

TUYỂN CHỌN TỔ HỢP VI SINH VẬT SINH ENZYME CELLULASE CAO TỪ KHỐI Ủ RƠM RẠ

Nguyễn Thị Kim Ngoan*, Đinh Thị Kim Nhung

Tóm tắt: Việc xử lý rơm rạ sau thu hoạch làm phân hữu cơ vi sinh là một trong những giải pháp tối ưu hiện nay vì vừa giảm thiểu thải chất thải, vừa tận dụng làm nguồn phân bón cho cây trồng. Những phản ứng xảy ra trong quá trình chuyển hóa rơm rạ thành phân hữu cơ vi sinh là những phản ứng sinh hóa có tác động bởi enzyme do vi sinh vật tiết ra. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phân lập được 97 chủng vi sinh vật trong đó có: 57 chủng vi khuẩn, 29 chủng xạ khuẩn, 11 chủng nấm mốc; tuyển chọn được 3 chủng: vi khuẩn V_2 , xạ khuẩn X_2 và nấm N_2 có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao, có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất, không có tính đối kháng nhau. Tổ hợp vi sinh vật này sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase tốt với nguồn cacbon là tinh bột, nguồn nitơ là peptone, nhiệt độ tối ưu là 45 °C, thời gian nuôi cấy là 96 giờ.

Từ khóa: Cellulase, cellulose, phân hữu cơ, rơm rạ, vi sinh vật.

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, vấn đề môi trường đang được hầu hết các quốc gia trên thế giới quan tâm và đặc biệt chú trọng. Một trong những nguồn thải gây ô nhiễm môi trường là các chất thải khó phân hủy trong môi trường tự nhiên mà một phần không nhỏ trong đó là các phế phụ phẩm nông nghiệp. Mỗi năm nước ta có khoảng 80 triệu tấn phụ phẩm các loại và chúng chưa được sử dụng một cách hợp lý. Các phụ phẩm nông nghiệp như rơm rạ, thân lá ngô,... sau thu hoạch trước đây thường được bà con nông dân tận dụng làm thức ăn cho gia súc hoặc làm chất đốt. Song, trong những năm gần đây, do đời sống kinh tế phát triển nên những chất thải nông nghiệp ít được sử dụng mà thường được nông dân vứt bừa bãi hoặc đốt bỏ ngay trên đồng ruộng, đường làng, ngõ xóm (tapchimoitruong.vn). Một trong số những giải pháp hữu hiệu để xử lý nguồn phế phụ phẩm nông nghiệp này là ủ rơm rạ thành mùn hữu cơ. Giải pháp này giúp bà con nông dân không những tiết kiệm chi phí mua phân bón, mà còn làm tăng hàm lượng mùn cho đất, mùn hữu cơ có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của cây (Cayuela et al., 2009). Trên thị trường quốc tế hiện nay, các chế phẩm vi sinh vật có thể sử dụng trong xử lý phế thải nông nghiệp thành phân bón hữu cơ đã được thương mại hóa chủ yếu là của Nhật Bản (EM, Bokashi), Đài Loan (Organoc), Malaixia (Bikashi M), Ấn Độ (Hokaru), Trung Quốc (Nhật Thiên Hòa, Điền Bảo,...)... Ở Việt Nam các chế phẩm vi sinh cũng mới chỉ được áp dụng xử lý rác thải sinh hoạt, chưa được áp dụng nhiều trong việc xử lý chất thải nông nghiệp cũng như đưa ra mô hình xử lý phù hợp cho các loại chất thải nông nghiệp. Do đó việc tuyển chọn tổ hợp vi sinh vật sinh enzyme thủy phân có khả năng chuyển hóa rơm rạ thành mùn hữu cơ có ý nghĩa cần thiết và quan trọng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Vi sinh vật có khả năng chuyển hóa rơm rạ thành mùn hữu cơ được phân lập từ các khối ủ rơm rạ.

Rơm rạ được thu tại thị trấn Quang Hà, Bình Xuyên, Vĩnh Phúc sau khi thu hoạch.

