

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

ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF EFFECTIVE MICROBIAL STRAINS TO MAKE BIO-ORGANIC FERTILIZER FROM ORGANIC SOLID WASTE

Đặng Quang Hải^{1*}, Trần Thị Thanh Thủy²

¹Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng

²Trung tâm Công nghệ Sinh học Đà Nẵng

*Tác giả liên hệ: dqhai@dut.udn.vn

(Nhận bài: 12/2/2022; Chấp nhận đăng: 14/4/2022)

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 chất thải rắn hữu cơ làm phân bón hữu cơ sinh học. Kết quả đã tuyển chọn được ba chủng vi khuẩn CT1, CT10 và R35 có hoạt tính amylase, cellulase và protease cao từ các mẫu rơm rạ hoai mục tự nhiên và chất thải rắn sinh hoạt hữu cơ đã phân hủy. Định danh bằng phương pháp giải trình tự Sanger đã xác định được các chủng CT1, CT10 và R35 lần lượt thuộc các loài *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* và *Bacillus subtilis*. Kết quả thử nghiệm dùng các chủng này để xử lý chất thải rắn hữu cơ cho thấy đã nâng cao đáng kể hiệu quả phân hủy chất hữu cơ sau 30 ngày ủ và sản phẩm phân bón hữu cơ sinh học đã hoai mục và bảo đảm độ chín. Hàm lượng nitơ tổng và photpho tổng của thí nghiệm có sử dụng các chủng vi khuẩn tuyển chọn (tương ứng 0,13 và 0,08%) cao hơn so với thí nghiệm đối chứng (tương ứng 0,09 và 0,06%).

Từ khóa - Chất thải rắn hữu cơ; Phân lập; Vi sinh vật; Hoạt tính enzyme; Phân hữu cơ sinh học

1. Đặt vấn đề

Cùng với sự phát triển kinh tế, xã hội, gia tăng dân số và sự lãng phí tài nguyên, lượng chất thải rắn hữu cơ đang ngày một gia tăng, thành phần ngày càng phức tạp và tiềm ẩn nhiều nguy cơ độc hại với môi trường và sức khỏe con người. Lượng chất thải rắn hữu cơ tăng nhanh chóng, trong khi tái sử dụng hầu như không đáng kể và sự quay vòng chất thải gặp nhiều khó khăn [1]. Vì vậy, việc quản lý và xử lý chất thải một cách hợp lý là yêu cầu rất cấp thiết hiện nay.

Xử lý chất thải hữu cơ bằng phương pháp sinh học bao gồm các công việc phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy mạnh các hợp chất hữu cơ trong chất thải thành phân bón hữu cơ sinh học là một giải pháp đang được các nhà khoa học quan tâm. Đây là một trong những giải pháp xử lý chất thải thân thiện với môi trường, là nhân tố góp phần đảm bảo tính bền vững cho môi trường sinh thái.

Trong những năm qua, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu phân lập, tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có lợi để xử lý các loại chất thải. Nguyễn Xuân Thành và cộng sự [2] đã phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao để ứng dụng vào sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật bón cho cây trồng. Từ trong mẫu nước rỉ ở bãi rác, Hà Thanh Toàn và cộng sự [3] đã phân lập được 17 dòng

Abstract - This study aims to isolate, select and identify effective microbial strains and initially apply these selected microorganisms to treat organic solid waste for making bio-organic fertilizer. Through screenings, three bacterial strains, namely CT1, CT10 and R35 with high amylase, cellulase and protease activities have been isolated and selected from samples of natural straw and organic domestic solid waste compost. The strains CT1, CT10 and R35 were identified as members of the species *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*, respectively by Sanger sequencing. The result showed that the use of these strains in treating organic solid waste has significantly improved the efficiency of organic matter decomposition after 30 days of composting and the bio-organic fertilizer product has fallen into decayed and matured. The contents of total nitrogen and total phosphorus of the experiment using selected strains (0.13 and 0.08%, respectively) were higher than the control experiment (0.09 and 0.06%, respectively).

Key words - Organic solid waste; Isolation; Microorganism; Enzyme activity; Bio-organic fertilizer

vi khuẩn phân giải protein, 24 dòng vi khuẩn phân giải cellulose và 21 dòng vi khuẩn phân giải tinh bột và đã nghiên cứu ứng dụng những dòng vi khuẩn hữu hiệu trong việc xử lý chất thải hữu cơ. Trong một nghiên cứu khác, quá trình phân lập, tuyển chọn một số chủng vi khuẩn từ mẫu phụ phẩm sau thu hoạch quả vải hoai mục tự nhiên, mẫu đất trồng và mẫu mùn đất đã được thực hiện. Trong đó, đã xác định được hai chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* và *Bacillus toyonensis* 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. Do đó, rất hữu hiệu khi dùng các chủng này để xử lý chất thải hữu cơ thành phân bón hữu cơ sinh học [4].

