

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CÁC CHỦNG VI SINH VẬT HỮU ÍCH ĐỂ TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ CHẤT THẢI RẮN HỮU CƠ THÀNH PHÂN BÓN

Phạm Thị Bích Liễu¹, Nguyễn Như Ngọc¹,
Vũ Kim Dung¹, Nguyễn Đăng Minh Chánh^{2,*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đã tuyển chọn và tối ưu hóa môi trường lên men thu sinh khối ba chủng vi sinh hữu ích: *Bacillus velezensis* N₂₄, *Bacillus amyloliquefaciens* NT và *Trichoderma* sp. N₁ với đặc tính các chủng có khả năng chuyển hóa các hợp chất hữu cơ đa dạng (tinh bột, cellulose, protein và pectin), có khả năng sinh tổng hợp IAA, phân giải phát phát khó tan và cố định nitơ, đối kháng vi sinh vật gây bệnh. Các thông số tối ưu môi trường lên men thu sinh khối các chủng bao gồm: Chủng N₂₄ bổ sung 4,5 g/l tinh bột, 8,25 g/l pepton, pH = 7, nhiệt độ 34°C; tốc độ lắc 150 vòng/phút, hàm lượng sinh khối ướt chủng N₂₄ đạt 27,55 g/l. Chủng NT lên men trong môi trường chứa 3,87 g/l tinh bột, 8 g/l pepton, pH = 7, nhiệt độ 35°C; tốc độ lắc 150 vòng/ phút, hàm lượng sinh khối ướt đạt 29,32 g/l; trong môi trường chứa 5g/l tinh bột; 6,85 g/l pepton; pH = 6; nhiệt độ 32°C; tốc độ lắc 77 vòng/phút, hàm lượng sinh khối ướt chủng N₁ đạt 39,21 g/l. Bước đầu đã tạo được chế phẩm vi sinh vật trên chất mang để xử lý chất thải hữu cơ thành phân bón đạt tiêu chuẩn.

Từ khóa: Chất thải rắn hữu cơ, phân vi sinh, tối ưu, xử lý chất thải, vi sinh vật.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gia Lai là tỉnh có diện tích lớn thứ hai ở Việt Nam và có khoảng 845.000 ha diện tích đất sản xuất nông nghiệp. Do vậy, lượng phế thải sau thu hoạch rất lớn (chục vạn tấn), rất đa dạng, bao gồm vỏ cà phê, thân lá thực vật trên đồng ruộng, vỏ trái cây sau chế biến... Thêm vào đó, theo thống kê của Chi cục Bảo vệ môi trường tỉnh Gia Lai, ước tính lượng chất thải rắn sinh hoạt toàn tỉnh là 755 tấn/ngày, trong đó, khu vực đô thị là 367 tấn/ngày, khu vực nông thôn là 388 tấn/ngày. Rác thải hữu cơ chiếm tỷ lệ lớn (trên 60%) tổng lượng chất thải. Tuy nhiên, các nguồn chất thải này chưa được xử lý gây ô nhiễm nghiêm trọng môi trường và nguồn nước, trong khi đất đai lại thiếu trầm trọng nguồn dinh dưỡng

cho cây và hàng năm chúng ta phải bỏ ra hàng chục triệu USD để mua phân hóa học ở nước ngoài [1].

Hiện nay, rác thải hữu cơ chiếm tỷ lệ lớn (trên 60%) tổng lượng chất thải. Tuy nhiên, các nguồn chất thải này chưa được xử lý gây ô nhiễm nghiêm trọng môi trường và nguồn nước, trong khi đất đai lại thiếu trầm trọng nguồn dinh dưỡng cho cây và hàng năm chúng ta phải bỏ ra hàng chục triệu USD để mua phân hóa học ở nước ngoài. Việc áp dụng các biện pháp xử lý truyền thống như: Ủ tự nhiên, đốt thường mang lại hiệu quả thấp. Do đó, nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi sinh vật hữu ích mới, có nhiều đặc tính tốt để nâng cao hiệu quả của quá trình xử lý chất thải hữu cơ và nâng cao chất lượng phân bón vẫn là vấn đề có ý nghĩa khoa học và thực tiễn được các nhà khoa học quan tâm [2-3].

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

² Viện Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Nafoods

* Email: ndmchanh75@gmail.com

Nghiên cứu này đã tiến hành phân lập, tuyển chọn, định danh các chủng vi sinh vật có hoạt tính enzyme đa dạng và một số hoạt tính sinh học có lợi khác như: Khả năng cố định nitơ, phân giải photphat khó tan và sinh tổng hợp IAA từ hệ vi sinh vật đã thích nghi tự nhiên với môi trường chất thải, để góp phần làm giàu thêm bộ giống vi sinh vật phân giải mạnh các hợp chất hữu cơ và phối hợp các chủng đã tuyển chọn để ứng dụng vào xử lý chất thải rắn hữu cơ trên địa bàn tỉnh Gia Lai, nhằm tạo ra nguồn phân bón hữu cơ sinh học giá trị cao cho ngành nông nghiệp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu chất thải rắn nông nghiệp (gỗ mục, lá mục, rơm rạ) đang phân hủy được lấy tại địa điểm khu vườn ươm Phân hiệu Trường Đại học Lâm nghiệp tại tỉnh Gia Lai. Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli*, *Samonella typhimurium*, *Shigella* sp., *Bacillus cereus*, *Penicillium casei* Staub, *Aspegillus flavus* được cung cấp từ bộ sưu tập giống Bộ môn Công nghệ vi sinh - hóa sinh, Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ

Cân 1 g mẫu, nghiền với 10 ml nước cất vô trùng, pha loãng và trang 0,1 ml trên đĩa chứa môi trường thạch - cao thịt - pepton. Nuôi ở nhiệt độ 30°C sau 3 ngày, cấy chuyển các khuẩn lạc riêng rẽ khác nhau về hình thái sang các đĩa khác, quá trình này được lặp lại cho đến khi khuẩn lạc thuần nhất [4]. Các khuẩn lạc riêng rẽ được chuyển sang môi trường NA (vi khuẩn) hoặc PDA (nấm) bổ sung 1% cơ chất tinh bột/CMC/pectin/cazein. Sau khi cấy, các đĩa được nuôi trong tủ nuôi ở nhiệt độ

35 - 37°C trong 24 - 36 giờ (vi khuẩn) hoặc 72 - 96 giờ (nấm).

2.2.2. Tuyển chọn chủng vi sinh vật có các đặc tính phù hợp để sản xuất phân hữu cơ vi sinh

- Khả năng sinh enzyme ngoại bào phân giải chất hữu cơ: Các khuẩn lạc riêng rẽ được xác định hoạt tính sinh enzyme ngoại bào phân giải các cơ chất (tinh bột, CMC, pectin, casein) theo phương pháp xác định vòng phân giải cơ chất trên đĩa thạch.

- Khả năng cố định nitơ: Chủng vi sinh vật được cấy trải trên môi trường Ashby manitol agar, nuôi ở 30°C trong 72 giờ. Chọn các chủng phát triển tốt trên môi trường này và nuôi cấy sang môi trường Ashby lỏng với chế độ lắc 125 vòng/phút, 30°C trong 72 giờ. Ly tâm thu dịch trong và xác định nồng độ NH_4^+ có trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler, sử dụng đường chuẩn amonium.

- Khả năng phân giải photphat khó tan: Các chủng vi sinh vật được nuôi trong môi trường NB lỏng pH = 7, ở 37°C trong 96 giờ, tốc độ lắc 120 vòng/phút. Ly tâm 6.000 vòng/phút, trong 10 phút, thu dịch và cấy chấm điểm vào môi trường Pikovskaya's, được nuôi ở 37°C, trong 24 giờ. Đo đường kính vòng thủy phân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

- Khả năng sinh tổng hợp IAA (Indole-3-Acetic Acid): Hàm lượng IAA được tạo ra trong dịch lên men vi khuẩn được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Van Urk Salkowski.

- Khả năng đối kháng với vi sinh vật gây bệnh:

Các chủng tuyển chọn được xác định khả năng đối kháng với một số chủng vi khuẩn và nấm bệnh bằng phương pháp đĩa cấy kép. Vi khuẩn và nấm bệnh được cấy trải trên môi trường dinh dưỡng thích hợp, sau đó các chủng tuyển chọn được cấy chấm điểm cùng trên 1 đĩa môi trường và

nuôi ở tủ nuôi ở 30 - 35°C trong 48 - 72 giờ sau đó quan sát hiện tượng đối kháng.

2.2.3. Định tên các chủng tuyển chọn

Đặc tính chủng vi sinh vật được xác định theo các phương pháp trong sổ tay phân loại vi sinh vật, mô tả hình thái, đặc điểm tế bào và khuẩn lạc, đặc điểm Gram để định tên sơ bộ các chủng. Tiếp đó, định tên chủng bằng sinh học phân tử theo phương pháp mô tả của Tim Sandle (2016) [5]. Vi sinh vật được tách ADN và xác định trình tự đoạn gen 16S rRNA (vi khuẩn) hoặc ITS1 - 5,8S - ITS2 (nấm).

2.2.4. Tối ưu hóa xác định thông số lên men thu sinh khối các chủng vi sinh vật

Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy thu sinh khối các chủng tuyển chọn theo phương pháp bề mặt đáp ứng và quy hoạch Box-Benken, sử dụng phần mềm Design-Expert. Ma trận thực nghiệm bao gồm 17 thí nghiệm với khoảng chạy của 3 yếu tố khảo sát là: Pepton 7 - 9 g/l, nhiệt độ 30 - 40°C, pH 6 - 7 (chủng N_{24}); pH 6,5 - 7,5, nhiệt độ 30 - 40°C, hàm lượng tinh bột 3,5 - 4,5 g/l (chủng NT); hàm lượng tinh bột 6 - 8 g/l, nhiệt độ 25 - 35°C, tốc độ lắc 50 - 150 vòng/phút (chủng N_1). Sau thời gian nuôi cấy xác định hàm lượng sinh khối ướt của các chủng như sau: Ly tâm để loại bỏ môi trường nuôi cấy ở 6.000 vòng/phút, cân để xác định khối lượng sinh khối ướt của các chủng trong thể tích môi trường lên men.