Môi trường phân lập xạ khuẩn (Gause I) (g): Tinh bột tan: 20; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,5; thạch agar: 20; NaCl: 0,5; KH_2PO_4 : 0,5; KNO_3 : 1; $FeSO_4$: 0,01; nước: 1000 mL.

Môi trường phân lập nấm mốc (Czapek Dox) (g): Saccarose: 30; KH_2PO_4 : 1,5; KCl: 0,5; $NaNO_3$: 3,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,5; $FeSO_4$: 0,1; thạch agar: 20; nước: 1000 mL.

Môi trường phân lập vi khuẩn (MPA) (g): Cao thịt: 5; peptone: 5; NaCl: 5; thạch agar: 20; nước: 1000 mL (Kausar et al., 2013).

Môi trường thử hoạt tính enzyme ngoại bào:

Môi trường bột giấy có thành phần như sau (g): Bột giấy: 5; thạch: 20; nước: 1000 mL.

Môi trường CMC (Cacboxyl Methyl Cellulose) (g): CMC: 5; thạch: 20; nước: 1000 mL.

Môi trường RBBR (Remazol Brilliant Blue R) (g): RBBR: 0,4; thạch: 20; nước: 1000 mL.

Môi trường Xylan (g): Xylan: 10; thạch agar: 20; nước: 1000 mL.

Thuốc thử hoạt tính enzyme ngoại bào:

Lugol I: Tinh thể iot: 7 g; KI: 20 g; nước cất: 300 mL.

Congo đỏ 0,1%.

2.2. Phương pháp

Phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật tham gia chuyển hóa rơm rạ thành mùn hữu cơ

Lấy mẫu ngẫu nhiên ở những khu vực có độ mùn tốt. Làm giàu khu hệ vi sinh vật trực tiếp trên các cơ chất rơm, rạ có bổ sung nguồn nitơ vô cơ thích hợp ammonium nitrate với hàm lượng 255 g/10 kg rơm khô (Nakasaka K. & Marui T, 2011). Lấy mẫu rơm rạ ở các khối ủ, nghiền nhỏ mẫu và pha loãng mẫu bằng nước muối sinh lý vô trùng theo phương pháp pha loãng tít hạn, hút 0,1 mL dịch pha loãng ở nồng độ nghiên cứu (10^{-7} , 10^{-8}) vào môi trường thạch trên đĩa Petri (môi trường MPA, Czapek Dox và Gause I). Giữ các đĩa Petri đã phân lập trong tủ ấm 30-37 °C trong vòng 7 ngày để đếm số lượng vi sinh vật sống và tách các khuẩn lạc vi sinh vật, cấy rìa nhiều lần để thu được khuẩn lạc thuần trước khi cấy khuẩn lạc vào môi trường giữ giống thích hợp (Onwosi et al., 2017). Tiến hành phân lập vi sinh vật ở từng khối ủ trong những thời điểm nhất định, trong 4 tuần tiến hành phân lập 2 đợt, định kỳ 2 tuần 1 lần.

Tuyển chọn các chủng vi sinh vật có hoạt tính enzyme ngoại bào bằng cách khuếch tán enzyme ngoại bào trên môi trường thạch chứa cơ chất. Sau đó dùng thuốc thử để kiểm tra sự phân giải cơ chất trong môi trường thạch. Nhỏ 0,1 mL dung dịch NaCl 0,9% vào đĩa

thạch chứa môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Lấy sinh khối vi sinh vật nghiên cứu hòa vào giọt nước trong đĩa thạch, trang đều trên bề mặt thạch đến khi khô dịch. Đặt các đĩa Petri trong tủ ẩm ở 30 °C cho đến khi vi sinh vật mọc kín đĩa thạch. Chuẩn bị môi trường thử hoạt tính (môi trường chứa cơ chất) trong các đĩa Petri với độ dày 3 mm. Dùng khoan nút chai ($d = 10$ mm) khoan các khối thạch có vi sinh vật trên môi trường nuôi cấy và đặt lên môi trường thử hoạt tính. Đặt các đĩa Petri ở 4 °C trong 24 giờ, sau đó đưa chúng sang tủ ẩm 30 °C để 24 giờ. Kiểm tra hoạt tính của các vi sinh vật thông qua sự phân giải cơ chất trên môi trường thử hoạt tính (Mai Thị Hằng và nnk. 2011).

