

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC SỬ DỤNG TRONG XỬ LÝ VỎ QUẢ CÀ PHÊ LÀM PHÂN BÓN CHO CÂY TRỒNG

Đào Thị Lan Hoa¹, Nguyễn Thị Thiên Trang¹ và CS.*

SUMMARY

Study on production of bio - products used in decomposition of coffee husk as biofertiliser for crop supply

Coffee husk is the abundant agricultural bio - product in coffee growing area in Central Highlands. The bio - products consist of the isolates of streptomyces, bacteria and fungi that were isolated, selected and studied on decomposing ability of coffee husks as biofertilizer for crop supply. A set of isolates of streptomyces, bacteria and fungi was isolated and selected in Daklak with high cellulase enzyme activity, temperature tolerance and high adaptation with wide range of pH. A set of variety were identified as six *Streptomyces* isolates coded as: SP13, SP41, SP82, SP29, SP72, SV18; five fungus isolates with coded as: NP7, NV4, NV5, NV6, NV19 and four of bacterial isolates coded as: VP8, VV18, VV26, VV36.

Key words: Coffee husk, bio - product, biofertilizer.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ¹

Đăk Lăk là vùng trồng cà phê lớn nhất của Việt Nam. Bên cạnh sản phẩm thu hoạch chính là hạt cà phê dùng cho chế biến cà phê bột và xuất khẩu thì vỏ cà phê là nguồn phụ phẩm nông nghiệp sẵn có với số lượng lớn chưa được khai thác sử dụng có hiệu quả. Ngoài ra, một số biện pháp xử lý nguồn phụ phẩm này gây ảnh hưởng đến môi trường.

Xuất phát từ nhu cầu thực tế này, đề tài nghiên cứu ứng dụng công nghệ vi sinh trong xử lý vỏ cà phê làm phân bón nhằm góp phần cải tạo đất, tăng nguồn phân hữu cơ cho cây trồng, phục vụ cho mục đích phát triển nông nghiệp bền vững. Mục tiêu của đề tài: 1) Thu thập, phân lập và chọn lọc các chủng xạ khuẩn, nấm mốc và vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose và khả năng chịu nhiệt cao

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thu thập, phân lập và chọn lọc các chủng xạ khuẩn, nấm mốc và vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose và khả năng chịu nhiệt cao

1.1. Thu thập và phân lập

Tiến hành thu thập mẫu để phân lập các chủng vi sinh vật từ các đồng ủ vỏ cà phê, từ đất trồng cà phê, tiêu, cây rừng và từ các đồng ủ phân hữu cơ tại thành phố Buôn Ma thuột, huyện Krông Ana, huyện Cư M'gar, huyện Buôn Đôn thuộc tỉnh Đăk Lăk. Phương pháp phân lập: Phân lập các chủng vi sinh vật theo phương pháp pha loãng. Sau đó khuân lạc được làm thuần trên môi trường chuyên tính cho từng chủng vi sinh vật.

1.2. Đánh giá một số đặc tính sinh học

- Đánh giá hoạt độ enzym cellulase, pectinase, protease, amylase: i) Đánh giá định tính khả năng phân giải **xellulose, pectin, protein, tinh bột**. Nuôi cấy các mẫu xạ khuẩn, nấm mốc, vi khuẩn trên môi trường cảm ứng tổng hợp tương ứng, 3 lần lặp/mẫu. Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính vòng phân giải bằng thuốc thử lugol (mm), ii) Đánh giá định lượng hoạt độ enzym cellulase: Từ việc phân tích định tính khả năng

¹ Viện Khoa học kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên.

* Nguyễn Thị Vân¹, Cù Thị Dần¹.

phân giải xcellulose, chọn các ký hiệu mẫu có hoạt tính enzym cellulase cao để tiếp tục đánh giá định lượng hoạt độ enzym cellulase. Phương pháp nuôi cấy và thu dịch chiết enzym (Phạm Thị Ánh Hồng, 2003). Chỉ tiêu theo dõi: Hoạt độ enzym cellulase (UI) và iii) Đánh giá khả năng chịu nhiệt: Sau khi đánh giá định tính khả năng phân giải xcellulose, tiến hành đánh giá khả năng chịu nhiệt ở các nhiệt độ 50 - 70°C trên các môi trường chuyên tính. Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính khuân lạc sau khi nuôi cấy (cm).

- Xác định khả năng thích ứng pH: Nuôi cấy các ký hiệu mẫu trên môi trường chuyên tính ở các mức pH từ 4 - 7 trong tủ định ủ ở nhiệt độ 28 - 30°C. Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính khuân lạc sau khi nuôi cấy (cm).