Một số nghiên cứu khác cũng đã cho thấy, các chủng vi khuẩn *Bacillus*, *Clostridium* thường hiện diện nhiều trong phân hữu cơ (compost) ủ tại gia đình hay thương mại [5, 6]. Theo một nghiên cứu bởi Lu và cộng sự [7], một số chủng vi khuẩn ưa nhiệt có hoạt tính enzyme cellulase cao đã được phân lập và tinh sạch từ một hệ thống ủ phân compost hỗn hợp chất thải hoa và rau quả. Nghiên cứu các đặc điểm hình thái và sinh lý của các chủng phân lập đã cho thấy, chúng đều có tác động tích cực đến sự phân hủy cellulose và hai

¹ The University of Danang - University of Science and Technology (Dang Quang Hai)

² Danang Biotechnology Center (Tran Thi Thanh Thuy)

trong số các chủng có quan hệ mật thiết với *Bacillus pasteurii* và *Bacillus cereus*. Ngoài ra, các vi khuẩn thuộc các chi *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Erwinia*, *Bacteriodes*, *Acetovibrio*, *Streptomyces*, *Microbispora*, *Fibrobacter* và *Paenibacillus* đã được nghiên cứu để tạo ra các loại enzyme khác nhau khi được ủ chất thải hữu cơ thành phân bón hữu cơ sinh học [8]. Một số chủng vi sinh vật phân giải cellulose để sản xuất các chế phẩm sinh học nhằm phân hủy chất thải nông nghiệp thành phân hữu cơ vi sinh đã được phân lập, tuyển chọn [9].

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính enzyme cao 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 cellulose, tinh bột và protein, và phối hợp các chủng đã tuyển chọn để ứng dụng vào xử lý chất thải rắn hữu cơ nhằm tạo ra nguồn phân bón hữu cơ sinh học giá trị cao cho 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 chất hữu cơ cao được phân lập và tuyển chọn từ rơm rạ hoa mục tự nhiên và chất thải rắn sinh hoạt hữu cơ đã phân hủy tự nhiên trên địa bàn thành phố Đà Nẵng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có lợi trong chất thải bằng phương pháp pha loãng thập phân. Môi trường được sử dụng trong quá trình phân lập là môi trường thạch - cao thịt - pepton. Mẫu chất thải sau khi 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 30 - 35°C trong thời gian 24 - 48 giờ. 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 ống nghiệm thạch nghiêng, hay các đĩa petri nhằm để cho các nghiên cứu tiếp theo [10]. Quan sát đặc điểm hình thái của vi sinh vật bằng phương pháp làm tiêu bản giọt ép và nhuộm Gram [10].

Khảo sát động thái sinh trưởng của vi sinh vật bằng phương pháp xác định sự thay đổi mật độ tế bào vi sinh vật theo thời gian. Để khảo sát động thái sinh trưởng của các chủng vi sinh vật đã tuyển chọn, sử dụng môi trường cao thịt - pepton. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường dịch thể trong các bình tam giác 250 ml, mỗi bình chứa 150 ml môi trường (1 ống giống gốc/bình tam giác). Mỗi chủng tiến hành khảo sát trong điều kiện hiếu khí (nuôi trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút). Sau mỗi 24 giờ lấy mẫu xác định mật độ tế bào vi sinh vật. Mật độ tế bào vi sinh vật được xác định theo phương pháp đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch nuôi cấy trên đĩa thạch [11].

Xác định hoạt tính enzyme của các chủng vi sinh vật tuyển chọn bằng phương pháp khuếch tán phóng xạ trên môi trường thạch đĩa [10, 12]. Dùng các đĩa petri chứa môi trường thạch - cao thịt - pepton có bổ sung riêng biệt 1% tinh bột tan, 1% carboxymethyl cellulose (CMC) hoặc 1% casein để thử các hoạt tính enzyme amylase, cellulase, hay protease

tương ứng. Dịch nuôi cấy của các chủng vi sinh vật được nhỏ vào các lỗ trên bề mặt các đĩa thạch. Ủ ở nhiệt độ 5 - 6°C trong 24 giờ để dịch enzyme khuếch tán đều vào bề mặt thạch. Sau đó, ủ ở nhiệt độ 30 - 35°C trong 24 giờ để dịch enzyme phân giải cơ chất. Lấy ra nhuộm màu. Sử dụng thuốc thử Lugol để kiểm tra hoạt tính enzyme phân hủy tinh bột, thuốc thử Congo red để kiểm tra hoạt tính enzyme phân hủy cellulose, thuốc thử Frazier để kiểm tra hoạt tính enzyme phân hủy protein. Thời gian nhuộm 1 - 2 phút, sau đó loại bỏ phần thuốc nhuộm còn dư khỏi đĩa thạch để quan sát vòng phân giải. Đối với nhuộm bằng thuốc thử Congo red để 15 phút, sau đó rửa lại bằng dung dịch muối NaCl 1M trong 15 phút. Đo kích thước vòng phân giải cơ chất D (mm), kích thước lỗ thạch d (mm). Tính hiệu số V (mm) = D - d để chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính enzyme mạnh. Chỉ số V càng lớn cho thấy hoạt lực của enzyme càng mạnh.

- Kiểm tra tính đối kháng giữa các chủng vi sinh vật

Sử dụng phương pháp cấy vạch thẳng vuông góc trên đĩa thạch chứa môi trường thạch - cao thịt - pepton để đánh giá tính đối kháng giữa các chủng vi sinh vật nghiên cứu. Cấy mỗi chủng dọc theo một đường thẳng riêng rẽ trên đĩa thạch và vuông góc với nhau, nuôi ở 30 - 35°C trong 48 giờ. Tiến hành quan sát sinh trưởng của các chủng ở các đường giao nhau, khả năng không ức chế xuất hiện khi đường giao nhau đó mọc đan chéo [13].