Môi trường chứa RBBR: Quan sát trực tiếp vòng phân giải, nếu có hoạt tính phân giải RBBR, quanh khối thạch có vòng trong suốt, màu sáng hơn vùng xung quanh. Môi trường chứa CMC hoặc bột giấy: Nhuộm dung dịch Congo đỏ trong 5 phút, đổ bỏ dung dịch thuốc thử và rửa bằng dung dịch NaCl 1M trong 15 phút/ lần (rửa khoảng 2-3 lần đến khi thấy rõ vòng phân giải cơ chất). Vòng phân giải cơ chất có màu vàng nhạt hoặc trong suốt ở quanh khối thạch. Môi trường chứa xylan: Nhuộm lugol trong 5-10 phút, đổ bỏ dung dịch thuốc nhuộm và quan sát vòng phân giải cơ chất màu sáng trong suốt quanh khối thạch. Hoạt tính phân giải cellulose, hemicellulose, lignin được xác định bằng kích thước vòng phân giải ($D - d$), tính bằng mm, D là đường kính vòng phân giải, d là đường kính khối thạch (Mai Thị Hằng và nnk. 2011).

Xác định tính đối kháng của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Sử dụng phương pháp cấy chữ thập và phương pháp đặt khối thạch (Mai Thị Hằng và nnk. 2011). Đối với vi khuẩn: cấy sao cho đường cấy xuất hiện giao điểm giữa các chủng, tạo thành hình chữ thập trên môi trường thạch đĩa MPA. Ủ ở 37 °C trong 48 giờ cho đến khi các vạch cấy vi khuẩn mọc rõ. Các chủng không đối kháng nhau khi tại giao điểm không có vùng vô khuẩn. Đối với vi nấm hoặc xạ khuẩn: nuôi cấy trên môi trường thạch thích hợp trong đĩa Petri. Dùng khoan nút chai đường kính 10 mm khoan thạch đã mọc vi sinh vật nghiên cứu, đặt lên môi trường nuôi cấy đã trải vi sinh vật nghiên cứu thứ 2, các khối thạch cách nhau 1 cm. Ủ đĩa petri ở 37 °C trong 72 giờ và quan sát. Nếu không có vùng vô khuẩn xung quanh khối thạch thì các chủng vi sinh vật nghiên cứu không đối kháng nhau.

Xác định điều kiện, môi trường dinh dưỡng tối ưu cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Nguồn cacbon (hoặc nitơ): Các chủng vi sinh vật nuôi trong môi trường thích hợp được thay thế bằng các nguồn cacbon (hoặc nitơ) khác: Tinh bột, glucose, saccharose, lactose (hoặc $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , peptone, bột đậu tương) với hàm lượng tương ứng với lượng cacbon (hoặc nitơ) cho vào môi trường cơ bản, nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37 °C. Sau 96 giờ xác định số lượng tế bào bằng phương pháp pha loãng tối hạn và xác định enzyme cellulase bằng vòng phân giải cơ chất.

Nhiệt độ: Các chủng vi sinh vật tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường dịch thể, ở 30 °C, 45 °C, 55 °C, 60 °C, nuôi lắc ở 200 vòng/phút sau thời gian 96 giờ lấy ra xác định số lượng tế bào của các chủng bằng phương pháp pha loãng tối hạn và xác định enzyme cellulase bằng vòng phân giải cơ chất.

Thời gian: Các chủng vi sinh vật tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường không có agar, ở 37 °C, nuôi lắc ở 200 vòng/phút sau thời gian: 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 120 giờ lấy ra xác định số lượng tế bào của các chủng bằng phương pháp pha loãng tới hạn và xác định enzyme cellulase bằng vòng phân giải cơ chất.