2.2.5. Quy trình tạo chế phẩm vi sinh trên chất mang

Sau khi lên men thu sinh khối ba chủng NT; N_{24} và N_1 ở các thông số lên men tối ưu, tiến hành ly tâm ở 6.000 vòng/phút để thu sinh khối ướt các chủng và trộn thành hỗn hợp sinh khối ướt với tỷ lệ ba chủng lần lượt là 1:1:1 (w/w/w) trong nước muối sinh lý theo tỷ lệ cứ 1 g hỗn hợp sinh khối pha trong 100 ml nước muối sinh lý. Chất mang sử dụng gồm mùn và than bùn (1:1) được nghiền

nhỏ, sấy ở 130°C đạt độ ẩm 5% được bảo quản trong túi zip ni lông sạch, khô để sử dụng. Tiến hành phối trộn đều hỗn hợp sinh khối với chất mang theo tỷ lệ cứ 100 ml nước muối sinh lý (chứa 1 gam hỗn hợp sinh khối) phối trộn với 1 kg chất mang được chế phẩm vi sinh. Sấy chế phẩm ở 40°C đến độ ẩm 8 - 9%, bao gói trong túi polyetylen dán kín, bảo quản trong nhiệt độ thường. Xác định mật độ vi sinh vật hữu ích trong chất mang sau 15 tuần bảo quản theo TCVN 4884:2005 [6].

2.2.6. Thử nghiệm hiệu quả xử lý chất thải của chế phẩm vi sinh

Quá trình thử nghiệm hiệu quả xử lý chất thải thành phân bón của chế phẩm được thực hiện như sau: Chuẩn bị chất thải (gỗ mục, lá mục, rơm rạ): đảo đều và trộn thêm (0,5%) phân chuồng, urê, phân lân, vôi bột, để bổ sung dinh dưỡng. Trải chất thải đã phối trộn thành lớp cao 30 - 35 cm. Pha chế phẩm vi sinh vật trên chất mang với nước thành dung dịch (10 g/l) và tưới đều lên lớp chất thải để đạt tới độ ẩm 65 - 70%. Sau đó trải thêm 1 lớp tương tự và tiếp tục tưới dung dịch đã pha sẵn cứ như vậy cho đến hết lượng chất thải. Đậy nắp thùng lại cho các vi sinh vật có ích phát triển, phân huỷ lượng chất thải và đảo trộn hai ngày 1 lần. Sau 8 tuần ủ lấy mẫu để xác định các chỉ tiêu phân bón theo TCVN 7185:2002 [7]. Đối chứng để so sánh là chất thải được trộn và ủ không có chế phẩm chỉ lợi dụng hoạt động của các chủng vi sinh vật tự nhiên.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2010.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải mạnh hợp chất hữu cơ từ nguồn thải

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

Để tạo chế phẩm xử lý chất thải rắn hữu cơ thành phân bón, các chủng vi sinh hữu ích ngoài khả năng đồng hóa và sử dụng đa dạng các hợp

chất hữu cơ có trong chất thải như tinh bột, cellulose, pectin, protein... còn cần có một số hoạt tính sinh học có lợi khác như: Khả năng cố định nitơ, phân giải phốt phát khó tan và sinh tổng hợp IAA. Từ mẫu chất thải nông nghiệp (rơm, lá cây, mùn...) hoại mục đã phân lập được 45 chủng vi sinh vật. Sau khi sàng lọc thu được 7 chủng vi sinh

vật có năng lực sinh tổng hợp đa enzyme (bao gồm NT; N₂₄; AT₁; AT₆; N₁; N₂ và M₁). Tiếp đó, tuyển chọn được 3 chủng (NT, N₂₄ và N₁) có hoạt tính phân hủy chất hữu cơ mạnh, khả năng cố định nitơ, phân giải phốt phát khó tan và sinh tổng hợp IAA. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Một số hoạt tính có lợi của chủng tuyển chọn

Hoạt tính sàng lọc		Ký hiệu chủng vi sinh vật		
		NT	N ₂₄	N ₁
Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d, mm)	Tinh bột	20 ± 0,8	17 ± 0,7	16 ± 0,6
	CMC	7,5 ± 0,2	8,6 ± 0,3	9,5 ± 0,4
	Cazein	8,9 ± 0,3	12 ± 0,4	12 ± 0,5
	Pectin	7,9 ± 0,3	7,8 ± 0,3	13 ± 0,5
Hàm lượng NH ₄ ⁺ trong dịch nuôi cấy (mg/l)		2,823 ± 0,03	3,281 ± 0,03	2,481 ± 0,04
Hoạt tính phân giải Ca ₃ (PO ₄) ₂ (D/d)		9,5 ± 0,3	9,5 ± 0,3	10,07 ± 0,4
Hàm lượng IAA trong dịch nuôi cấy (µg/ml)		36,48 ± 1,0	40,85 ± 1,2	36,42 ± 1,1

Tuyển chọn các chủng đa tác dụng là hướng nghiên cứu được nhiều tác giả lựa chọn nhằm xử lý hiệu quả các phế phụ phẩm nông nghiệp [3, 8, 9]. Nguyễn Thị Thu Thủy và Trần Thị Xuân Phương (2017) [2] đã nghiên cứu tuyển chọn được ba chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose mạnh bao gồm nấm mốc, xạ khuẩn và vi khuẩn. Rodriguez và Fraga (1999) [8] cho rằng, các chủng thuộc chi *Bacillus*, *Rhizobia* và *Pseudomonas* có khả năng hòa tan phốt phát vô cơ không tan. Tám chủng vi khuẩn có khả năng sinh IAA với lượng cao nhất đạt 12 µg/ml được phân lập từ đất [10].

Kết quả đã cho thấy, các chủng được tuyển chọn của nghiên cứu này có khả năng cố định NH₄⁺ khá tốt so với một số chủng khác như *Pseudomonas* sp. và *Bacillus* sp. (với hàm lượng NH₄⁺ trong dịch nuôi cấy đạt 3,5 mg/l) [9]. Thêm vào đó, khả năng sinh IAA của các chủng này tương tự so với các chủng *B. megaterium*, *Lactobacillus casei*, *B. subtilis*, *B. cereus* và

Lactobacillus acidophilus (hàm lượng IAA từ 10 - 60 µg/ml), là những chủng đã được chứng minh có tính ứng dụng để thúc đẩy và cải thiện sự phát triển một số loài thực vật [11]. Như vậy các chủng này có tiềm năng cao để ứng dụng vào sản xuất các chế phẩm vi sinh hữu ích.