- Định danh các chủng vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen theo phương pháp Sanger trên hệ thống thiết bị giải trình tự gen tự động ABI 3130/3500 dựa trên nguyên tắc điện di mao quản. Thiết bị gồm các mao quản chứa gel polyacrylamide cho phép phân tích nhiều mẫu trong một lần điện di. Hệ thống detector gồm các camera có chùm tia laser đi qua nó để ghi nhận tín hiệu huỳnh quang một cách chính xác. Trong suốt quá trình điện di, khi có một vạch điện di qua chùm tia laser thì vạch điện di sẽ phát sáng và được camera ghi nhận và lưu lại thành một cường độ đỉnh sáng (peak) trong biểu đồ. Từ biểu đồ của các đỉnh cường độ sáng này, máy sẽ so sánh của các đỉnh tương ứng với nhau và phân tích thành trình tự của đoạn DNA. Trình tự DNA của gen được so sánh với cơ sở dữ liệu di truyền của các chủng vi sinh vật có trên "Genebank" để định danh loài.

- Nhân sinh khối vi sinh vật

Giống gốc của mỗi chủng vi sinh vật đã tuyển chọn từ các ống nghiệm thạch nghiêng được cấy vào môi trường cao thịt - pepton, nuôi trên máy lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ.

Sau thời gian nuôi cấy, phối trộn các chủng theo tỷ lệ bằng nhau để thu được hỗn hợp dịch giống. Sau đó chuyển hỗn hợp dịch giống này vào môi trường cao thịt - pepton với tỷ lệ 10%, nuôi trên máy lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ để thu dịch sinh khối vi sinh vật. Dịch sinh khối thu được sử dụng cho các thí nghiệm ủ phân.

- Thử nghiệm khả năng phân giải chất thải hữu cơ của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Chất thải hữu cơ sử dụng để ủ phân bao gồm hỗn hợp chất thải nông nghiệp (75%), bao gồm các loại phế thải rau màu, thực vật chết, cỏ dại của Làng rau La Hường (Phường Hòa Thọ Đông, Quận Cẩm Lệ, Tp. Đà Nẵng) và chất thải

rắn sinh hoạt hữu cơ dễ phân hủy (25%), bao gồm các loại thức ăn thừa, rau, củ quả hỏng tại các hộ gia đình trên địa bàn thành phố Đà Nẵng. Nguyên liệu được ủ trong các thùng xốp có kích thước chiều dài x chiều rộng x chiều cao = 38 x 35 x 25 cm. Các công thức thí nghiệm ủ phân được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Các công thức thí nghiệm

| Công thức | Khối lượng chất thải (kg) | Phân lân (g) | Vôi bột (g) | Tỷ lệ cấy giống (%) |
|---------------|---------------------------|--------------|-------------|---------------------|
| I (Đối chứng) | 5 | 150 | 100 | 0 |
| II | 5 | 150 | 100 | 5 |

Chất thải có kích thước lớn được băm nhỏ thành đoạn 3 - 5 cm, bổ sung thêm một lượng phân lân, vôi bột nhằm để giảm sự mất mát nitơ trong quá trình ủ phân và cân bằng độ pH trong khối ủ, trộn đều và điều chỉnh độ ẩm khối nguyên liệu ủ trong khoảng 50 - 60%. Sau đó cho vào các thùng ủ. Đối với mẫu thí nghiệm I (đối chứng) không bổ sung dịch sinh khối giống vi sinh vật. Đối với mẫu thí nghiệm II, bổ sung dịch sinh khối giống vi sinh vật với tỷ lệ 5%. Tiến hành ủ trong thời gian 30 ngày. Xác định sự thay đổi nhiệt độ và giảm chiều cao lớp nguyên liệu ủ tại thời điểm mỗi 3 ngày trong quá trình ủ phân. Đánh giá độ chín và tính chất cảm quan của phân ủ. Xác định các chỉ tiêu trước và sau ủ phân gồm: Hàm lượng các bon hữu cơ (Organic carbon - OC), nitơ tổng và photpho tổng.

- Phương pháp phân tích các chỉ tiêu chất lượng phân bón

Một số chỉ tiêu chất lượng phân bón được xác định theo các tiêu chuẩn của Việt Nam. Nhiệt độ được đo trực tiếp bằng máy đo và nhiệt kế. Khối lượng và chiều cao khối ủ được xác định bằng phương pháp cân và đo đạc. Độ ẩm được xác định theo phương pháp sấy khô đến khối lượng không đổi [14]. Độ chín (độ hoại mục) được xác định theo TCVN 7185:2002 [15]. Hàm lượng các bon hữu cơ tổng số được xác định theo phương pháp Walkley-Black [16]. Hàm lượng nitơ tổng số được xác định theo phương pháp Kjeldhal [17]. Hàm lượng photpho hữu hiệu được xác định theo phương pháp so màu [18].