Thống kê toán học và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các số liệu thu được được xử lý giá trị trung bình, phương sai,... bằng phần mềm Microsoft Office Excel.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng chuyển hóa rơm rạ thành mùn hữu cơ

Từ hai khối ủ tạo nguồn U₁ và U₂, sau 2 đợt phân lập thu được 97 chủng vi sinh vật bao gồm: vi khuẩn 57 chủng, xạ khuẩn 29 chủng, nấm mốc 11 chủng. Trong số đó, có 25 chủng phân lập có hoạt tính phân giải lignin, cellulose và hemicellulose, bao gồm 12 chủng vi khuẩn, 8 chủng nấm mốc, 5 chủng xạ khuẩn. Từ 25 chủng này, chúng tôi tuyển chọn được 3 chủng vi sinh vật có hoạt tính enzyme ngoại bào mạnh nhất (căn cứ vào đường kính vòng phân giải).

Bảng 1. Hoạt tính enzyme ngoại bào của 3 chủng vi sinh vật tuyển chọn

Kí hiệu chủng	Nguồn gốc khối ủ	Khả năng phân giải cơ chất (D-d mm)			
		Cellulose		Hemicellulose	Lignin
		CMC	BG	Xylan	RBBR
V ₂	U ₁	28 ± 0,12	26 ± 0,23	18 ± 0,00	8,5 ± 0,06
X ₂	U ₂	29 ± 0,18	27,5 ± 0,33	19 ± 0,35	10 ± 0,09
N ₂	U ₂	35 ± 0,15	32,5 ± 0,42	23 ± 0,33	12 ± 0,21

Quan sát khuẩn lạc và nghiên cứu về hình thái hiển vi, tế bào chúng tôi thu được kết quả như sau:

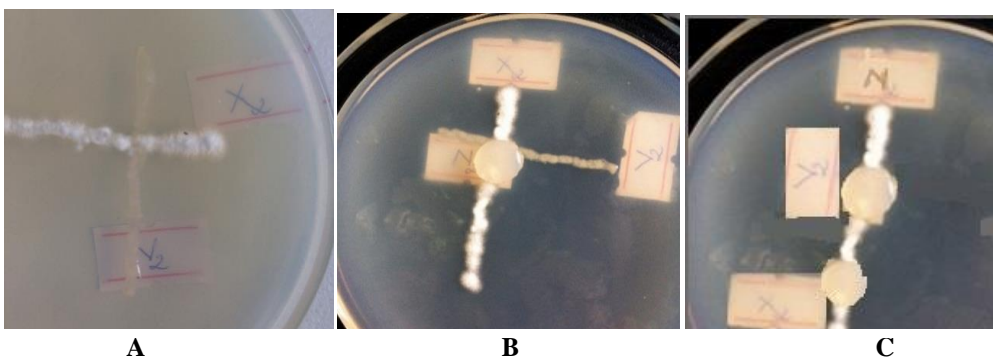
Bảng 2. Một số đặc điểm hình thái của 3 chủng vi sinh vật tuyển chọn

Đặc điểm	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái hiển vi
V ₂	- Hình dạng: bề mặt khuẩn lạc dẹt, nhão, mép khuẩn lạc tạo thành các tia ra xung quanh. - Đường kính: 3 - 3,5 mm.	- Hình thái: que dài, sinh nội bào tử hình bầu dục. - Nhuộm G ⁺ .
X ₂	- Hình dạng: Tròn. - Đường kính: 3 - 4 mm. - Màu sắc: Trắng.	- Hình dạng sợi cơ chất: dài, mảnh, phân nhánh nhiều lần. - Hình dạng sợi khí sinh và cuống sinh bào tử: sợi khí sinh không có vách ngăn, cuống sinh bào tử dạng xoắn. - Bào tử: Trắng.
N ₂	- Hình dạng: tròn đồng tâm, có dạng sợi dài, tơ mỏng, lan rộng. - Đường kính: 4 - 4,5 mm. - Màu sắc: trắng đục.	- Hình dạng: sợi dài, có vách ngăn, cuống sinh bào tử hình chùy, bào tử đính trên thể bình (bậc 2), phân thành các nhánh.