3.1.2. Khả năng đối kháng với vi sinh vật gây bệnh

Để tuyển chọn các chủng có khả năng đối kháng với vi sinh vật gây bệnh, các chủng được kiểm tra tính đối kháng với một số vi khuẩn gây bệnh kiểm định (*Salmonella*, *Shighela*, *E. coli*, *Bacillus cereus*) và hai loại nấm gây bệnh trên thực vật (*Penicillium casei* Staub, *Aspegillus flavus*). Kết quả trong bảng 2 cho thấy, đường kính vòng kháng ≥ 4,5 mm, thể hiện khả năng đối kháng mạnh giữa chủng NT với chủng *Penicillium casei* Staub, giữa chủng N₂₄ với chủng *Salmonella* và *A. flavus*. Cả 3 chủng đều có khả năng kháng yếu với chủng *Shighela* và *B. cereus* (đường kính vòng kháng ≤ 2,0 mm) và *E. coli* với chủng N₂₄.

Bảng 2. Đường kính vòng đối kháng vi sinh vật gây bệnh của các chủng

Chủng	Đường kính kháng (mm)					
	<i>Salmonella</i>	<i>Shighela</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Penicillium casei</i> Staub	<i>A. flavus</i>
NT	2,3 ± 0,09	1,5 ± 0,06	2,0 ± 0,06	1,5 ± 0,03	4,5 ± 0,20	2,8 ± 0,12
N ₂₄	4,5 ± 0,13	2,3 ± 0,08	1,5 ± 0,07	1,8 ± 0,06	3,5 ± 0,13	5,5 ± 0,23
N ₁	2,5 ± 0,10	1,7 ± 0,07	3,8 ± 0,14	1,0 ± 0,03	2,0 ± 0,09	2,2 ± 0,13

3.1.3. Định tên các chủng tuyển chọn

Kết quả tách chiết ADN, giải trình tự gen và so sánh với trình tự trên genbank của các chủng tuyển chọn thu được kết quả ở bảng 3. Chủng N₂₄

100% tương đồng với *B. velezensis* chủng NT tương đồng 100% với *B. amyloliquefaciens* và chủng N₁ tương đồng 100% với *Trichoderma inhamatum*.

Bảng 3. Kết quả định danh các chủng vi sinh vật

Ký hiệu chủng	Tên loài	Độ tương đồng (%)	Đặc điểm khuẩn lạc
NT	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	G (+), khuẩn lạc màu trắng kem, hình hoa, mặt trên lồi, chia thành nhiều ngăn, đường kính 2 – 3 mm.
N ₂₄	<i>Bacillus velezensis</i>	100	G (+), khuẩn lạc hình không cố định, viền hơi lồi thành bờ rõ, bề mặt nhầy, màu trắng đục
N ₁	<i>Trichoderma</i> sp.	100	Hệ sợi khí sinh màu xanh nhạt, bông, sợi cơ chất màu xanh đậm.

Kết hợp các đặc điểm sinh hóa và định danh bằng sinh học phân tử, các chủng tuyển chọn bao gồm: *Bacillus velezensis* N₂₄, *Bacillus amyloliquefaciens* NT và *Trichoderma* sp. N₁. Theo nhiều nghiên cứu các chủng thuộc giống *Bacillus* như: *B. subtilis*; *B. thuringensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*, *B. megaterium*... đều là các chủng vi khuẩn không gây độc tố và an toàn, có loài được sử dụng với vai trò là probiotic trong thực phẩm [12]. Theo Xin và Hailin (2023) [13] nhận định các chủng nấm thuộc chi *Trichoderma* là chủng nấm được ứng dụng phổ biến để kiểm soát các bệnh truyền qua đất cũng như một số bệnh trên lá, hoa và quả của các loại cây trồng khác nhau. *Trichoderma* không chỉ có thể ngăn ngừa bệnh mà còn thúc đẩy tăng trưởng thực vật, cải thiện hiệu quả sử dụng chất dinh dưỡng, tăng cường sức đề kháng của cây trồng và cải thiện môi trường ô nhiễm hóa chất nông nghiệp. *Trichoderma* spp. cũng hoạt động như một tác nhân kiểm soát sinh học an toàn, chi phí thấp, hiệu

quả, thân thiện với môi trường cho các loài cây trồng khác nhau. Do vậy, chủng vi khuẩn N₂₄, NT và nấm N₁ tuyển chọn đáp ứng yêu cầu an toàn và hoàn toàn có thể ứng dụng được trong việc sản xuất chế phẩm vi sinh xử lý chất thải hữu cơ thành phân bón.