1.3. Phân loại theo phương pháp hình thái

Chọn các mẫu được đánh giá có khả năng phân giải xcellulose và chịu nhiệt cao, tiến hành nuôi cấy trên môi trường chuyên tính, sau 3 ngày nuôi cấy tiến hành quan sát đặc điểm hình thái trên kính hiển vi để phân loại theo tài liệu của Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (1976); Holt và cộng sự (1994); Nguyễn Đức Lượng và cộng sự (2006).

2. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học từ các chủng vi sinh vật được chọn lọc

Thí nghiệm được tiến hành tại Phòng Thí nghiệm của Bộ môn Bảo vệ thực vật, Viện KHKT Nông lâm nghiệp Tây Nguyên, gồm các thí nghiệm sau: Thí nghiệm 1: Sản xuất men giống trên môi trường lỏng 1 + bán rắn; Thí nghiệm 2: Sản xuất men giống trên môi trường lỏng 2 + bán rắn; Thí nghiệm 3: Sản xuất men giống vi sinh vật trên môi trường bán rắn; Chỉ tiêu theo dõi: Mật độ vi sinh vật (cfu/g).

3. Thử nghiệm khả năng ủ của chế phẩm trên vỏ cà phê

Địa điểm thử nghiệm: Viện KHKT Nông lâm nghiệp Tây Nguyên (WASI); Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm gồm 4 công thức,

lặp lại 3 lần. Các công thức như sau: CT1 - Chế phẩm vi sinh WASI sản xuất thử (CPVTN1); CT2 - Chế phẩm vi sinh WASI sản xuất thử (CPVTN2); CT3 - Chế phẩm vi sinh Công ty Ea Kmat (CPVTN); CT4 - Vỏ quả cà phê (đối chứng). Lượng vỏ quả cà phê sử dụng: 2 tấn/đồng ủ. Nguyên liệu trộn vào đồng ủ (công thức 1 - 3): Phân chuồng (200 kg) + vôi bột (14 kg) + lân (50 kg) + Urê (14 kg). Nguồn men giống sử dụng các nguồn men giống chính như sau: CPVTN1: Bao gồm nấm *Trichoderma* và xạ khuẩn *Streptomyces* do WASI chọn lọc và sản xuất thử. CPVTN2: Bao gồm nấm *Trichoderma*, xạ khuẩn *Streptomyces* do Viện sản xuất thử + nấm men, nấm mốc và vi khuẩn do WASI sản xuất với sự chuyển nhượng của Trường Đại học Nông nghiệp I. CPVTN: Bao gồm vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc. Chế phẩm vi sinh Công ty Ea Kmat do WASI sản xuất với sự chuyển nhượng của Trường Đại học Nông nghiệp I. Công thức đối chứng: Thực hiện phương pháp ủ như các công thức khác nhưng chỉ có vỏ cà phê mà không có các nguyên liệu khác.

Chỉ tiêu theo dõi: pH, tỷ lệ C/N, N (%), P₂O₅ (%), K₂O (%), P₂O₅ và K₂O đế tiêu (mg/100 g) trong vỏ cà phê trước và sau khi ủ; Nhiệt độ đồng ủ (°C); Thời gian vỏ cà phê phân hủy hoàn toàn

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thu thập, phân lập và chọn lọc các chủng xạ khuẩn, nấm mốc và vi khuẩn có khả năng phân giải xcellulose và khả năng chịu nhiệt cao

1.1. Thu thập, phân lập các chủng vi sinh vật

Trong 3 năm (2006 - 2008) đã thu thập được 220 ký hiệu mẫu vi sinh vật để đánh giá khả năng phân giải xcellulose và khả năng chịu nhiệt. Trong đó có 185 ký hiệu mẫu xạ khuẩn, 35 ký hiệu mẫu nấm và 68 ký hiệu mẫu vi khuẩn.

1.2 Đánh giá đặc tính sinh học và chọn lọc các chủng xạ khuẩn, vi khuẩn, nấm mốc có khả năng phân giải xcellulose và khả năng chịu nhiệt cao

- Đánh giá đặc tính sinh học của các chủng vi sinh vật là công việc rất quan trọng, là cơ sở để tuyển chọn các chủng vi sinh vật.

- Vỏ cà phê có các thành phần chủ yếu là pectin (40,5%), xcellulose (28,64%), protein (10,44%), tinh bột (12,6%) (Lê Hồng Phú, 2003). Do vậy, việc đánh giá khả năng sinh tổng hợp một số hệ enzym của các chủng xạ khuẩn,

nấm và vi khuẩn là rất cần thiết. Sau khi đánh giá đặc tính sinh học của các mẫu vi sinh vật về khả năng sinh tổng hợp một số hệ enzym thủy phân cellulase, pectinase, protease, amylase; Khả năng chịu nhiệt và thích ứng pH, chúng tôi đã chọn lọc ra được các ký hiệu mẫu vi sinh vật có các đặc tính sinh học tốt, kết quả thể hiện ở các bảng sau.

