

Nghiên cứu ứng dụng vi sinh trong xử lý Cellulose trên vật liệu vỏ trấu

○ ThS. NGUYỄN VĂN TUẤN

Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

Tóm tắt

Nghiên cứu được bố trí thí nghiệm trên vật liệu nghiên cứu là vỏ trấu ở 3 mức khối lượng 100 g, 200 g và 300 g, mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần và theo dõi 28 ngày. Kết quả cho thấy, hiệu suất xử lý cellulose ở thí nghiệm 1 (100 g vật liệu) đạt cao nhất 70,59%, kế đến là thí nghiệm 2 (200 g vật liệu) 62,36% và cuối cùng là thí nghiệm 3 (300 g vật liệu 55,46%).

Giới thiệu

Đồng bằng Sông Cửu Long là vùng sản xuất nông nghiệp, hàng năm phế phẩm nông nghiệp phát sinh hàng chục tỷ tấn như: Vỏ trấu, rơm rạ, lá cây, lõi ngô và các phụ phẩm hữu cơ khác gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng nếu không có biện pháp xử lý thích hợp. Cellulose là chất hữu cơ khó phân hủy trong điều kiện tự nhiên, có nhiều trong các phế phẩm nông nghiệp. Có rất nhiều biện pháp xử lý cellulose như phương pháp lý học, hóa học và sinh học, việc tìm kiếm và ứng dụng các chủng vi sinh vật xử lý chất thải trong môi trường được nhiều nhà khoa học sử dụng vì biện pháp này dễ sử dụng, chi phí thấp, sản phẩm sau khi xử lý ít gây ô nhiễm môi trường. Cụ thể, chủng nấm *Trichoderma*, loài có tính đa dạng cao và phân bố ở vùng địa lý rộng có khả năng tiết enzym *cellulase* phân giải cellulose tạo sinh khối mùn, góp phần làm giảm chất thải gây ô nhiễm môi trường từ phụ phẩm trong nông nghiệp.

Hiện nay, *Trichoderma* đã và đang được nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước đang nghiên cứu và ứng dụng, nhiệt độ tăng trưởng thích hợp cho *Trichoderma sp.* trong khoảng 25-30°C, trong khi đó thì *Trichoderma harizianum*, *Trichoderma hamatum* thích hợp trong khoảng 8-24°C, còn *Trichoderma viride* ở khoảng 8-16°C. *Trichoderma sp.* tăng trưởng nhanh ở 25°C và có sự cạnh tranh lớn về không gian, vì vậy chúng được nuôi cấy nhiều trong điều kiện phòng thí nghiệm (Widden P. and Hsu D., 1987). *Trichoderma* nổi tiếng nhờ khả năng phân giải được polymesaccharides (Cellulose, hemicellulose) và polyme có liên quan đến chitin. Các enzym tham gia vào các quá trình phân giải này có tầm quan trọng về mặt thương mại (Danielson R. M. and Davey C. B., 1973). Theo Trần Thanh Phong và ctv năm 2007

của Viện sinh học Nhiệt đới đã “nghiên cứu thu nhận *cellulase Trichoderma reesei* VTT-D-80133 sinh trưởng trên môi trường bán rắn” với cơ chất bã mía kết hợp với cám mì, tỷ lệ BM:CM (7:3), 8 lần nồng độ dinh dưỡng, độ ẩm ban đầu 60%, thời gian nuôi cấy 7 ngày là tối ưu cho *Trichoderma reesei* VTT-D-80133 sinh tổng hợp *cellulase* trên môi trường lên men bán rắn. Hoạt tính và hiệu suất sinh tổng hợp *cellulase* ở điều kiện trong bình tam giác là CMCase (Carboxymethyl cellulase) 280,64 IU/g và FPU (Filter Paper Unit) 5 IU/g; thấp hơn 3,2 và 37 lần so với chế phẩm Amano T (*cellulase* được sản xuất từ *Trichoderma reesei*) của hãng Amano. *Trichoderma* còn có khả năng hoạt động phòng trừ sinh học, phân giải cellulose của *Trichoderma* ở các thể tiềm sinh và sợi nấm được công bố không chỉ trong phòng thí nghiệm (Cook R.J. and Baker K.F., 1982; Askew D.J. and Laing M.D., 1993). Ở Việt Nam, nấm *Trichoderma* đã được Bộ môn Bệnh cây, Viện Bảo vệ thực vật nghiên cứu từ năm 1989 đến nay, đây là loài nấm đất thường xuất hiện trên các loài đất giàu dinh dưỡng, có khả năng phân giải chất kitin, cellulose và điều tra phát hiện thấy nấm *Trichoderma* thường sinh sống và tồn tại trên những tàn dư thực vật (Phạm Thị Thuý, 2010).