3.2. Kết quả điều kiện lên men tối ưu thu sinh khối các chủng

Quá trình tối ưu hóa điều kiện lên men thu sinh khối các chủng dựa trên cơ sở đã khảo sát điều kiện thích hợp để nuôi cấy các chủng vi sinh vật ở các yếu tố ảnh hưởng riêng rẽ như hàm lượng tinh bột, hàm lượng pepton, pH, nhiệt độ, tốc độ lắc (kết quả nghiên cứu không được trình bày trong bài báo). Phần này chỉ trình bày kết quả tối ưu với ba yếu tố của môi trường lên men có ảnh hưởng lớn tới sự phát triển sinh khối của các chủng. Chủng N₂₄, ba yếu tố ảnh hưởng lớn tới sinh khối được tối ưu là: Hàm lượng pepton, pH, nhiệt độ. Chủng NT, ba yếu tố gồm: pH, nhiệt độ, hàm lượng tinh bột. Trong khi đó với chủng N₁, ba yếu tố là: Hàm lượng tinh bột, nhiệt độ, tốc độ lắc

có ảnh hưởng lớn nhất đến hàm lượng sinh khối ướt. Kết quả tối ưu bằng phần mềm cho thấy, với hàm lượng tinh bột 3,5 - 4,5 g/l (chủng NT) hoặc 6 - 8 g/l (chủng N₁); hàm lượng pepton 7 - 9 g/l; pH 6 - 7 (chủng N₂₄) hoặc pH 6,5 - 7,5 (chủng NT); nhiệt độ 30 - 40°C (chủng N₂₄, NT) hoặc nhiệt độ 25 - 35°C (chủng N₁); tốc độ lắc 50 - 150 vòng/phút với cả 3 chủng. Ở các điều kiện lên men này, hàm lượng sinh khối ướt các chủng vi sinh vật thu được

cao nhất. Các khoảng giá trị khác cho hàm lượng sinh khối thấp hơn.

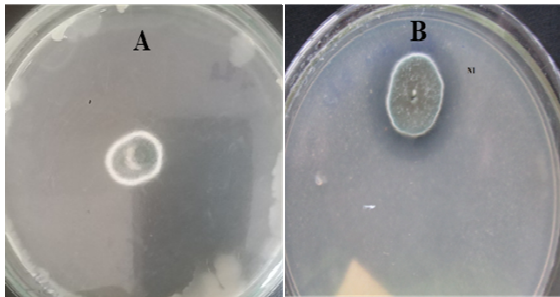
Ảnh hưởng đồng thời của 3 yếu tố đối với từng chủng được xác định theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm bậc hai để tối ưu điều kiện nuôi cấy thu sinh khối. Kết quả thí nghiệm của 3 chủng vi sinh vật được tổng hợp ở bảng 4, 5 và hình 1.

Bảng 4. Ma trận thực nghiệm quá trình nuôi cấy thu sinh khối 3 chủng vi sinh vật

TT	Chủng N ₂₄				Chủng NT				Chủng N ₁			
	Hàm lượng pepton (g/l)	pH	Nhiệt độ (°C)	Sinh khối ướt (g/l)	pH	Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng tinh bột (g/l)	Sinh khối ướt (g/l)	Hàm lượng tinh bột (g/l)	Nhiệt độ (°C)	Tốc độ lắc (vòng/phút)	Sinh khối ướt (g/l)
1	7,0	6,0	35	18,78	7,0	30	4,5	22,23	7,0	35	50	38,59
2	9,0	6,0	35	18,32	7,5	40	4,0	26,25	7,0	30	100	36,89
3	7,0	7,0	35	20,38	7,0	35	4,0	28,98	7,0	30	100	36,96
4	9,0	7,0	35	24,79	7,0	35	4,0	28,46	7,0	35	150	33,28
5	7,0	6,5	30	19,91	6,5	35	3,5	21,39	8,0	30	150	28,19
6	9,0	6,5	30	19,86	7,0	30	3,5	21,16	6,0	35	100	32,69
7	7,0	6,5	40	18,13	7,5	35	4,5	20,08	6,0	25	100	23,54
8	9,0	6,5	40	18,52	7,0	35	4,0	28,34	7,0	30	100	37,81
9	8,0	6,0	30	19,27	7,0	40	4,5	23,14	7,0	30	100	38,41
10	8,0	7,0	30	26,05	7,5	35	3,5	20,92	6,0	30	150	21,36
11	8,0	6,0	40	18,89	7,0	35	4,0	29,29	7,0	25	50	29,07
12	8,0	7,0	40	21,36	7,0	35	4,0	27,29	7,0	30	100	37,25
13	8,0	6,5	35	25,28	6,5	40	4,0	22,18	8,0	25	100	25,77
14	8,0	6,5	35	26,65	6,5	30	4,0	19,71	8,0	30	50	31,82
15	8,0	6,5	35	25,97	7,0	40	3,5	27,71	8,0	35	100	37,17
16	8,0	6,5	35	26,34	7,5	30	4,0	20,28	6,0	30	50	29,76
17	8,0	6,5	35	27,53	6,5	35	4,5	19,97	7,0	25	150	19,95

Bảng 5. Điều kiện tối ưu lý thuyết để nuôi cấy thu sinh khối các chủng vi sinh vật