- Phương pháp phân tích, tổng hợp và xử lý số liệu

Các số liệu thu thập, thực nghiệm trong quá trình nghiên cứu được phân tích, tổng hợp và xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Office 2013.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

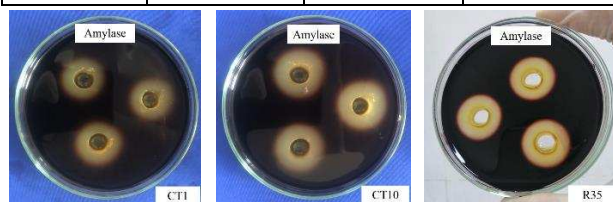
3.1. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có lợi trong chất thải

Để phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng ứng dụng vào xử lý chất thải hữu cơ thì yêu cầu các chủng có khả năng đồng hóa và sử dụng đa dạng các hợp chất hữu cơ có trong chất thải như tinh bột, cellulose, protein, ... [3]. Do đó, trước hết tiến hành tuyển chọn các chủng vi sinh vật có năng lực sinh tổng hợp đa enzyme.

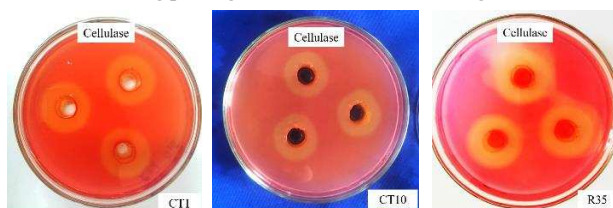
Từ mẫu rom rạ hoại mục đã phân lập được 54 chủng vi sinh vật (R1 - R54) và từ chất thải rắn sinh hoạt hữu cơ phân hủy đã phân lập được 23 chủng vi sinh vật (CT1 - CT23). Từ đó đã tuyển chọn được ba chủng CT1, CT10 và R35 có hoạt tính phân hủy chất hữu cơ mạnh. Kết quả được trình bày ở Bảng 2, Hình 1, Hình 2 và Hình 3.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase, cellulase và protease của các chủng vi sinh vật

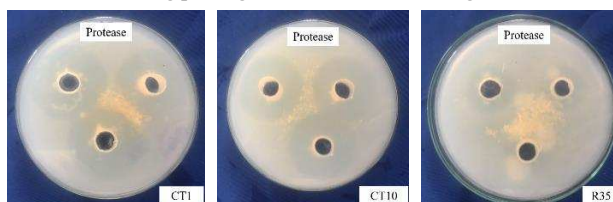
| Chủng vi sinh vật | Đường kính vòng phân giải trung bình ± độ lệch chuẩn (mm) | | |
|-------------------|---|--------------|--------------|
| | Tinh bột | CMC | Casein |
| CT1 | 9,66 ± 0,67 | 21,59 ± 0,50 | 21,35 ± 0,45 |
| CT10 | 16,53 ± 0,46 | 19,26 ± 0,42 | 23,79 ± 0,44 |
| R35 | 13,81 ± 0,49 | 22,13 ± 0,30 | 19,29 ± 0,15 |



Hình 1. Vòng phân giải tinh bột của các chủng vi sinh vật



Hình 2. Vòng phân giải CMC của các chủng vi sinh vật



Hình 3. Vòng phân giải casein của các chủng vi sinh vật

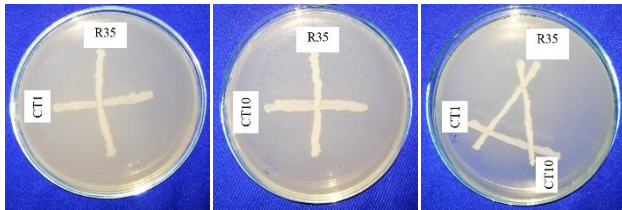
Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng vi sinh vật đều có hoạt tính amylase, cellulase và protease. Trong đó, cả ba chủng CT1, CT10 và R35 đều có hoạt tính cellulase và protease mạnh, với đường kính vòng phân giải lớn hơn 19 mm. Ngoài ra, chủng CT10 có hoạt tính sinh tổng hợp amylase mạnh nhất với đường kính vòng phân giải lớn hơn 16 mm. Theo Nguyễn Thị Thúy Nga và cộng sự [19], vi sinh vật có hoạt tính sinh tổng hợp enzyme khá khi có đường kính vòng phân giải từ 15 mm trở lên, và có hoạt tính mạnh khi có đường kính vòng phân giải từ 20 mm trở lên. Do đó, khi sử dụng các chủng này vào xử lý chất thải hữu cơ, chúng có khả năng phân giải mạnh các hợp chất hữu cơ giàu tinh bột, cellulose và protein.

3.2. Tính đối kháng giữa các chủng vi sinh vật được tuyển chọn

Để có thể khai thác phối hợp các chủng được tuyển chọn vào trong xử lý chất thải, thì điều kiện tiên quyết là các chủng này không được cạnh tranh đối kháng lẫn nhau. Các chủng vi sinh vật được cấy trên môi trường thạch - cao thịt - pepton để đánh giá tính đối kháng. Kết quả được thể hiện trên Hình 4.

Kết quả nghiên cứu cho thấy 3 chủng CT1, CT10 và R35 phát triển đồng đều trên cùng một môi trường, không xuất hiện các vùng đối kháng, điều này khẳng định các chủng vi sinh vật này có thể cùng tồn tại trong môi trường

xử lý để thực hiện chức năng chuyển hóa cơ chất và xử lý chất thải.



