

Phân lập một số chủng vi sinh vật ứng dụng xử lý lục bình làm phân vi sinh

Bùi Anh Võ, Phan Ngọc Bảo Nguyên, Hoàng Hồng Ngọc, Nguyễn Thị Lan Hương
(Đại học Tôn Đức Thắng, TP Hồ Chí Minh).

TÓM TẮT

Lục bình đang là vấn nạn cho đường thủy các tỉnh có nhiều sông ngòi. Trong bài viết này, chúng tôi nghiên cứu phân lập một số chủng vi sinh vật ứng dụng xử lý lục bình làm phân vi sinh. Kết quả đạt được là đã phân lập được hai chủng *Trichoderma* và *Bacillus* có hoạt tính cellulase mạnh để phân giải lục bình. Phân tích thành phần hóa học lục bình thấy có hàm lượng cellulose cao: 40% trọng lượng khô. Đã sử dụng hai chủng trên biến lục bình thành phân vi sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm trong 21 ngày thấy kết quả tốt. Đã sử dụng hai chủng trên ủ lục bình thành phân vi sinh với độ phân giải cellulose tốt hơn mẫu đối chứng. Lượng cellulose giảm xuống khoảng một nửa so với lượng cellulose trong mẫu ban đầu và trong phân cũng còn hoạt tính phân giải cellulose khá cao, thuận tiện cho việc bón nơi có nhiều phế phẩm nông nghiệp như rơm rạ để tiếp tục phân giải tạo chất dinh dưỡng cho cây trồng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lục bình (*Eichhornia crassipes*) là một loài thực vật thủy sinh, nổi theo dòng nước. Chúng sinh sản rất nhanh, một cây mẹ có thể đẻ cây con tăng số gấp đôi mỗi hai tuần. Do đó làm cản trở sự lưu thông của thuyền bè trên sông (do quần vào chân vịt của thuyền), gây muỗi nhiều, làm mất cân bằng sinh thái...

Về việc sử dụng lục bình cũng có một số nghiên cứu như tận dụng làm đồ thủ công mỹ nghệ, vớt bỏ...nhưng chưa giải quyết được triệt để. Việc trực vớt lục bình phát triển nhanh, mạnh và dày đặc trên sông đã khó thì vấn đề môi trường sau khi trực vớt lục bình lên bờ càng khó hơn. Hiện nay, lục bình dày đặc trên sông đang là một thách thức lớn cho các tỉnh có sông ngòi nhiều. Sông Vàm Cỏ Đông, đoạn chạy qua tỉnh Tây Ninh, nhiều năm qua lục bình thường xuất hiện dày đặc khiến việc đi lại của tàu thuyền, vận chuyển nông sản gặp rất nhiều khó khăn nhưng chưa có phương án xử lý.

Phân bón vi sinh là sản phẩm chứa vi sinh vật sống bao gồm: vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn... được sử dụng để làm phân bón, thông qua các hoạt động sống của chúng tạo nên các chất dinh dưỡng mà cây trồng có thể sử dụng được, hay các hoạt chất sinh học, góp phần làm tăng khả năng phát triển cây trồng, cũng như tăng năng suất, chất lượng nông sản, và góp phần cải thiện môi trường. Việc nghiên cứu phân vi sinh thay dần phân hóa học đang là xu hướng nông nghiệp phát triển bền vững trong tương lai. Đặc biệt có ý nghĩa với nước ta là nước nông nghiệp với hơn 70% dân số làm nông nghiệp.

Nếu ta nghiên cứu sử dụng lục bình làm phân vi sinh thì vừa giải quyết được vấn đề lưu thông trên sông ngòi, vừa tìm ra một nguồn chất mang mới không gây ô nhiễm môi trường và rẻ tiền mang lại lợi ích kinh tế cao. Trên thực tế, các loài thực vật không thể sử dụng trực tiếp lục bình để sinh trưởng và phát triển. Việc nghiên cứu phân giải cellulose từ cây lục bình nhằm mục đích tận dụng nguồn phế liệu mới, để làm ra một loại phân bón hữu ích cho cây trồng sử dụng dễ dàng hơn, cung cấp chất mùn cho cây mà không gây nguy hại cho môi trường.