Căn cứ vào Bảng 2 chúng tôi xác định sơ bộ 3 chủng lựa chọn là chủng vi khuẩn V_2 , xạ khuẩn X_2 , nấm N_2 có khả năng phân giải cellulose mạnh.

3.2. Tính đối kháng của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Kết quả kiểm tra tính đối kháng của 3 chủng đã tuyển chọn trên môi trường cơ sở cho thấy: V_2 và X_2 không đối kháng nhau vì không có vòng vô khuẩn nào ở điểm cấy giao nhau giữa hai chủng (Hình 1A), N_2 cũng không đối kháng với hai chủng V_2 và X_2 vì không có vòng vô khuẩn xung quanh khối thạch, nơi giao với đường cấy của hai chủng V_2 và X_2 (Hình 1B), V_2 và X_2 cũng không đối kháng với N_2 vì không có vòng vô khuẩn xung quanh khối thạch (Hình 1C). Như vậy 3 chủng vi sinh vật tuyển chọn không đối kháng nhau. Vì vậy có thể sử dụng cả 3 chủng trong cùng khối ủ.



Hình 1. Kết quả kiểm tra tính đối kháng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

3.3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng lên sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

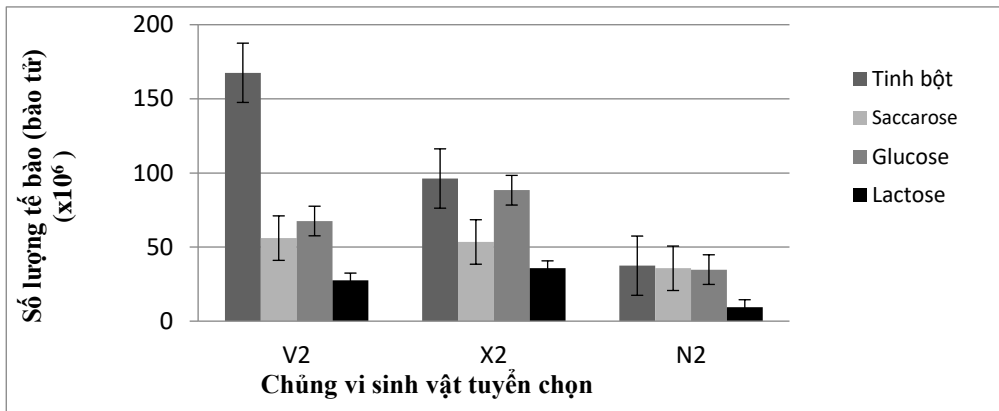
3.3.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Cacbon là nguồn dinh dưỡng quan trọng của vi sinh vật, giúp tế bào sản sinh ra năng lượng, tạo thành những tiền chất, tạo ra quá trình oxy hóa - khử để biến đổi những tiền chất thành những sản phẩm trung gian hoặc sản phẩm cuối cùng để xây dựng tế bào, đồng thời tích tụ trong môi trường một hoặc vài sản phẩm sinh tổng hợp. Ảnh hưởng của nguồn cacbon lên sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn được thể hiện ở Hình 2 và Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn cacbon lên sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Chủng vi sinh vật	Hoạt tính enzyme (D-d mm) sau 96 giờ ở 37 °C			
	Tinh bột	Saccarose	Glucose	Lactose
V_2	$26,5 \pm 0,33$	$19 \pm 0,23$	$25 \pm 0,18$	$10 \pm 0,18$
X_2	$28 \pm 0,18$	$27 \pm 0,18$	$18 \pm 0,33$	$9 \pm 0,00$
N_2	$30,5 \pm 0,23$	$23,5 \pm 0,33$	$29 \pm 0,33$	$8 \pm 0,093$

Hình 2 và Bảng 3 cho thấy tinh bột là nguồn cacbon thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase các chủng vi khuẩn V_2 , xạ khuẩn X_2 , nấm N_2 . Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả: Tinh bột thích hợp cho *Trichoderma reesei* tổng hợp cellulase với hiệu suất cao (Chen & Wayman, 1992), cũng phù hợp với *Bacillus subtilis* (Das et al., 2010).