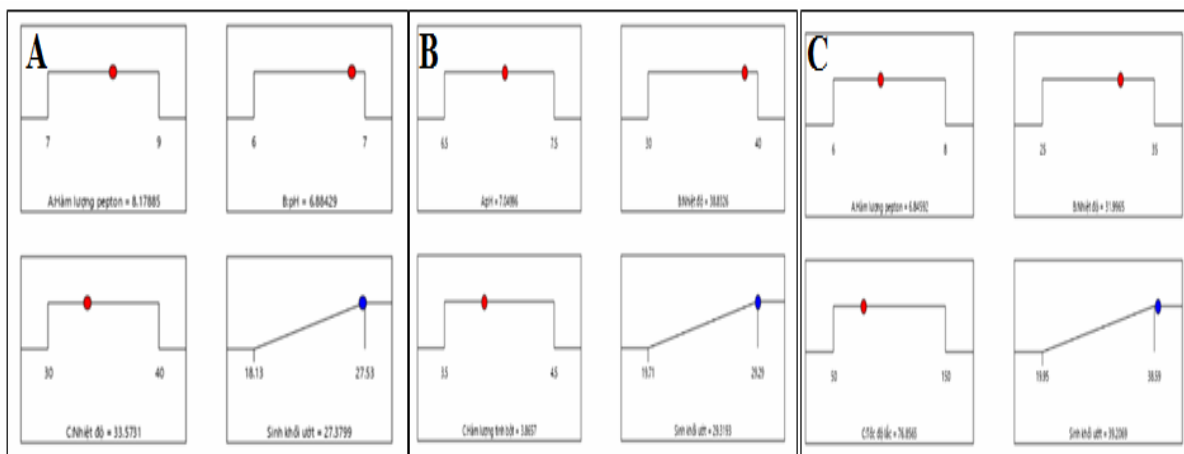
Tên chủng	Khoảng yếu tố nghiên cứu	Điều kiện tối ưu	Hàm lượng sinh khối ướt (g/l)
N ₂₄	- Pepton 7 - 9 g/l - Nhiệt độ 30 - 40°C - pH 6 - 7	- Pepton 8,18 g/l - Nhiệt độ 33,57°C - pH 6,9	27,38
NT	- pH 6,5 - 7,5 - Nhiệt độ 30 - 40°C - Hàm lượng tinh bột 3,5 - 4,5 g/l	- pH 7,05 - Nhiệt độ 38,83°C - Hàm lượng tinh bột 3,87 g/l	29,32
N ₁	- Hàm lượng tinh bột 6 - 8 g/l - Nhiệt độ 25 - 35°C - Tốc độ lắc 50 - 150 vòng/phút	- Hàm lượng tinh bột 6,85 g/l - Nhiệt độ 31,99°C - Tốc độ lắc 76,86 vòng/phút	39,21



Hình 1. Chủng N₁ trên môi trường Ashby rắn (A); Phân giải Ca₃(PO₄)₂ của chủng N₁ (B)

Với chủng N₂₄, thực nghiệm tại điều kiện nuôi cấy có hàm lượng pepton 8,25 g/l, nhiệt độ 34°C và pH = 7, sau 36 giờ nuôi cấy hàm lượng sinh khối

ướt thu được là 27,55 g/l. Tương tự, với chủng NT, thực nghiệm tại điều kiện hàm lượng tinh bột 3,87 g/l, nhiệt độ 39°C và pH = 7, sau 48 giờ nuôi cấy hàm lượng sinh khối ướt thu được là 29,57 g/l; chủng N₁ thực nghiệm tại điều kiện hàm lượng pepton 6,85 g/l, nhiệt độ 32°C và tốc độ lắc 77 vòng/phút, sau 96 giờ nuôi cấy hàm lượng sinh khối ướt thu được là 39,42 g/l. Như vậy, so với lý thuyết, các kết quả thực nghiệm có độ tương thích cao, các thông số tại điều kiện thực nghiệm được ứng dụng cho quá trình nuôi cấy từng chủng vi sinh vật để thu nhận sinh khối phục vụ cho quá trình tạo chế phẩm vi sinh vật hữu ích.



Hình 2. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu của chủng vi sinh vật

Ghi chú: A: chủng N₂₄, B: chủng NT, C: chủng N₁.

3.3. Kết quả xây dựng quy trình tạo chế phẩm phân bón

3.3.1. Tạo chế phẩm vi sinh trên chất mang

Hỗn hợp sinh khối uớt của 03 chủng vi sinh vật tuyển chọn được trộn đều với chất mang và

sấy ở 40°C đến độ ẩm 8 - 9%, bao gói trong túi polyethylen dán kín, bảo quản trong nhiệt độ thường. Kết quả xác định mật độ vi sinh vật hữu ích trong chế phẩm vi sinh sau sấy và thời gian bảo quản được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Mật độ vi sinh vật hữu ích trong chế phẩm

Thời gian (tuần)		2	4	6	8	10	15
Mật độ tế bào (CFU/g)	N ₂₄	3,9x10 ⁹	4,8x10 ⁸	3,7x10 ⁸	3,4x10 ⁸	3,3x10 ⁸	2,0x10 ⁸
	NT	4,4x10 ⁹	3,2x10 ⁹	3,1x10 ⁹	4,8x10 ⁸	3,4x10 ⁸	3,1x10 ⁸
	N ₁	1,3x10 ⁷	5,8x10 ⁶	4,2x10 ⁶	3,5x10 ⁶	2,9x10 ⁶	1,7x10 ⁶

Kết quả trong bảng 6 cho thấy, sau thời gian bảo quản 15 tuần mật độ các chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* N₂₄, *Bacillus amyloliquefaciens* NT đạt 10⁸ CFU/g và nấm *Trichoderma* sp. N₁ đạt 10⁶ CFU/g. Như vậy đảm bảo theo TCVN6168:2002 chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo [14].

3.3.2. Thử nghiệm hiệu quả của chế phẩm vi sinh trên chất thải

Sau 8 tuần ủ với chế phẩm, chất lượng phân bón được lấy mẫu phân tích các chỉ tiêu theo tiêu chuẩn phân bón hữu cơ QCVN 01-189:2019/BNNPTNT [15].