Như vậy, việc phân lập vi sinh vật để làm phân vi sinh từ lục bình là một nghiên cứu có ý nghĩa, giúp giải quyết nguồn nguyên liệu phế thải, hạn chế ô nhiễm môi trường, tạo ra nguồn phân bón sử dụng cho cây trồng.

Mục tiêu bài viết là tìm chủng vi sinh vật để ứng dụng xử lý lục bình làm phân bón vi sinh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu:

Lục bình: ở đây ta sử dụng lục bình tươi vớt được ở sông Sài Gòn.

Đất: sử dụng đất ruộng lúa lấy ở huyện Hóc Môn. Đây sẽ là nguồn nguyên liệu để ta phân lập một số chủng vi sinh vật có lợi để phân giải cellulose trong lục bình.



Hình 2.1. Cây lục bình

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

2.2.1. Một số phương pháp xác định tính chất của nguyên liệu:

- Hàm lượng cellulose được xác định theo phương pháp kiềm, bằng cách cho lục bình khô hòa trong NaOH 0.5% để hòa tan tinh bột và những pectin có tính acid và ít kết hợp với cellulose. Tiếp tục dùng các loại acid mạnh để tách các chất khác, chỉ còn lại cellulose, sau đó đem sấy khô và cân.
- Hàm lượng khoáng được xác định theo phương pháp nung ở nhiệt độ cao (500°C) trong acid đặc cho phân hủy hết lượng chất hữu cơ, cân được phần khoáng trong vật liệu. Lấy trọng lượng khô của vật liệu trừ lượng khoáng ra tổng hữu cơ.
- Hàm lượng nitơ tổng được xác định theo phương pháp Kjendahl.
- Xác định độ ẩm theo phương pháp sấy khô.

2.2.2. Phân lập chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose trong lục bình:

Phân lập các chủng vi sinh vật từ mẫu đất có sẵn trên các môi trường: thạch cao thịt pepton, PGA bằng cách pha loãng mẫu, cấy lên môi trường đổ đĩa sẵn, chọn khuẩn lạc riêng rẽ cấy tiếp lên môi trường khác cho thuần chủng.

Sau khi phân lập chúng tôi tiến hành thử hoạt tính phân giải cellulose trên môi trường CMC bằng cách đo vòng phân giải.

Định danh các chủng vừa phân lập được có khả năng phân giải cellulose.

Đầu tiên ta tiến hành nhuộm mẫu và quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc.

Sau đó tiến hành một vài thí nghiệm sinh hóa cần thiết như thử hoạt tính catalase đối với vi khuẩn.

2.2.3 Ủ lục bình với các chủng vi sinh vật vừa thu được trong phòng thí nghiệm:

Tiến hành ủ lục tươi và khô với khối lượng biết trước với các chủng vi sinh vật vừa phân lập được, với điều kiện nhiệt độ kiểm soát 40°C trong vòng 4 tuần.

Mẫu 1	Mẫu 2
100g lục bình tươi	100g lục bình khô
5ml dịch <i>Trichoderma</i>	5ml dịch <i>Trichoderma</i>
5ml dịch vi khuẩn <i>Bacillus</i>	5ml dịch vi khuẩn <i>Bacillus</i>

2.2.4. Ủ lục bình với hai chủng vi sinh vật trong điều kiện không khí bình thường:

Trong môi trường tự nhiên không thể kiểm soát được các điều kiện tối ưu thích hợp với quá trình ủ phân như trong phòng thí nghiệm nên ta tiến hành ủ phân ngoài trời ở nhiệt độ thường và theo dõi để xem xét khả năng tạo sản phẩm từ hai chủng vi sinh vật được phân lập.

Lục bình tươi được cắt nhỏ, sau đó tiến hành ủ với hai mẫu sau:

- Mẫu đối chứng: cân 3kg lục bình cắt nhỏ cho vào xô nhựa, thêm 500ml nước cất rồi trộn đều.
- Mẫu tiến hành: cân 3kg lục bình cắt nhỏ cho vào xô nhựa, trộn đều với 500ml dung dịch chứa giống *Trichoderma* và *Bacillus*.

2.2.5 Phân tích sản phẩm:

Tiến hành xác định hàm lượng cellulose theo phương pháp kiểm tương tự như đối với mẫu tươi.