Hình 4. Thử nghiệm khả năng đối kháng của các chủng vi sinh vật được tuyển chọn

3.3. Định danh các chủng vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật được định danh bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

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

| Chủng vi sinh vật | Kết quả định danh | | |
|-------------------|-----------------------------------|---------------|---------------------|
| | Tên loài | Độ tương đồng | Hình ảnh nhuộm Gram |
| CT1 | <i>Bacillus velezensis</i> | 99,93% | |
| CT10 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 100% | |
| R35 | <i>Bacillus subtilis</i> | 100% | |

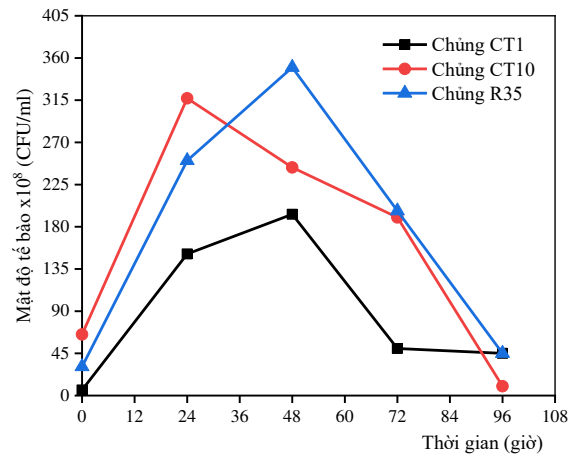
Như vậy, ba chủng tuyển chọn đều là vi khuẩn, thuộc giống *Bacillus*. Theo các nghiên cứu trước đây thì các chủng này đều không gây độc tố và an toàn [20, 21]. Do đó, ba chủng vi khuẩn *Bacillus* đã tuyển chọn đáp ứng được yêu cầu an toàn và hoàn toàn có thể ứng dụng được trong xử lý chất thải rắn hữu cơ để làm phân bón hữu cơ sinh học.

3.4. Khảo sát động thái sinh trưởng của các chủng vi khuẩn đã chọn

Khảo sát động thái sinh trưởng nhằm xác định thời điểm sinh trưởng và phát triển cực đại của các chủng vi khuẩn trong mỗi điều kiện thích hợp. Từ đó xác định được thời gian nhân giống thích hợp để thu nhận sinh khối đưa vào xử lý chất thải nhằm đảm bảo các tế bào vi khuẩn đang ở độ tuổi sinh lý ở thời gian sinh trưởng tốt nhất, có hoạt tính cao nhất giúp phân hủy nhanh các hợp chất hữu cơ trong chất thải. Động thái sinh trưởng của các chủng vi khuẩn được biểu diễn trên Hình 5.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, mật độ tế bào chủng CT10 đạt cao nhất sau 24 giờ nuôi cấy (317×10^8 CFU/ml) sau đó giảm dần. Mật độ tế bào các chủng CT1 và R35 đạt cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy (lần lượt là 193×10^8 CFU/ml và 350×10^8 CFU/ml) sau đó giảm dần.

Do vậy, khi nhân giống các chủng này để đưa vào xử lý chất thải nên kết thúc ở thời điểm 24 - 48 giờ.

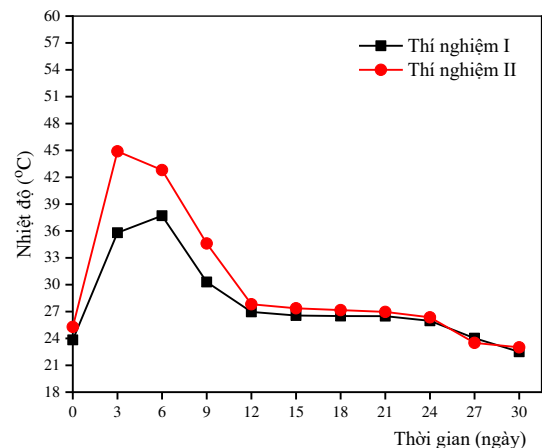


Hình 5. Động thái sinh trưởng của các chủng vi khuẩn trong điều kiện nuôi trên máy lắc theo thời gian

3.5. Nghiên cứu xử lý chất thải rắn hữu cơ làm phân bón hữu cơ sinh học từ các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn

- Sự thay đổi nhiệt độ trong quá trình ủ phân

Nhiệt độ là một yếu tố có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng, phát triển và phân hủy các chất hữu cơ của vi sinh vật trong quá trình ủ phân. Quá trình phân hủy các chất hữu cơ trong đồng ủ giải phóng ra nhiệt làm cho đồng ủ nóng lên. Quá trình phân hủy chất hữu cơ càng mạnh thì nhiệt độ càng tăng cao [22]. Sự thay đổi của nhiệt độ trong quá trình ủ phân được biểu diễn trên đồ thị Hình 6.