Bảng 1. Đặc tính sinh học của các ký hiệu mẫu xạ khuẩn có khả năng phân giải xcellulose cao được chọn lọc

TT	Ký hiệu mẫu	Tên khoa học	ĐKPG enzym xcellulase (cm) sau 14 ngày	Hoạt độ enzym xcellulase (UI)	Khoảng pH Thích ứng	Khoảng nhiệt độ thích ứng (°C)
1	SP13	<i>Streptomyces</i> sp.	4,93	0,0010	5 - 7	25 - 50
2	SP29	<i>Streptomyces</i> sp.	5,93	0,0014	5 - 7	25 - 50
3	SP41	<i>Streptomyces</i> sp.	6,00	0,0013	5 - 7	25 - 50
4	SP72	<i>Streptomyces</i> sp.	5,90	0,0020	5 - 7	25 - 50
5	SP82	<i>Streptomyces</i> sp.	5,80	0,0016	5 - 7	25 - 50
6	SV18	<i>Streptomyces</i> sp.	6,03	0,0010	5 - 7	25 - 50

Kết quả đã chọn lọc ra tổ hợp các chủng vi sinh vật dùng để làm giống sản xuất chế phẩm sinh học gồm: Sáu ký hiệu mẫu xạ khuẩn *Streptomyces* (SP13, SP41, SP82, SP29, SP72, SV18) có khả năng sinh trưởng tốt, chịu được nhiệt độ 50°C và thích ứng với pH 5 - 7; Năm ký hiệu mẫu nấm *Aspergillus* (NP7, NV4, NV5,

NV6, NV19) và bốn ký hiệu mẫu vi khuẩn có khả năng sinh trưởng tốt, chịu được nhiệt độ 70°C và thích ứng pH 4 - 7. So với các mẫu đối chứng của Trường Đại học Nông nghiệp I thì khả năng chịu nhiệt của các mẫu vi sinh vật được chọn lọc này cao hơn rất nhiều (Nguyễn Thị Minh và cộng sự, 2005).

Bảng 2. Đặc tính sinh học của các ký hiệu mẫu nấm có khả năng phân giải xcellulose cao được chọn lọc

TT	Ký hiệu mẫu	Tên khoa học	ĐKPG enzym cellulase (cm) sau 3 ngày	Hoạt độ enzym cellulase (UI)	Khoảng pH Thích ứng	Khoảng nhiệt độ thích ứng (°C)
1	NP7	<i>Aspergillus</i> sp.	1,23	0,0023	4 - 7	25 - 70
2	NV4	<i>Aspergillus</i> sp.	1,33	0,0029	4 - 7	25 - 70
3	NV5	<i>Aspergillus</i> sp.	1,33	0,0032	4 - 7	25 - 70
4	NV6	<i>Aspergillus</i> sp.	1,27	0,0038	4 - 7	25 - 70
5	NV19	<i>Aspergillus</i> sp.	1,30	0,0025	4 - 7	25 - 70

Bảng 3. Đặc tính sinh học của các ký hiệu mẫu vi khuẩn có khả năng phân giải xcellulose cao được chọn lọc

TT	Ký hiệu mẫu	ĐKVPG enzym cellulase (cm) sau 5 ngày	Hoạt độ enzym cellulase (UI)	Khoảng pH thích ứng	Khoảng nhiệt độ thích ứng (°C)
1	VP8	2,60	0,0047	4 - 7	25 - 70
2	VV18	2,67	0,0056	4 - 7	25 - 70
3	VV26	2,53	0,0043	4 - 7	25 - 70
4	VV36	2,60	0,0059	4 - 7	25 - 70

2. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học từ các chủng vi sinh được chọn lọc

Thí nghiệm sản xuất chế phẩm bao gồm các chủng xạ khuẩn, nấm mốc và xạ khuẩn được chọn lọc với các phương pháp khác nhau để chọn ra phương pháp nhân giống tốt nhất. Kết quả sản xuất men giống cấp 1 (xạ khuẩn, nấm mốc, vi khuẩn) tốt nhất trên môi trường đặc chuyên tính. Sản xuất men cấp 2: Đối với xạ khuẩn và nấm mốc tốt nhất trên môi trường bán rắn bắp cám trấu; Đối với vi khuẩn tốt nhất trên môi trường lỏng chuyên tính. Sản xuất men cấp 3 (xạ khuẩn, nấm mốc, vi khuẩn) đạt cao nhất ở môi trường bán rắn.