So sánh sự giảm hàm lượng cellulose trong sản phẩm so với lục bình tươi và sản phẩm ở mẫu đối chứng để đánh giá được hiệu quả phân giải cellulose của vi sinh vật đối với việc phân giải lục bình.

3.KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Một số chỉ tiêu hóa sinh của lục bình:

STT	Thành phần	Hàm lượng
1	Hàm lượng tro	6%
2	Tổng hữu cơ	94%
3	Hàm lượng cellulose	40%
5	Nitơ tổng số	3,29g/l
6	Độ ẩm	90,28%

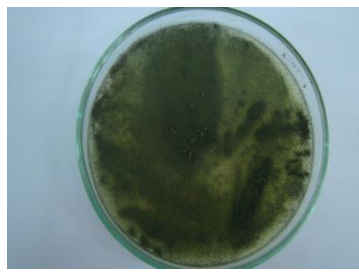
Theo các kết quả thu được của các thí nghiệm hóa sinh phân tích thành phần lục bình ta thấy được :

- Thành phần hữu cơ, cấu tạo chủ yếu của lục bình có tỉ lệ cao 94%. Trong đó, thành phần cellulose có tỉ lệ phần trăm khá cao trong thành phần của lục bình (40%). Đây cũng chính là thành phần quan trọng giúp ta tìm ra phương hướng phân lập chủng vi sinh có khả năng phân hủy lục bình thành phân hiệu quả nhất.

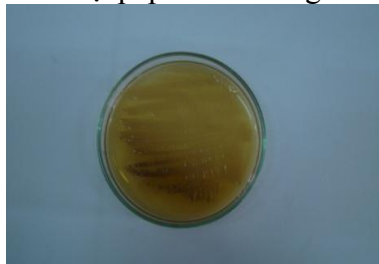
3.2. Phân lập vi sinh:

Quá trình phân lập vi sinh vật từ đất nuôi cấy trên các môi trường thu được kết quả sau:

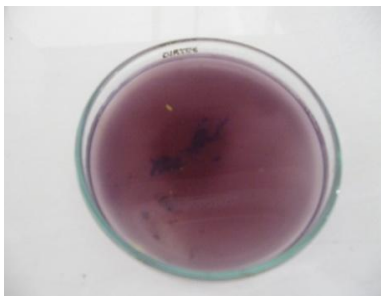
- Trên môi trường thạch PGA ta thu được 3 chủng vi sinh vật, chúng thích nghi và sinh bào tử trên môi trường khá dày đặc.



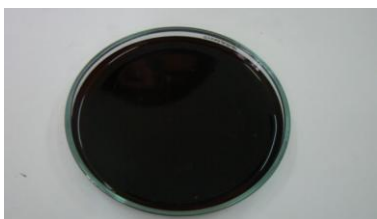
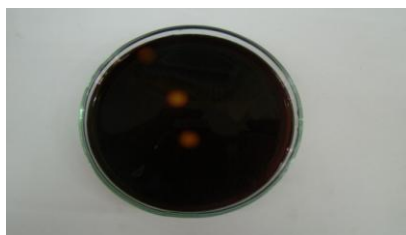
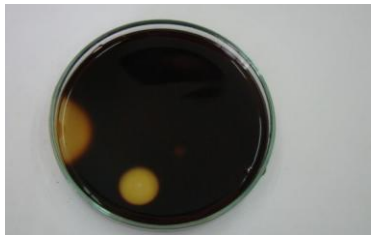
- Tương tự với môi trường thạch cao thịt peptone ta cũng thu được 3 chủng vi sinh vật.



Hoạt lực cellulase: trong các chủng phân lập được, chúng tôi nhận thấy có hai chủng có khả năng phân giải CMC khá tốt.