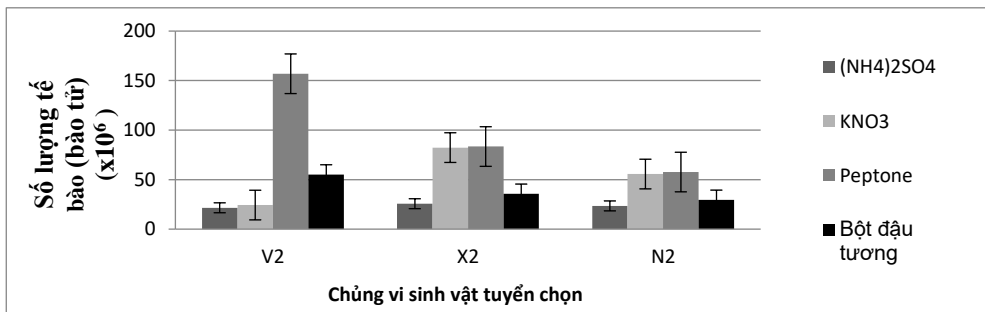


Hình 2. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng của nguồn cacbon lên sinh trưởng của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

3.3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Nitơ cung cấp cho cơ thể vi sinh vật nguyên liệu để hình thành các nhóm amin trong các phân tử axit amin, nucleotit, các bazơ dị vòng và các hợp chất hóa học trong nguyên sinh chất giúp cho vi sinh vật sinh trưởng. Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn được thể hiện ở Hình 3 và Bảng 4.

Hình 3 và Bảng 4 cho thấy peptone là nguồn nitơ thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của các chủng vi khuẩn V₂, xạ khuẩn X₂, nấm N₂. Kết quả này phù hợp với kết quả của Das et al., (2010): trong môi trường có chứa peptone, hàm lượng cellulase được sản xuất tối đa đối với vi khuẩn *Bacillus* sp.



Hình 3. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng của nguồn nitơ lên sinh trưởng của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

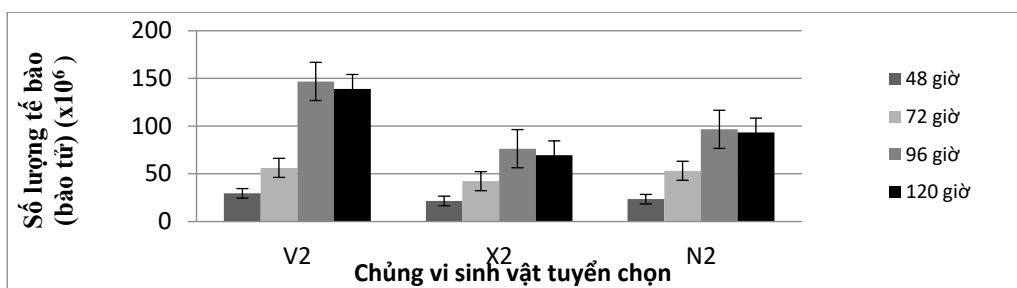
Bảng 4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Chủng vi sinh vật	Hoạt tính enzyme (D-d mm) sau 96 giờ ở 37 °C			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	Peptone	Bột đậu tương
V2	10 ± 0,09	20 ± 0,23	27,5 ± 0,33	18 ± 0,18
X2	8 ± 0,00	18 ± 0,18	29 ± 0,23	29 ± 0,18
N2	9 ± 0,06	30 ± 0,33	31 ± 0,33	24 ± 0,23

Như vậy, chúng tôi quyết định lựa chọn nguồn cacbon là tinh bột, nguồn nitơ là peptone để nhân sinh khối các vi sinh vật tuyển chọn.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian lên sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Thời gian nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase. Số lượng tế bào (bào tử) của vi sinh vật thay đổi theo từng giai đoạn sinh trưởng của vi sinh vật (Hình 4) và sinh tổng hợp cellulase của vi sinh vật tuyển chọn cũng thay đổi theo thời gian (Bảng 5).