Hình 6. Sự thay đổi nhiệt độ theo thời gian

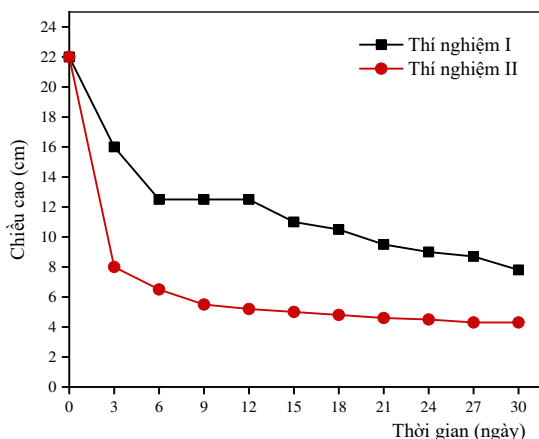
Có thể thấy rằng, trong thí nghiệm I không bổ sung vi khuẩn tuyển chọn, quá trình phân hủy chất hữu cơ diễn ra tự nhiên nhờ có các vi sinh vật có sẵn trong chất thải. Nhiệt độ tăng chậm và đạt cao nhất chỉ $37,7^\circ\text{C}$ sau 6 ngày ủ và giảm liên tục các ngày sau đó. Sau 30 ngày ủ phân, quá trình phân hủy các chất hữu cơ vẫn diễn ra.

Đối với thí nghiệm II có bổ sung vi khuẩn tuyển chọn, nhiệt độ khối ủ tăng nhanh và đạt cực đại vào ngày thứ 3 ở mức $44,9^\circ\text{C}$. Điều đó chứng tỏ các tác nhân vi sinh vật bổ sung vào khối ủ đã thúc đẩy quá trình phân hủy chất hữu cơ diễn ra nhanh hơn, mạnh hơn ngay từ những ngày đầu sau khi ủ dẫn đến nhiệt độ khối ủ tăng nhanh và cao hơn so với thí nghiệm I. Sự tăng nhiệt độ khối ủ có tác dụng tăng cường các phản ứng hoá học xảy ra trong quá trình ủ phân, kích thích hoạt động của chủng vi sinh vật ưa nhiệt. Sau đó, nhiệt

độ giảm xuống nhanh bởi vì hàm lượng dinh dưỡng đơn giản sẵn có dễ dàng phân hủy đã cạn dần, hoạt động của các chủng vi sinh vật giảm xuống, dẫn đến nhiệt độ khối ủ giảm xuống. Từ ngày thứ 27 đến ngày thứ 30 sau ủ, nhiệt độ khối ủ ở thí nghiệm II đã ổn định, chứng tỏ nguyên liệu hữu cơ đã ngừng chuyển hóa nên không giải phóng năng lượng. Như vậy, sau 26 ngày quá trình phân hủy đã dừng lại.

- Sự thay đổi chiều cao lớp nguyên liệu ủ

Sự thay đổi chiều cao lớp nguyên liệu trong 30 ngày ủ phân của các thí nghiệm I, II được thể hiện trong Hình 7.



Hình 7. Sự thay đổi chiều cao lớp nguyên liệu ủ theo thời gian

Quan sát thấy rằng chiều cao của các thí nghiệm giảm mạnh trong quá trình ủ phân. Mức giảm của thí nghiệm II lớn hơn so với thí nghiệm đối chứng I (từ ban đầu 22 cm giảm xuống đến 7,8 cm đối với thí nghiệm I và 4,3 cm đối với thí nghiệm II vào ngày ủ thứ 30).

Kết quả trong nghiên cứu đã cho thấy, việc ủ chất thải hữu cơ với bổ sung các chủng vi khuẩn tuyển chọn đã làm tăng sự phân hủy, chuyển hóa mạnh chất thải hữu cơ và do đó làm giảm chiều cao lớp nguyên liệu ủ lớn hơn so với mẫu ủ đối chứng. Sự giảm chiều cao lớp nguyên liệu ủ là kết quả của sự phân hủy mạnh chất hữu cơ trong chất thải do hoạt động của vi sinh vật hữu hiệu trong quá trình ủ phân cũng đã được một số nhà nghiên cứu chỉ ra trước đây [23, 24].

- Đánh giá độ chín của phân ủ

Độ chín là một chỉ tiêu quan trọng để xác định sản phẩm phân ủ đã hoại mục hoàn toàn hay chưa. Khi đánh giá độ chín, sử dụng nhiệt kế có mức đo nhiệt độ từ 0°C đến 100°C, cắm sâu vào trong mỗi thùng ủ chứa các mẫu thí nghiệm. Sau 15 phút, đọc nhiệt độ lần thứ nhất. Theo dõi sự thay đổi về nhiệt độ trong thời gian 3 ngày liên tiếp, mỗi ngày đo một lần vào một thời điểm nhất định. Phân hữu cơ sinh học bảo đảm độ chín khi nhiệt độ không thay đổi trong suốt thời gian theo dõi. Kết quả được tổng hợp trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định nhiệt độ trong các ngày ủ phân

| Nhiệt độ (°C) | Thời điểm đo | | |
|----------------------|--------------|-------------|-------------|
| | Ngày thứ 28 | Ngày thứ 29 | Ngày thứ 30 |
| I (Đối chứng) | 24,0 | 23,2 | 22,5 |
| II | 23,2 | 23,0 | 23,0 |

Kết quả cho thấy, nhiệt độ trong 3 ngày đánh giá liên tiếp của mẫu II đã ổn định, theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7185:2002) thì sản phẩm đã hoại mục và bảo đảm

độ chín. Tuy nhiên, đối với thí nghiệm đối chứng I thì nhiệt độ chưa ổn định, còn có sự chênh lệch giữa các lần đo đã cho thấy sản phẩm chưa hoại mục hoàn toàn.

