2	ĐK 18.1 (<i>Bacillus velezensis</i>)	12
3	ĐK 17.2 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	11
4	CA T1.2 (<i>Bacillus siamensis</i>)	17

Bảng 5. Khả năng đối kháng nấm *Ustilago scitaminea* Sydow gây ra bệnh than trên cây mía của 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn

TT	Ký hiệu chủng	Đường kính vòng đối kháng nấm <i>Ustilago scitaminea</i> Sydow (mm)
1	I5 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	Không kháng nấm
2	ĐK 18.1 (<i>Bacillus velezensis</i>)	9
3	ĐK 17.2 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	8
4	CA T1.2 (<i>Bacillus siamensis</i>)	3

Chủng ĐK 18.1 (*Bacillus velezensis*) có khả năng đối kháng với nấm *Ustilago scitaminea* trung bình, đường kính vòng đối kháng 9 mm; chủng ĐK 17.2 (*Bacillus amyloliquefaciens*) có đường kính vòng đối kháng 8 mm; chủng CA T1.2 (*Bacillus siamensis*) có đường kính vòng yếu 3 mm. Chủng I5 (*Bacillus amyloliquefaciens*) không có khả năng đối kháng nấm *Ustilago scitaminea*.

3.4. Kết quả thử nghiệm khả năng phân giải phụ phẩm ngọn lá mía của các chủng vi sinh vật được tuyển chọn

3.4.1. Diễn biến nhiệt độ khối ủ

Nhiệt trong khối ủ là thông số quan trọng đánh giá khả năng hoạt động phân hủy của vi sinh vật trong khối ủ. Sự thay đổi nhiệt độ qua mỗi giai đoạn cũng đồng nghĩa với sự thay đổi các thành phần và số lượng của vi sinh vật trong khối ủ. Nhiệt độ trong khối ủ càng tăng cao thì chứng tỏ hoạt động của vi sinh vật càng mạnh mẽ, thành phần và số lượng của chúng càng phong phú [3]. Kết quả đánh giá nhiệt độ khối ủ đánh giá hiệu lực

của chế phẩm vi sinh được thể hiện trong bảng 1 cho thấy, khối ủ ở CT1 chỉ có phụ gia là phân trâu bò và NPK nên nhiệt độ trong khối ủ lên chậm và tối đa chỉ đạt 44°C. Trong khi đó, khối ủ ở CT2 ngoài phụ gia còn có thêm chế phẩm vi sinh vật đã làm cho nhiệt độ của khối ủ tăng nhanh, sau 6 ngày đã đạt 58°C và duy trì trong khoảng 58- 62°C trong liên tục 14 ngày (đến ngày thứ 20 sau khi ủ) sau đó giảm dần.

Tác dụng nhiệt độ cao trên 60°C của khối ủ ở CT2 khi có mặt của chế phẩm vi sinh vật thử nghiệm một mặt thúc đẩy nhanh quá trình phân giải ngọn lá mía, làm cho khối ủ nhanh chín, nông dân sớm giải phóng được mặt bằng của đồng ruộng, nhưng mặt khác đây chính là tác nhân tiêu diệt các mầm bệnh và cỏ dại gây hại cho mía còn tồn dư.

Dưới tác dụng của chế phẩm vi sinh vật được xử lý, thời gian ổn định nhiệt độ của khối ủ ở CT2 cũng xảy ra sớm hơn so với khối ủ ở CT1, bắt đầu từ ngày thứ 30 trong khi đó ở khối ủ ở CT1 đến ngày thứ 40 vẫn chưa có dấu hiệu ổn định nhiệt độ.

Bảng 6. Kết quả theo dõi nhiệt độ của khối ủ trong 40 ngày

Ngày thứ	Nhiệt độ (°C)	
	Công thức 1 (CT1)	Công thức 2 (CT2)
1	32	32
3	35	44
6	40	58
10	39	60
13	Tiến hành đảo trộn cả 2 khối ủ	
15	42	61
20	44	62
25	41	48
30	37	34
35	36	32
38	34	31
40	33	31

3.4.2. Thời gian chín của khối ủ và mức độ độc của nguyên liệu sau khi ủ

- Theo TCVN 7185:2002 [9] độ chín (hoai) của phân hữu cơ vi sinh được xác định bằng phương pháp đo nhiệt độ đơn vị bao gói phân hữu cơ vi sinh vật trong 3 ngày liên tiếp, nhiệt độ của đơn vị bao gói không thay đổi mới đạt yêu cầu. Do đó xác định được thời gian chín của khối ủ ở CT1 (không bổ sung chế phẩm vi sinh vật) là 47 ngày và thời

gian chín của khối ủ ở CT2 (có bổ sung chế phẩm vi sinh vật) là 38 ngày. Như vậy, bổ sung chế phẩm vi sinh vật giảm được 9 ngày về yêu cầu xác định độ chín của khối ủ so với không bổ sung chế phẩm.