Hình 4. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng của thời gian lên sinh trưởng của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian lên sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Chủng vi sinh vật	Hoạt tính enzyme (D-d mm) ở 37 °C			
	48 giờ	72 giờ	96 giờ	120 giờ
V ₂	11 ± 0,00	22 ± 0,33	27 ± 0,18	27 ± 0,23
X ₂	10 ± 0,12	18 ± 0,18	28,5 ± 0,33	28 ± 0,33
N ₂	13 ± 0,18	24 ± 0,18	30 ± 0,33	30 ± 0,33

Hình 4 và Bảng 5 cho thấy sinh khối và lượng cellulase nhiều nhất tại thời điểm 96 giờ nuôi cấy. Như vậy sinh tổng hợp enzyme cellulase của 3 chủng tuyển chọn đều diễn ra vào giai đoạn sinh trưởng cấp số hoặc cân bằng động (trước 96 giờ), không diễn ra vào giai đoạn suy vong, điều này phù hợp với lý thuyết về việc sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học sơ cấp (như enzyme ngoại bào) của hầu hết các vi sinh vật. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Das et al., (2010): khả năng tổng hợp enzyme cellulase của vi khuẩn *Bacillus* sp. cao nhất ở thời điểm 4 ngày nuôi cấy.

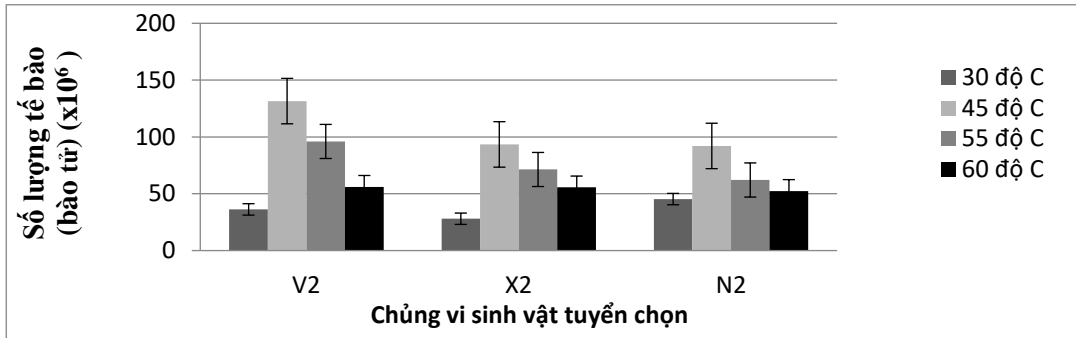
3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển và sinh tổng hợp enzyme cellulase. Khả năng hoạt động của các chủng vi sinh vật thay đổi theo sự biến thiên của nhiệt độ. Trong giới hạn nhiệt độ sinh trưởng của một vi sinh vật, nhiệt độ tăng cao thì tốc độ các quá trình này cũng tăng theo. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn được thể hiện ở Hình 5 và Bảng 6.

Hình 5 cho thấy: ở điều kiện nhiệt độ 30 °C các phản ứng xúc tác nhờ enzyme diễn ra chậm chạp khiến vi sinh vật sinh trưởng chậm, khả năng tổng hợp cellulase không cao. Khi nhiệt độ tăng lên (45 °C) sẽ làm tăng tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật, vì phản ứng xúc tác nhờ enzyme cũng giống như các phản ứng hóa học nói chung, khi nhiệt độ tăng tốc độ phản ứng được thúc đẩy mạnh hơn, toàn bộ hoạt động trao đổi chất tăng lên, vi sinh

vi sinh trưởng nhanh và hoạt tính cellulase cao. Đến một mức nhất định, nhiệt độ càng tăng vi sinh vật sinh trưởng càng kém do hệ enzyme bị thay đổi hoạt tính bởi nhiệt (55 °C - 60 °C). Như vậy 3 chủng tuyển chọn vừa sinh trưởng tốt ở 45 °C vừa sinh tổng hợp enzyme cellulase cao ở nhiệt độ này nên chúng thuộc vi sinh vật ưa nhiệt.