3. Thử nghiệm khả năng ủ của chế phẩm trên vỏ cà phê

Sau ủ 3 tháng các công thức ủ vỏ cà phê đều có tỷ lệ C/N giảm so với trước thí nghiệm và công thức đối chứng. Trong đó tỷ lệ C/N giảm mạnh nhất ở công thức 2 (chế phẩm VTN2) giảm 30,66% so với vỏ cà phê trước thí nghiệm. Kết quả thí nghiệm tương đương với của tác giả Biddappa và cộng sự (1998) sau 6 tháng sản phẩm có tỷ lệ C/N từ 7,80 - 8,70. Công thức ủ chế phẩm vi sinh CPVTN1 và CPVTN2 đã có tác dụng phân hủy vỏ cà phê tốt hơn so với chế phẩm CPVTN và đối chứng.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

- Thu thập được 220 ký hiệu mẫu vi sinh vật để đánh giá khả năng phân giải xcellulose và khả năng chịu nhiệt. Trong đó có 185 ký hiệu

mẫu xạ khuẩn, 35 ký hiệu mẫu nấm và 68 ký hiệu mẫu vi khuẩn.

- Chọn lọc được 6 ký hiệu mẫu xạ khuẩn *Streptomyces* (SP13, SP41, SP82, SP29, SP72, SV18); 5 ký hiệu mẫu nấm (NP7, NV4, NV5, NV6, NV19) và 4 ký hiệu mẫu vi khuẩn (VP8, VV18, VV26, VV36) làm bộ giống sản xuất chế phẩm phân hủy vỏ cà phê. Các ký hiệu này có hoạt tính cellulase cao, có khả năng chịu nhiệt độ cao và thích ứng với pH rộng.

- Sản xuất men giống cấp 1 (xạ khuẩn, nấm mốc, vi khuẩn) tốt nhất trên môi trường đặc chuyên tính. Sản xuất men cấp 2: Đối với xạ khuẩn và nấm mốc tốt nhất trên môi trường bán rắn bắp cám trấu; Đối với vi khuẩn tốt nhất trên môi trường lỏng chuyên tính. Sản xuất men cấp 3 (xạ khuẩn, nấm mốc, vi khuẩn) đạt cao nhất ở môi trường bán rắn.

- Công thức CPVTN1 đã có tác dụng phân hủy vỏ cà phê tốt tương đương với công thức CPVTN2.

4.2. Đề nghị

- Định danh bằng công nghệ sinh học các ký hiệu mẫu vi sinh vật có đặc tính sinh học tốt.

- Sản xuất chế phẩm sinh học gồm tổ hợp các chủng vi sinh vật: Xạ khuẩn, nấm mốc, vi khuẩn và thử nghiệm ủ trên vỏ cà phê.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Anh Dũng (2008), Nghiên cứu sử dụng các chủng vi sinh vật trong xử lý vỏ cà phê phế thải thành đất sạch và phân hữu cơ vi sinh chất lượng cao, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Đăk Lăk, 85 trang.

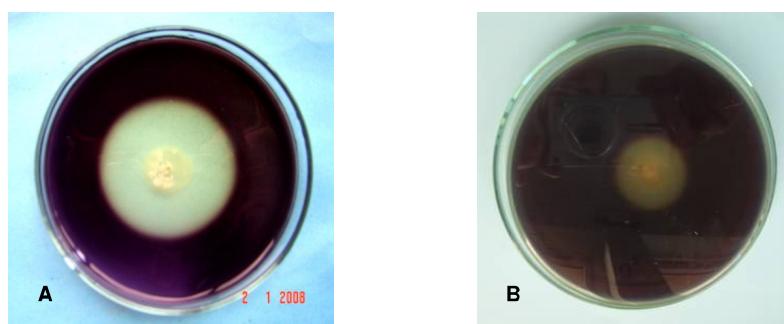
Nguyễn Thị Minh, Lê Anh Tùng, Vũ Thị Len (2005),
Nghiên cứu, phân lập và tuyển chọn các chủng
giống vi sinh vật có khả năng phân giải chất thải
hữu cơ mạnh để làm chế phẩm vi sinh vật xử lý rác
thải hữu cơ sinh hoạt và phế thải nông nghiệp thành
phân hữu cơ sinh học”, Báo cáo kết quả nghiên cứu
khoa học công nghệ, Trường Đại học Nông Nghiệp
I, Hà Nội.

Biddappa C. C., Palaniswami C., Upadhyay A. K. And
Ramanujam B. (1998), Organic manure from coffee

husk, Journal of Plantation Crop (India), v.26 (2), p,
120 - 126, Journal of Plantation Crops (India), v. 26(2)
p. 120 - 126.

Rynk R. (Editor) (1992), On - farm Composting
Handbook, NRAES - 54, Northeast Regional
Agricultural Engineering Service, Cooperative
Extension, Ithaca, N.Y.

Sanchez.G., Olguin E. J., Mercado G. (1999),
Accelerated coffee pulp composting, Klumar
Academic publishers, Vol 10, No. 1, p. 35 - 41.



*Hình ảnh định tính enzym cellulase
A. Xạ khuẩn; B. Nấm mốc*