Bảng 7. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu chất lượng của phân bón hữu cơ

TT	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp phân tích	Kết quả		Chỉ tiêu chất lượng theo QCVN 01-189:2019/BNNPTNT [15]
			Phân ủ với chế phẩm vi sinh	Đối chứng	
1	Độ chín	Cảm quan	Phân màu nâu đen, tơi xốp, kích thước đồng đều, không mùi hôi.	Phân màu nâu vàng, bết, kích thước ít đồng đều, mùi hôi.	-
2	Độ ẩm (%)	TCVN 9297:2012 [16]	30,33	50,14	-
3	pH	TCVN 5779:2007 [17]	7,2	7,8	-
4	Hàm lượng chất hữu cơ (%)	TCVN 9294:2012 [18]	41,31	39,99	≥ 20
5	Hàm lượng nitơ tổng số (%)	TCVN 8557:2010 [19]	2,58	1,87	-
6	Hàm lượng lân hữu hiệu (%)	TCVN 8559:2010 [20]	2,35	0,49	-
7	Hàm lượng kali hữu hiệu (%)	TCVN 8560:2010 [21]	3,58	0,22	-

8	Mật độ <i>Salmonella</i> (cfu/g)	TCVN 4829:2005 [22]	0	4.10 ²	Không phát hiện/25 g
9	Hàm lượng axit humic	TCVN 8561:2010 [23]	3,56	0,85	-

Ghi chú: (-) không đánh giá.

Theo QCVN 01-189:2019/BNNPTNT [15]: Các loại phân bón có sử dụng chất hữu cơ nguồn gốc từ rác thải đô thị; phế thải công nghiệp chế biến nông sản, thực phẩm; phế thải chăn nuôi làm nguyên liệu sản xuất, phân hữu cơ tạo thành cần đánh giá các yếu tố hạn chế như: As, Pb, Hg, Cd, vi khuẩn *Salmonella*, vi khuẩn *E. coli*. Kết quả phân tích trong bảng 7 cho thấy, phân hữu cơ thu được có các chỉ tiêu dinh dưỡng đạt yêu cầu, cao hơn nhiều so với công thức đối chứng là phân chỉ được ủ tự nhiên, đặc biệt ở các chỉ tiêu hàm lượng lân và kali hữu hiệu, hàm lượng axit humic. Chỉ tiêu vi sinh vật gây bệnh ở phân bón ủ với chế phẩm vi sinh cũng không phát hiện trong khi ở đối chứng vẫn chứa đến 10² CFU/g. Điều này đã cho thấy, vai trò của các chủng vi sinh vật hữu ích có trong chế phẩm đã có tác dụng tốt. Một số yếu tố hạn chế sẽ đánh giá trong thời gian tới.

Sản phẩm phân bón tạo ra có hàm lượng các thành phần dinh dưỡng đất tốt hơn so với khi nghiên cứu sản xuất phân hữu cơ từ lá táo, rom rạ, thân cây ngô và chế phẩm vi sinh *Trichoderma*. Hàm lượng dinh dưỡng được đánh giá so sánh là hữu cơ tổng số 41,31%, nitơ tổng số 2,58%, lân hữu hiệu 2,35% và kali hữu hiệu 3,58%, trong khi các chỉ tiêu này ở chế phẩm của nghiên cứu này lần lượt là 16,221%; 1,435%; 0,256% và 0,316% [24]. Thêm vào đó, chế phẩm vi sinh hỗn hợp gồm 3 loại vi sinh vật có thể xử lý hiệu quả nguồn chất thải hữu cơ hơn so với việc chỉ dùng *Trichoderma*. Kết quả nghiên cứu tạo ra chế phẩm phân bón với hàm lượng đạm tổng là 1,68%, hàm lượng đạm dễ tiêu là 0,044%, không nhiễm *Coliform*, giá thành sản xuất

1 kg giá thể thấp nhất là 4.250 VNĐ/kg khi xử lý rác thải sinh hoạt và lá cây cao su ở tỷ lệ 1:1,5 [25].

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu chất thải hoai mục đã phân lập được 45 chủng vi sinh vật và tuyển chọn 02 chủng vi khuẩn (NT; N₂₄), 01 chủng nấm (N₁) có các đặc tính hữu ích cho cây trồng: phân giải chất hữu cơ, cố định nitơ NH₄⁺ (2,5 - 3,3 mg/l, phân giải lân khó tan Ca₃(PO₄)₂ (D/d = 9,5 - 10), sinh tổng hợp IAA (36,4 - 40,9 µg/ml) và đối kháng mạnh với một số chủng vi sinh vật gây bệnh (*Penicillium casei* Staub, *Salmonella* và *A. flavus*). Đã định tên được 03 chủng tuyển chọn là *B. velezensis* N₂₄; *B. amyloliquefaciens* NT và *Trichoderma inhamatum* N₁.

Điều kiện tối ưu để thu sinh khối, bao gồm: hàm lượng pepton 8,25 g/l, nhiệt độ 34°C và pH 7 (chủng N₂₄), hàm lượng tinh bột 3,87 g/l, nhiệt độ 39°C và pH 7 (chủng NT), hàm lượng pepton 6,85 g/l, nhiệt độ 32°C, tốc độ lắc 77 vòng/phút và pH 6 (chủng N₁). Hàm lượng sinh khối đạt lần lượt là 27,55 g/l, 29,57 g/l và 39,42 g/l.