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành với các nội dung sau: (1) Chuẩn bị vật liệu nghiên cứu và mẫu vi sinh vật (*Trichoderma*); (2) bố trí thí nghiệm; (3) theo dõi, phân tích các chỉ tiêu pH, nhiệt độ, cellulose và mật số vi khuẩn; (4) tổng hợp số liệu và viết báo cáo.

Vật liệu

Sử dụng vật liệu phế phẩm nông nghiệp phổ biến là vỏ trấu và Chủng nấm *Trichoderma* được lấy từ chế phẩm nông nghiệp.

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí gồm có 4 nghiệm thức (NT) và 4 lần lặp lại, do đó có tổng cộng 16 ô thí nghiệm được bố trí theo phép hoàn toàn ngẫu nhiên và bố trí cùng một thời điểm. Vật liệu thí nghiệm được bố trí vào học ủ bằng thùng xốp. Các NT được bố trí như sau: ĐC: 100 g vỏ trấu, không cho chủng nấm vào. NT1: 100 g vỏ trấu, với 20 ml mẫu chủng nấm. NT2: 200 g vỏ trấu, với 20 ml mẫu chủng nấm. NT3: 300 g vỏ trấu, với 20 ml mẫu chủng nấm. Thí nghiệm được theo dõi 28 ngày.

Hình 1: Sơ đồ bố trí các nghiệm thức của thí nghiệm

NT2	ĐC	NT2	NT1
ĐC	NT1	ĐC	NT3
NT2	NT2	NT3	NT1
NT3	NT3	NT1	ĐC

Mô tả tiến trình thực hiện thí nghiệm: Vật liệu nghiên cứu được thu gom, phơi khô, cân vật liệu theo số gam bố trí rồi cho vào các thùng xốp. Phân tích cellulose đầu vào (kể cả mẫu đối chứng), sau đó cho 20 ml chủng nấm vào các ô thí nghiệm (trừ mẫu đối chứng), để đảm bảo độ ẩm cho chủng nấm *Trichoderma* sinh trưởng và phát triển, tưới nước mỗi ngày cho các mẫu thí nghiệm. Thí nghiệm được thực hiện trong 28 ngày, 7 ngày tiến hành phân tích các thông số: Mật độ chủng nấm và cellulose (kể cả mẫu đối chứng) một lần.

Phương pháp phân tích cellulose

Cellulose là hợp chất bền không tan trong môi trường axit và kiềm. Bởi thế người ta xác định hàm lượng trọng lượng còn lại sau khi hòa tan mẫu bằng axit và kiềm.

Hoá chất: Dung dịch H₂SO₄ 8%; Dung dịch NaOH 30%.

Cách tiến hành: Cân 2,0 g mẫu đã được sấy ở 105°C từ 2 - 3 giờ vào cốc 250 ml. sau đó thêm 50ml dung dịch 8% H₂SO₄ và thêm 50 ml nước cất đun sôi 10 phút. Phần còn lại được rửa gạn với nước nóng nhiều lần (5 lần). Thêm nước cất 100 ml, thêm 9 ml dung dịch 30% NaOH và đun sôi 10 phút, sau đó rửa gạn bằng nước nóng nhiều lần, chuyển cạn sang giấy lọc đã biết trọng lượng trước, rửa nhiều lần trên giấy lọc bằng nước nóng, sấy cạn và giấy lọc ở 105°C trong vòng 5-6 giờ.