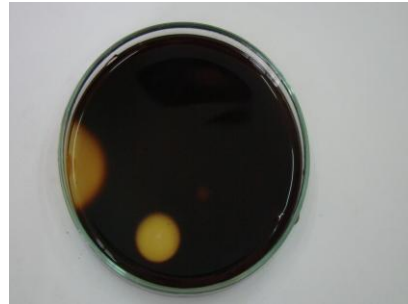
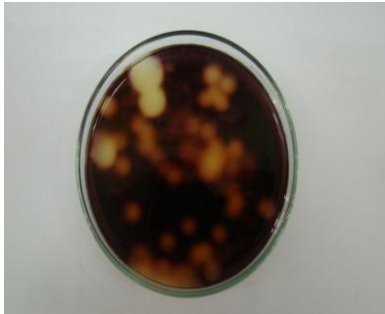


Sự phân giải cellulose ở các chủng vi sinh vật phân lập được trên PGA



Sự phân giải cellulose ở các chủng thu được trên môi trường thạch cao thịt pepton

Chọn hai chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất để khảo sát tiếp.



Sau khi quan sát trên kính hiển vi ta theo khóa phân loại của Barnett và Hunter (1971) để định danh chủng có khả năng phân giải mạnh cellulose trên môi trường PGA. Quan sát và nhận thấy chủng này có những đặc điểm sau:

- Bào tử trần có hai hoặc nhiều hơn vách ngăn hình cầu, trứng, trứng dài
- Bào tử phân nhánh (hình sao)
- Bào tử trần màu sẫm tối
- Giá bào tử trần phân nhánh
- Khối bào tử trần nhỏ ở đỉnh các nhánh hoặc ở đỉnh từng thể bình đơn độc.
- Giá bào tử trần (không màu) phân nhánh không đều

Qua những đặc điểm trên ta đi đến kết luận chủng vi sinh vật này thuộc giới Nấm, ngành Nấm, lớp Nấm bất toàn, nhóm *Hyphomycetes*, phân nhóm *Euhyphomyceridae*, giống *Trichoderma*.

Đối với vi sinh vật mọc trong môi trường thạch cao thịt pepton có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất: Qua quan sát trên kính hiển vi ta nhận thấy đây là loài vi khuẩn gram dương, tế bào có hình que, dính với nhau thành cụm hay sợi dài. Khi thử hoạt tính catalase của chủng này ta nhận thấy vi sinh vật này có hoạt tính catalase.

Kết luận đây là giống *Bacillus*.

3.4. Ủ phân lục bình và thu sản phẩm:

Sau 3 tuần ủ phân thì đạt được những kết quả sau:



Ở mô hình thí nghiệm ta tạo điều kiện thích hợp: nhiệt độ, độ ẩm... ủ trong 30 ngày ta thấy rằng với cùng một loại vật liệu là lục bình và 2 chủng vi sinh thu được từ việc phân lập chỉ khác là một mẫu khô và mẫu còn lại vẫn còn tươi.

Ở bình với nguyên liệu là lục bình tươi, lục bình phân hủy khá nhanh tạo phân, còn với lục bình khô mẫu có xẹp phân hủy nhưng rất ít. Điều này có thể giải thích được là do

thành phần trong mẫu tươi lượng nước chiếm khá cao một phần tạo độ ẩm tốt hơn so với mẫu khô, và chúng có hoạt lực cao hơn đối với nguyên liệu tươi...

Ở mô hình ủ ngoài tự nhiên



Ở mô hình bán sản xuất dựa vào kết quả thu được từ mô hình phòng thí nghiệm ta tiến hành ủ phân với nguyên liệu tươi với hai mẫu là mẫu đối chứng không có bổ sung vi sinh vật và mẫu có bổ sung 2 chủng thu được nhưng điều kiện ở môi trường tự nhiên.

Sau 3 tuần ta thu được kết quả khá tốt, mẫu có bổ sung 2 chủng vi sinh vật đã bị phân hủy và khả năng phân hủy tốt hơn so với mẫu đối chứng nhưng kết quả chưa đạt được theo như dự kiến do thời gian gấp nên đề tài phải kết thúc sớm.

Với những kết quả và biện luận trên ta thấy rằng việc ủ phân đã đạt được kết quả tốt nếu có thêm thời gian chắc chắn đề tài sẽ đạt được kết quả như mong muốn.