Nhiệt độ tối ưu cho khả năng sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn là 45 °C.



Hình 5. Biểu đồ biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ lên sinh trưởng của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sinh tổng hợp cellulase của tổ hợp vi sinh vật tuyển chọn

Chủng vi sinh vật	Hoạt tính enzyme (D-d mm)			
	30 °C	45 °C	55 °C	60 °C
V ₂	10 ± 0,00	27 ± 0,29	23 ± 0,33	13 ± 0,18
X ₂	11 ± 0,06	26 ± 0,23	21 ± 0,29	11 ± 0,12
N ₂	16 ± 0,18	28 ± 0,33	24 ± 0,33	16 ± 0,23

KẾT LUẬN

Từ các khối ủ rơm rạ làm giàu vi sinh vật 97 chủng vi sinh vật đã được phân lập, trong đó có 57 chủng vi khuẩn, 29 chủng xạ khuẩn, 11 chủng nấm mốc. Chủng vi khuẩn V₂, xạ khuẩn X₂, nấm N₂ có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao, không có tính đối kháng nhau đã được tuyển chọn. Môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của 3 chủng tuyển chọn là nguồn cacbon tinh bột, nguồn nitơ peptone, nhiệt độ tối ưu 45 °C, thời gian nuôi cấy 96 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Das A., Bhattacharya S., Murali L., 2010. Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolated from cow dung, American - Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 8(6): 685-691.
- Cayuela M. L., Mondini C., Insam H., Sinicco T., Franke-Whittle I., 2009. Plant and animal wastes composting: Effects of the N source on process performance, Bioresources, Technology. 100(12), 3097-3106.
- Kausar H., Ismail M. R., Saud H. M., Othman & Habib S., 2013. Use of lignocellulolytic microbial consortium and pH amendment on composting efficacy of rice straw, Compost Science & Utilization. 21, 121-133.

Onwosi C. O., Igbokwe V. C., Odimba J. N., Ifeanyichukwu E. E., Nwankwoala M. O., Iroh I. N., Ezeogu L. I., 2017. Composting technology in waste stabilization: on the methods, challenges and future prospects, *Journal Environmental Management*. 190, 140 -157.

<http://tapchimoitruong.vn/pages/article.aspx?>

Mai Thị Hằng, Đinh Thị Kim Nhung, Vương Trọng Hòa, 2011. Thực hành vi sinh vật, Nxb. Đại học Sư phạm Hà Nội, 143 trang.

Nakasaka K. and Marui T., 2011. Progress of organic matter degradation and maturity of compost produced in a large-scale composting facility, *Waste Management & Research*, 31 (3), 495-501.

Chen S. and Wayman M., 1992. Novel inducers derived from starch for cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Process Biochemistry*, 27 (6), 327-334.

SCREENING MICROORGANISMS PRODUCING CELLULASE FROM RICE STRAW COMPOSTING

Nguyen Thi Kim Ngoan*, Đinh Thị Kim Nhung

Abstract: Composting rice straw after harvest into organic fertilizer is one of the current optimal solutions because it both minimizes waste discharge and makes use of fertilizer for plants. The reactions that occur in the conversion of rice straw into compost are biochemical reactions that are triggered by extracellular enzymes produced by microorganisms. In this study, we have isolated 97 microbial strains including 57 bacteria, 29 actinomyces and 11 fungi. There are 3 strains: V_2 , X_2 and N_2 producing high extracellular enzyme, capable of degrading cellulose, non-antagonistic to each other, having been chosen for further studies. This microbial complex grew and synthesized cellulase well using carbohydrates as starch, nitrogen source as peptone, the optimal temperature for growth and cellulase synthesis was 45 °C, cultivation time was 96 hours.

Keywords: Cellulase, cellulose, compost, microorganisms, rice straw.