Tính toán kết quả:

$$X = \frac{A-B}{c} \times 100 \quad (CT1)$$

Trong đó: A là Khối lượng cạn + giấy lọc (g); B là Khối lượng giấy lọc (g); C là Khối lượng mẫu đem phân tích (g).

Phương pháp xác định mật độ số *Trichoderma*

Một số chủng nấm được xác định bằng phương pháp đếm các tế bào sống trên môi trường rắn: Pha môi trường nuôi cấy nấm. Sau đó, đổ môi trường trên đĩa petri, mỗi đĩa petri chia làm 3 phần, mỗi phần chấm 5 điểm, lấy mẫu nước, pha loãng 10⁵ lần, 10⁶ lần và 10⁷ lần, dùng micropipet lấy 10⁻³ ml mẫu nước của từng nồng độ pha loãng nhỏ vào 5 điểm chấm trên từng phần đĩa petri (tương ứng với 3 phần trên đĩa là 3 nồng độ pha loãng), đếm số khuẩn lạc trên đĩa, có thể đếm 1 trong 3 nồng độ được pha loãng.

$$M = S \times f \quad (CT2)$$

Trong đó: M là Mật số nấm (cfu/ml); S là Số khuẩn lạc; f là hệ số pha loãng.

Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Excel để tính toán, tổng hợp số liệu và vẽ biểu đồ, đồ thị.

So sánh hiệu suất xử lý của các nghiệm thức bằng các dùng kiểm định Anova và phép thử Duncan của phần mềm thống kê SPSS 16.0.

Kết quả thảo luận

Kết quả đo giá trị pH, Nhiệt độ

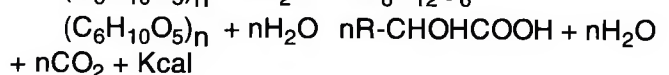
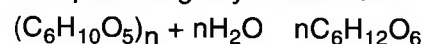
Bảng 1: Kết quả kiểm định Duncan giá trị trung bình pH, nhiệt độ của các nghiệm thức qua 28 thí nghiệm

STT	Vỏ trấu		
	NT	pH	Nhiệt độ
1	ĐC	6,97a	30,1 a
2	NT1	6,18b	30,96b
3	NT2	6,09b	30,78c
4	NT3	6,17b	30,60d
	CV%	13,2%	10,9%

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau không có sự khác biệt nhau theo cột.

Kết quả kiểm định Duncan giá trị trung bình pH trên vật liệu thí nghiệm có sự khác biệt rất có ý nghĩa giữa nghiệm thức đối chứng (ĐC) với các nghiệm thức còn lại, vì *Trichoderma* đã làm thay đổi giá trị pH, có thể giải thích hiện tượng trên là do suốt quá trình thí nghiệm đã xảy ra hiện tượng lên men phân giải cellulose thành các axit hữu cơ (axit uronic hay gọi là acid mùn) và các oxit axit đơn giản hơn nên làm giảm pH của môi trường.

Các phản ứng xảy ra như sau:



Tuy nhiên, không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức NT1; NT2 và NT3 do bước nhảy này chưa đủ để làm nên sự khác biệt về giá trị pH ở mức độ tin cậy 95% về mặt ý nghĩa thống kê.

Dùng phép thử Duncan kiểm định giá trị trung bình về nhiệt độ giữa các nghiệm thức, kết quả cho thấy: Có sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức với nhau trên vật liệu vỏ trấu ở mức độ tin cậy 95%.

Bảng 2: Hiệu suất xử lý cellulose của các nghiệm thức thí nghiệm

STT	NT	Hiệu suất (%)
1	NT1	70,59
2	NT2	62,36
3	NT3	55,46

Kết quả đo giá trị cellulose

Kết quả bảng 4 cho thấy, hiệu suất xử lý cellulose của *Trichoderma* là rất cao, NT1 hiệu suất đạt tới 70,59%; NT2 hiệu suất đạt 62,39% và NT3 hiệu suất đạt 55,46%.