- Tính chất cảm quan của phân ủ

Sau 30 ngày ủ phân, tính chất cảm quan của phân ủ đã được đánh giá. Kết quả được trình bày trong Bảng 5 và Hình 8.

Bảng 5. Tính chất cảm quan của phân ủ

| Chỉ tiêu đánh giá | I (Đối chứng) | II |
|---------------------------|---------------|-----------|
| Màu sắc | Nâu vàng | Nâu đen |
| Mùi | Hôi nhẹ | Không mùi |
| Thành phần cơ giới | Cứng | Mùn |



Thí nghiệm I

Thí nghiệm II

Hình 8. Màu sắc và kết cấu của sản phẩm phân ủ

Nhìn chung, tính chất cảm quan của nguyên liệu ủ đã có những thay đổi đáng kể so với lúc chưa ủ, đó là do sự chuyển hóa các hợp chất hữu cơ nhờ hoạt động sống của vi sinh vật và các phản ứng hóa lý xảy ra trong quá trình ủ. Đối với mẫu I không bổ sung giống vi sinh vật vẫn còn mùi hôi nhẹ và còn cứng. Đối với mẫu II có bổ sung giống vi khuẩn cho sản phẩm màu nâu đen, không mùi và mùn khi cầm lên.

- Đánh giá chất lượng sản phẩm phân hữu cơ sinh học sau khi ủ

Sản phẩm phân ủ được phân tích một số chỉ tiêu chất lượng. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Chất lượng sản phẩm phân hữu cơ sinh học

| Chỉ tiêu đánh giá | Trước khi ủ | Sau ủ 30 ngày | |
|--|-------------|---------------|-------|
| | | I (Đối chứng) | II |
| Các bon hữu cơ (%) | 39,74 | 29,49 | 24,36 |
| Nitơ tổng (%) | 0,19 | 0,09 | 0,13 |
| Phốt pho tổng (% P ₂ O ₅) | 0,04 | 0,06 | 0,08 |

Kết quả Bảng 6 cho thấy, hàm lượng OC ở cả hai công thức đối chứng I và thí nghiệm II đều giảm so với ban đầu, chứng tỏ ở cả hai công thức ủ đều diễn ra quá trình phân giải các hợp chất hydratcacbon. Tuy nhiên, hàm lượng OC chỉ giảm khoảng 25,8% ở công thức đối chứng nhưng lại giảm tới 38,7% ở công thức thí nghiệm. Sự khác biệt này chứng tỏ khi xử lý chất thải bằng vi khuẩn tuyển chọn, quá trình phân giải tinh bột, cellulose diễn ra mạnh hơn nên đã dẫn đến hàm lượng OC ở công thức thí nghiệm giảm nhiều hơn so với đối chứng. Hơn nữa, OC thấp được xem là một chỉ số về độ chín và độ ổn định của sản phẩm phân ủ [25].

Hàm lượng nitơ tổng ở cả hai công thức ủ đều giảm so với ban đầu. Điều đó là do vi sinh vật trong khối ủ đã sử dụng các chất dinh dưỡng nitơ có sẵn trong nguyên liệu ủ để sinh trưởng và phát triển nên làm giảm hàm lượng chất này. Ở công thức đối chứng, nitơ giảm từ 0,19% xuống

0,09%. Trong công thức thí nghiệm, nitơ giảm từ 0,19% xuống 0,13%. Mức giảm nitơ ở công thức thí nghiệm thấp hơn so với đối chứng. Như vậy bổ sung vi khuẩn vào ủ chất thải đã giúp làm tăng quá trình chuyển hoá các chất hữu cơ và giảm lượng nitơ thất thoát. Kết quả cũng cho thấy, hàm lượng phốt pho tổng ở cả hai công thức ủ đều tăng lên so với ban đầu và ở công thức thí nghiệm cao hơn so với công thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Điều này chứng tỏ khi ủ chất thải có bổ sung vi khuẩn tuyển chọn đã giúp cho quá trình khoáng hóa diễn ra thuận lợi hơn.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập, tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn trong các mẫu rơm rạ hoại mục tự nhiên và chất thải rắn sinh hoạt hữu cơ đã phân hủy có hoạt tính enzyme amylase, cellulase và protease cao để ứng dụng vào xử lý chất thải rắn hữu cơ làm phân bón hữu cơ sinh học. Các chủng này đã không thể hiện đặc tính đối kháng lẫn nhau. Kết quả định danh đã xác định được CT1 là *Bacillus velezensis*, CT10 là *Bacillus amyloliquefaciens* và R35 là *Bacillus subtilis*.

Xử lý chất thải rắn hữu cơ với các chủng vi khuẩn tuyển chọn cho thấy, khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ của chúng rất tốt. Mức giảm chiều cao lớp nguyên liệu ủ của thí nghiệm có bổ sung giống vi khuẩn tuyển chọn lớn hơn so với thí nghiệm đối chứng, hàm lượng OC giảm so với ban đầu ở công thức đối chứng (25,8%) thấp hơn so với công thức thí nghiệm (38,7%), hàm lượng chất dinh dưỡng nitơ, phốt pho ở công thức thí nghiệm cao hơn so với công thức đối chứng. Sản phẩm sau 30 ngày ủ với vi khuẩn tuyển chọn đã đạt độ chín theo tiêu chuẩn quy định, có màu nâu đen, không mùi và mùn và có thể sử dụng như một loại phân bón hữu cơ sinh học.