Phân bón tạo thành chưa đạt chất lượng theo QCVN 01-189:2019/BNNPTNT [15] vì thiếu đánh giá yếu tố hạn chế như As, Pb, Hg, Cd, vi khuẩn *Salmonella*, vi khuẩn *E. coli*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tân Sỹ Hữu, Đà Thiếu Phương, Vũ Mạnh Sinh, Lưu Văn Kỳ, Khang Cát Lợi, Lý Văn Xuân (2022). *Bón phân khoa học - phân hữu cơ thay thế phân hóa học*. Nhà xuất bản Hà Nội.

2. Đinh Hồng Duyên, Nguyễn Thế Bình, 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*, 53: 61-70.
3. Nguyễn Thị Thu Thủy, Trần Thị Xuân Phương (2017). 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 phụ phẩm nông nghiệp làm phân hữu cơ vi sinh. *Tạp chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 1 (1): 159 - 168.
4. Đặng Quang Hải, Trần Thị Thanh Thủy (2022). Phân lập, tuyển chọn và định danh một số chủng vi sinh vật có lợi và bước đầu ứng dụng trong xử lý chất thải rắn hữu cơ làm phân bón hữu cơ sinh học. *Tạp chí khoa học và công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 20 (5): 56 - 61.
5. Tim Sandle (2016). Microbial identification. *Pharmaceutical Microbiology Essentials for Quality Assurance and Quality Control*, 103 - 113.
6. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 4884:2005. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.
7. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 7185:2002. Phân hữu cơ vi sinh vật.
8. Rodriguez H, Fraga R (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319 - 339.
9. Tran Thi Thuy Ha, Thai Thi Lam, Nguyen Thanh Huyen, Nguyen Xuan Canh (2018). Characterization and identification of nitrogen fixing bacteria isolated from agricultural soil. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 60 (3): 48-54.
10. Sharnali D., Tauhidur R.N. (2019). Isolation and characterization of Indole acetic acid producing bacteria from rhizosphere soil and their effect on seed germination. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8 (3): 1237 - 1245.
11. Mohite (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13 (3): 638 - 649.
12. Algburi A, Volski A (2016). Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*, 6 (06): 432 - 439.
13. Xin Y, Hailin G (2023). *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease, *Frontiers in Microbiology*, 14: 01 - 15.
14. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 6168:2002. Chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo.
15. Quy chuẩn Việt nam: QCVN 01-189:2019/BNNT. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng phân bón.
16. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 9297:2012. Phân bón - Phương pháp xác định độ ẩm.
17. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 5779:2007. Chất lượng đất - Xác định PH.
18. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 9294:2012. Phân bón - Xác định Cacbon tổng số.
19. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 8557:2010. Phân bón - Phương pháp xác định nitơ tổng số.
20. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 8559:2010. Phân bón - Phương pháp xác định photpho hữu hiệu.
21. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 8560:2010. Phân bón - Phương pháp xác định kali hữu hiệu.
22. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 4829:2005. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp phát hiện Salmonella trên đĩa thạch.

23. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 8561:2010. Phân bón - Phương pháp xác định axit humic và axit fulvic. Tân, huyện Hiệp Hòa, tỉnh Bắc Giang. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội*, 32: 289 - 295.
24. Phạm Thị Hà Nhung, Nguyễn Thị Chinh (2016). Nghiên cứu tiềm năng sản xuất phân hữu cơ từ lá tảo theo quy mô hộ gia đình tại xã Đồng Tân, huyện Hiệp Hòa, tỉnh Bắc Giang. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội*, 32: 289 - 295.
25. Hồ Bích Liên (2016). Sản xuất giá thể từ rác thải sinh hoạt và phụ phẩm nông nghiệp. *Tạp chí Đại học Thủ Dầu Một*, 2 (27): 48 - 55.

OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITION FOR USEFUL MICROBIAL STRAINS TO TREAT ORGANIC SOLID WASTE INTO FERTILIZERS

Phạm Thị Bích Liễu¹, Nguyễn Nhu Ngọc¹,
Vu Kim Dung¹, Nguyễn Đăng Minh Chanh²

¹Vietnam National University of Forestry

²Nafoods Research and Development Institute for Agriculture

Summary

This study selected and optimized the fermentation medium for biomass collection of three useful microbial strains: *Bacillus velezensis* N₂₄, *Bacillus amyloliquefaciens* NT and *Trichoderma* sp. N₁ with the characteristics of strains capable of metabolizing diverse organic compounds (starch, cellulose, protein, and pectin), as well as capable of biosynthesizing IAA, degrading insoluble phosphate, and fixing nitrogen, resistance to pathogenic microorganisms. The recommended process parameters for N₂₄ strain biomass collection of strains are medium supplemented with 4.5 g/l starch, 8.25 g/l peptone, initial pH 7, temperature 34°C, 150 rpm shaking speed. Under these conditions, the wet biomass content of strain N₂₄ can be reached 27.55 g/l. For the NT strain, fermented medium supplemented with 3.87 g/l starch, 8g/l peptone, initial pH 7, temperature 35°C, shaking speed 150 rpm, the wet biomass content reached 29.32 g/l. For the N₁ strain, fermented medium containing 5 g/l starch; 6.85 g/l peptone; initial pH 6; temperature 32°C, shaking speed 77 rpm, the wet biomass content reached 39.21 g/l. Initially, a microbial product was created on the carrier to process organic waste into standard fertilizer.

Keywords: *Organic solid waste, microbial fertilizer, optimization, waste treatment, microorganism.*

Người phản biện: TS. Lê Thị Thanh Thủy

Ngày nhận bài: 13/11/2023

Ngày thông qua phản biện: 8/12/2023

Ngày duyệt đăng: 23/02/2024