Bảng 3: Kết quả kiểm định Duncan giá trị trung bình cellulose của các nghiệm thức qua 28 ngày thí nghiệm

STT	Vỏ trấu	
	NT	Trị TB
1	ĐC	45.66a
2	NT1	37.11b
3	NT2	38.45c
4	NT3	39.31d
CV%		11,1%

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau không có sự khác biệt nhau (theo cột).

Kết quả kiểm định Duncan giá trị trung bình cellulose của 3 nghiệm thức có sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với mức độ tin cậy 95% (Bảng 3). Nghĩa là, bước nhảy 100g vật liệu đủ lớn để tạo nên sự khác biệt này.

Kết quả đếm mật số *Trichoderma*

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau không có sự khác biệt nhau (theo cột).

Bảng 4: Kết quả kiểm định Duncan giá trị trung bình mật số ($\times 10^6$ cfu/ml) các nghiệm thức qua 28 ngày thí nghiệm

STT	Vỏ trấu	
	NT	Trị TB
1	ĐC	1,03 a
2	NT1	6,89b
3	NT2	6,81bc
4	NT3	6,70c
CV%		11,41%

Qua kết quả kiểm định Duncan cho thấy, giá trị trung bình mật số ở nghiệm thức đối chứng khác biệt so với các nghiệm thức còn lại, NT1 khác biệt so với NT3 nhưng không khác biệt với NT2; NT2 và NT3 ta không thấy sự khác biệt về mật số thống kê với độ tin cậy 95%, điều này cho thấy trên vật liệu vỏ trấu, bước nhảy 100g không làm nên sự khác biệt về số lượng mật số *Trichoderma*.

Kết luận và kiến nghị

Kết luận

Kết quả nghiên cứu ứng dụng chủng nấm *Trichoderma* để phân giải cellulose trên vật liệu vỏ trấu cho thấy *Trichoderma* có khả năng xử lý cellulose, làm thay đổi giá trị pH, nhiệt độ. Hiệu suất xử lý của NT1 là 70,59%; NT2 là 62,36%; NT3 là 55,46%, kết quả kiểm định Duncan cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức với độ tin cậy 95%.

Kiến nghị

Do thời gian nghiên cứu còn hạn hẹp, nên đề tài nghiên cứu chỉ thực hiện trên 1 vật liệu nghiên cứu với thời gian 28 ngày, trong các ô thí nghiệm. Tác giả xin kiến nghị các nghiên cứu tiếp theo nên mở rộng thêm (thời gian nghiên cứu, thêm vật liệu nghiên cứu, thay đổi bước nhảy khối lượng vật liệu nghiên cứu, theo đổi mật số).

Tài liệu tham khảo

- Askew D.J. and Laing M.D. (1993), *An adapted selective medium for the quantitative isolation of Trichoderma species*. *Plant Path.* 42: pp 686-690;
- Cook R.J. and Baker K.F. (1983), *Production of xyloglucanolytic enzymes by Trichoderma viride, Paecilomyces farinosus, Wardomyces inflatus, and Pleurotus ostreatus*. *Apd.* 419, E-18008 Granada, Spain;
- Danielson R.M. and Davey C.B. (1973c), *Carbon and nitrogen nutrition in Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.* 5: pp506-515;
- Phạm Thị Thuỳ (2010), *Giáo trình Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật*, Hà Nội. NXB đại học Quốc gia Hà Nội;
- Trần Thanh Phong và ctv (2007), *Thu nhận enzym cellulase của Trichoderma reesei trên môi trường bán rắn*, Viện sinh học Nhiệt đới - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tạp chí phát triển KH&CN, Tập 10, Số 07 -2007;
- Widden P. and Hsu D. (1987), *Competition between Trichoderma species: Effects of temperature and litter type*. *Soil Biol. Biochem.* 19: pp89-94. ■