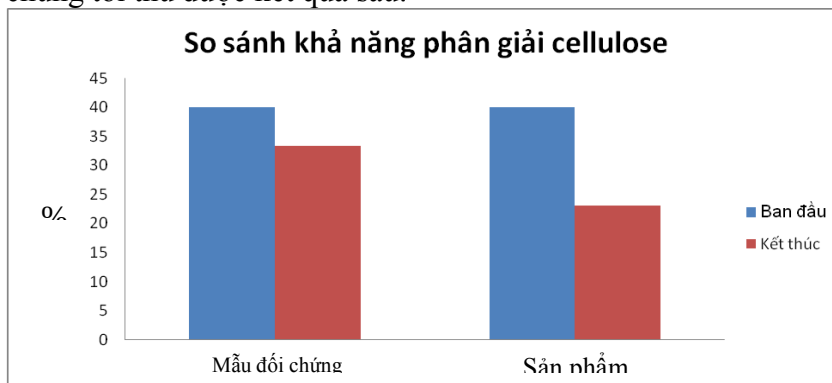
3.5 Phân tích các chỉ tiêu hóa sinh của sản phẩm thu được:

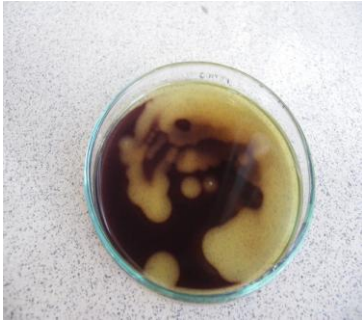
Sản phẩm thu được đem phân tích hàm lượng cellulose ta được kết quả sau:

mgiấy (g) = 0.8 g

	Mẫu đối chứng	mẫu tiến hành
$m_{\text{ban đầu}}$	1.2	1.3
$m_{\text{giấy}} + m_{\text{mẫu (sau khi sấy khô)}}$ (g)	1.2	1.1
$a = m_{\text{giấy}} + m_{\text{mẫu}} - m_{\text{giấy}}$	0.4	0.3
X(%)	33.33	23,08

Và tiến hành kiểm tra khả năng phân hủy cellulose của sản phẩm trên môi trường CMC để có thể thu được phân vi sinh vẫn còn khả năng phân giải cellulose ngoài môi trường chúng tôi thu được kết quả sau:





Sản phẩm



Mẫu đối chứng

Hai mẫu chúng tôi xác định lại chỉ tiêu cellulose so sánh với mẫu ban đầu để so hiệu quả tạo phân cũng như so sánh được khả năng, hoạt lực phân giải cellulose của vi sinh vật. Ta thấy rằng hàm lượng cellulose đã giảm gần như một nửa so với hàm lượng cellulose có trong thành phần ban đầu của nguyên liệu, vi sinh vật hoạt động tốt, nếu có thêm thời gian thì ta có thể sẽ được kết quả tốt hơn.

4. KẾT LUẬN:

Qua nghiên cứu khảo sát chúng tôi thấy rằng:

- Hàm lượng cellulose trong lục bình là 40 %, khá cao nên việc nghiên cứu tìm chủng vi sinh vật để ứng dụng xử lý lục bình làm phân bón là nghiên cứu có ý nghĩa.
- Đã phân lập được hai chủng *Trichoderma* và *Bacillus* có hoạt tính phân giải cellulose tốt.
- Đã sử dụng hai chủng trên biến lục bình thành phân vi sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm trong 21 ngày.
- Đã sử dụng hai chủng trên ủ lục bình thành phân vi sinh với độ phân giải cellulose tốt hơn mẫu đối chứng.

5. KIẾN NGHỊ:

- Cần có nhiều thời gian hơn để có thể xác định được những điều kiện tối ưu để vi sinh vật phân giải cellulose của lục bình tốt hơn.
- Tiếp tục nghiên cứu tiếp các chủng khác có thể phân giải cellulose tốt hơn.
- Thử nghiệm sản xuất phân lục bình ngoài thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Đức Lượng và cộng sự. *Thí nghiệm vi sinh học*. NXB Đại học quốc gia TP Hồ Chí Minh. 2003.
- [2].Lâm Thị Kim Châu, Nguyễn Thượng Lệnh, Văn Đức Chín. *Thực tập lớn sinh hóa*. Tủ sách Đại học Khoa học tự nhiên TP HCM, 2000.
- [3]Nguyễn Văn Mùi.*Thực hành hoá sinh học*. NXB KHKT Hà Nội, 2001.
- [4] Phạm Hoàng Hộ. *Cây cỏ Việt Nam*. NXB Trẻ, 2003.