Lời cảm ơn: Bài báo này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng với đề tài có mã số: T2021-02-36.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Tài nguyên và Môi trường, *Báo cáo Hiện trạng môi trường quốc gia giai đoạn 2016 - 2020*, Nhà xuất bản Dân Trí, Hà Nội, 2021.
- [2] Nguyễn Xuân Thành, Vũ Thị Hoàn, Lê Thị Hồng Xuân, Nguyễn Thị Minh, Trần Văn Chiến, Đinh Hồng Duyên, Phân lập tuyển chọn giống vi sinh vật và xây dựng quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật bón cho cây trồng, *Báo cáo đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ*, B2006-11-23, 2007.
- [3] Hà Thanh Toàn, Mai Thu Thảo, Nguyễn Thu Phương, Trần Lê Kim Ngân, Bùi Thế Vinh, Cao Ngọc Diệp, “Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose, tinh bột và protein trong nước ri từ bãi rác ở thành phố Cần Thơ”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Tập 10, 2008, 195-202.
- [4] Đinh Hồng Duyên, Nguyễn Thế Bình, Vũ Thanh Hải, “Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy phế phụ phẩm sau thu hoạch quả vải”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Tập 53, 2017, 61-70.
- [5] Guo Y., Zhu N., Zhu S., Deng C., “Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts”, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2007, 1344-1354.
- [6] Vrints M., Bertrand S., Collend J M., “A bacterial population study of commercialized wastewater inoculants”, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2007, 2006-2015.
- [7] Lu W.J., Wang H.T., Yang S. J., Wang Z.C., Nie Y.F., “Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system”, *Journal of General and Applied Microbiology*, 51(6), 2006, 353-360.
- [8] Lo Y.C., Saratale G.D., Chen W.M., Bai M.D., Chang J.S., “Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production”, *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6-7), 2009, 417-425.
- [9] Yang L.L., Zhang Z., Wu M., Feng J.F., “Isolation, screening and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of china and optimization of cellulose production by *Paenibacillus terrae* ME27-1”, *BioMed Research International*, 2014, 2014, 1-14.
- [10] Nguyễn Lâm Dũng (chủ biên), Phạm Thị Trân Châu, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật tập 1, tập 2, tập 3*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1978.
- [11] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013), *Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa*, Hà Nội, 2015.
- [12] Jmeii L., Soufi L., Abid, N., Mahjoubi M., Roussos S., Ouzari H.I., Cherif A., Gama H., “Assessment of biotechnological potentials of strains isolated from represso olive pomace in Tunisia”, *Annals of Microbiology*, 69, 2019, 1177-1190.
- [13] Lê Thị Hải Yến, Nguyễn Đức Hiền, “Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Tập 2, 2016, 26-32.
- [14] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 9297:2012, *Phân bón - Phương pháp xác định độ ẩm*, Hà Nội, 2012.
- [15] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 7185:2002, *Phân hữu cơ vi sinh vật*, Hà Nội, 2002.
- [16] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 9294:2012, *Phân bón - Xác định carbon tổng số bằng phương pháp Walkley -Black*, Hà Nội, 2012.
- [17] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 8557:2010, *Phân bón - Phương pháp xác định nitơ tổng số*, Hà Nội, 2010.
- [18] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 8559:2010, *Phân bón - Phương pháp xác định phốt pho hữu hiệu*, Hà Nội, 2010.
- [19] Nguyễn Thị Thuý Nga, Phạm Quang Nam, Lê Xuân Phúc, Phạm Quang Thu, Nguyễn Minh Chí, “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn phân giải xenlulo sản xuất phân hữu cơ sinh học”, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 2, 2015, 3841-3850.
- [20] Algburi A., Volski A., Cugini C., Walsh E., Chistyakov V., Mazanko M., Bren A., Dicks L., Chikindas M., “Safety Properties and Probiotic Potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895”, *Advances in Microbiology*, 6(6), 2016, 432-452.
- [21] Butkhot N., Soodsawaeng P., Vuthiphanchai V., Nimrat S., “Characterisation and biosafety evaluation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus velezensis* BUU004”, *International Food Research Journal*, 26(5), 2019, 1617-1625.
- [22] Tognetti C., Mazzarino M.J., Laos, F., “Improving the quality of municipal organic waste compost”, *Bioresource Technology*, 98(5), 2007, 1067-1076.
- [23] Yue B., Chen T., Gao D., Zheng G., Liu B., Lee D., “Pile settlement and volume reduction measurement during forced-aeration static composting”, *Bioresource Technology*, 99(16), 2008, 7450-7457.
- [24] Petric I., Avdihodžić E., Ibrić N., “Numerical simulation of composting process for mixture of organic fraction of municipal solid waste and poultry manure”, *Ecological Engineering*, 75(2), 2015, 242-249.
- [25] Inbar Y., Hadar Y., Chen Y., “Recycling of cattle manure: the composting process and characterization of maturity”, *Journal of Environmental Quality*, 22(4), 1993, 857-863.