- Về kiểm tra độ độc của khối ủ, kết quả cho thấy, khối ủ ở CT1 (không bổ sung chế phẩm vi sinh vật): Tỷ lệ nảy mầm của hạt cải đạt 84,53%, mức tốt. Khối ủ ở CT2 (bổ sung chế phẩm vi sinh vật): Tỷ lệ nảy mầm của hạt cải đạt 97,21%, mức rất tốt. Như vậy, cả 2 khối ủ đều đạt yêu cầu, tuy nhiên, khối ủ 2 có tỷ lệ hạt cải mọc cao hơn khối ủ 1 rất nhiều, chứng tỏ chất lượng nguyên liệu của khối ủ 2 cao hơn so với khối ủ 1 hay nói cách khác xử lý chế phẩm có tác dụng tạo nguyên liệu hữu cơ tốt hơn so với không xử lý.

3.4.3. Đánh giá theo cảm quan về khối ủ

Kết quả cho thấy, ở công thức có sử dụng chế phẩm (CT2) có sự thay đổi về màu sắc, mùi và độ dai so với mẫu đối chứng không sử dụng chế phẩm. Điều này xảy ra do tác động của phân giải cơ chất hữu cơ của chế phẩm vi sinh cùng với các phản ứng hóa sinh khi các vi sinh vật trong chế phẩm tạo ra các chất trao đổi bậc 1 hoặc bậc 2, tạo ra màu sắc, mùi của nguyên liệu sau khi ủ cũng như tính chất cơ lý của nguyên liệu.

Bảng 7. Tính chất cảm quan của ngọn, lá mía sau xử lý

Chỉ tiêu đánh giá	Công thức thử nghiệm	
	Công thức 1 (CT1)	Công thức 2 (CT2)
Màu sắc	Màu nâu	Màu nâu đen
Mùi	Hăng nhẹ đến vừa	Không mùi đến hăng nhẹ
Tỷ lệ % sụt lún của khối ủ	15%	40%
Thành phần cơ giới	Sợi mềm, hơi dai	Sợi mềm, mủn

3.4.4. Đánh giá chất lượng của khối ủ

Sau 50 ngày đã tiến hành lấy mẫu và phân tích thử nhận thấy: Xử lý chế phẩm (CT2) làm tăng OM (đạt 33,97%) so với không xử lý chế phẩm (CT1, OM chỉ đạt 27,56%).

Tỷ lệ C/N nguyên liệu sau ủ ở CT2 đạt 11,27, còn ở CT1 là 13,62. Như vậy xử lý chế phẩm làm giảm tỷ lệ C/N so với không xử lý.

Bảng 8. Chất lượng của ngọn, lá mía trước và sau khi xử lý

TT	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp thử	Đơn vị tính	Trước ủ	Sau ủ	
					CT1	CT2
1	pH	TCVN 5979:2007 [11]		5,12	5,64	6,13
2	OM	TCVN 5979:2007 [11]	%	48,53	27,56	33,97
3	Nitơ tổng số	TCVN 8557:2010 [12]	%	0,73	0,92	1,37
4	Phốt pho hữu hiệu	TCVN 8559:2010 [13]	% (P ₂ O ₅)	0,22	0,49	0,77
5	Kali hữu hiệu	TCVN 8560:2010 [14]	% (K ₂ O)	1,27	1,42	1,68

Hàm lượng nitơ tổng số ở công thức 2 cao hơn CT1 không bổ sung vi sinh vật và cao hơn trước khi ủ. Tuy nhiên, trong một số nghiên cứu xử lý phụ phẩm nông nghiệp trước đây thường thấy hàm lượng nitơ tổng số giảm trong quá trình ủ việc ủ không bổ sung vi sinh vật thường thấp hơn so với có bổ sung vi sinh vật [15] điều này cần tiếp tục nghiên cứu. Hàm lượng phốt pho hữu hiệu và kali hữu hiệu ở công thức xử lý chế phẩm đều cao hơn công thức không xử lý. Điều này được lý giải do sự hoạt động của vi sinh vật bổ sung trong khối ủ sinh ra các enzym cellulosa và một số axit hữu cơ khác như citric... có tác dụng phân hủy các hợp chất hữu cơ thành sản phẩm cuối ổn định và giải phóng các chất khoáng đơn giản trong đó có phốt pho và kali, kết quả này tương tự như nghiên cứu của Trần Thị Lệ và cs [16].

4. KẾT LUẬN

- Đã phân lập và tuyển chọn được 4 nguồn gen vi sinh vật bản địa có khả năng phân giải nhanh xenlulo trong lá mía. Kết quả định danh 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn lần lượt là: I5 (*Bacillus amyloliquefaciens*); ĐK 18.1 (*Bacillus velezensis*); ĐK 17.2 (*Bacillus amyloliquefaciens*); CA T1.2 (*Bacillus siamensis*).

- Ứng dụng 4 chủng vi sinh vật bản địa tuyển chọn để xử lý phụ phẩm ngọn và lá mía là có hiệu quả hơn so với không xử lý. Dưới tác dụng của chế phẩm xử lý, nhiệt độ khối ủ lên nhanh hơn, đạt nhiệt độ cao hơn, thời gian chín giảm và ít độc với sức nảy mầm của hạt cải. Nguyên liệu sau xử lý chế phẩm có hàm lượng OM, nitơ tổng số, phốt pho hữu hiệu, kali hữu hiệu đều cao hơn so với đối chứng không xử lý chế phẩm, đáp ứng được yêu

cầu của Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về phân bón hữu cơ.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu là một phần của đề tài cấp Bộ: Nghiên cứu giải pháp nâng cao hiệu quả sử dụng phụ phẩm cây mía trong sản xuất theo hướng hữu cơ vùng mía nguyên liệu Bắc Trung bộ; thuộc Đề án Phát triển nông nghiệp hữu cơ giai đoạn 2020 – 2030; mã số: TNMT.885.01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hiệp hội Mía đường Việt Nam (2023). <https://viracresearch.com/nganh-mia-duong-viet-nam-thuan-loi-2023-2024>. Ngành Mía đường Việt Nam thuận lợi niên vụ 2023 - 2024.
- Yufeng Liu, Yumo Tan, Dan Liang, Chengruo Pei and Zhenhua Zhang (2023). Effects of Sugarcane Leaf Return and Fertilizer Reduction on Maize Growth, Yield and Soil Properties in Red Soil. *Plants*, 12(5), 1029, <https://doi.org/10.3390/plants12051029>
- Vũ Văn Long, Trần Văn Dũng (2021). Phân lập và đánh giá khả năng phân hủy lá mía của các dòng vi khuẩn trong đất phèn trồng mía ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 63(3), 24 - 27.
- Weil. R. R, N. C. Brady (2017), The nature and properties of soils, 15th Edition, Pearson, New York.
- Nguyễn Lân Dũng (1978). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học tập 1, 2, 3*. Nxb Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp.
- Williams (1983). Bergey- Manual of sustematic bacteriology.

7. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 8565:2010. Phân bón vi sinh vật - Phương pháp xác định hoạt tính phân giải photphat của vi sinh vật.
8. Tiêu chuẩn Quốc gia Việt Nam TCVN 5979:2021. Đất, chất thải sinh học đã xử lý và bùn - xác định pH.
9. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 7185-2002. Vi sinh vật.
10. Zucconi, F., Pera, A., Forte, M. & de Bertoldi M. (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle* 22(2), 54 - 57.
11. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 5979:2007. Chất lượng đất - Xác định pH.
12. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8557:2010. Phương pháp xác định Nito tổng số trong phân bón.
13. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8559:2010. Phương pháp xác định photpho hữu hiệu.
14. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8560:2010. Phương pháp xác định kali hữu hiệu
15. Lê Phú Tuấn, Vũ Thị Kim Oanh, Nguyễn Thị Thu Hương (2016). Nghiên cứu xử lý phụ phẩm nông nghiệp thành phân hữu cơ sử dụng chế phẩm vi sinh tại xã Phúc Thuận, thành phố Phổ Yên, tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 6, 101 - 108.
16. Trần Thị Lụa, Nguyễn Thị Nguyệt, Nguyễn Việt Hiệp, Hoàng Văn Tám (2021). Phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật sử dụng cho xử lý bùn thải cá tra làm phân bón hữu cơ. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 4 (125), 124 - 131.

ISOLATION, SELECTION, IDENTIFICATION OF SOME BENEFICIAL MICROORGANISMS AND INITIALLY APPLIED IN TREATMENT OF THE TOPS AND THE LEAVES SUGARCANE RESIDUES TO MAKE ORGANIC FERTILIZER

Le Thi Thanh Huyen¹, Pham Thi Thanh Binh¹,

Vu Thi Hanh¹, Phung Thi Tuyet Mai¹

¹ *HongDuc University*

Summary

This study aimed to isolate, select and identify beneficial microorganisms and initially apply them to treatment of by – product form the tops and the leafves of sugarcane to make organic fertilizer. The result of the study have been selected four bacterial species, including: I5, DK18.1, DK17.2, CAT1.2 which had strong cellulose-degrading activity and stability. These four microorganisms were isolated from naturally decomposed sugarcane leaf and soil samples. The method used to identify species was 16s rRNA gene sequencing method has identified I5, DK18.1, DK17.2, CAT1.2 as belonging to *Bacillus amyloliquefaciens species* (99.70% similarity); *Bacillus velezensis* (99.86% similarity); *Bacillus amyloliquefaciens* (99.93% similarity) and *Bacillus siamensis* (99.86% similarity). The results of using these microorganisms to treat the by – product form the leafves of sugarcane showed that the efficiency of decomposing organic substance after 38 days of decomposition was significantly improved; decomposed organic fertilizer products, mostly decomposed and rich in nutrients. The total nitrogen and effective phosphorus content in the finished product of the experimental formula using selected bacterial species was 1.37% and 0.77%, respectively, higher than the control formula (comparison formula) 0.92% and 0.49% respectively.

Keywords: *Enzyme activity, isolation, organic fertilizer, by - products from the top of sugarcane, by - products from the leaf of sugarcane, microorganisms.*

Ngày nhận bài: 27/5/2024

Ngày chuyển phản biện: 18/6/2024

Ngày thông qua phản biện: 29/7/2024

Ngày duyệt đăng: 4/01/2025