

TUYỂN CHỌN CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI XENLULOZA CAO CHO SẢN XUẤT CHẾ PHẨM XỬ LÝ PHÉ THẢI CHĂN NUÔI DẠNG RẮN¹

Phạm Bích Hiền², Đào Văn Thông³,

Lương Hữu Thành³, Vũ Thúy Nga³.

Summary

Selection microorganism able high decompose of xenluloza for production inoculant treatments of solid waste livestock.

Selection microorganisms able high decompose of xenluloza will play an important role in the production inoculant for treatment of solid waste livestock. This paper showed that the strain of microorganisms signed PTCX04 was selected. It can be decomposed of pig manure. By colony characteristic, cell morphology, and sequencing of DNA fragment of 16S rRNA gene the PTCN04 strain was determined as *Streptomyces rochei*. According to European Community, species are selected have high biosafety and they are permission to apply in common. The *Streptomyces rochei* will be continuous research to apply for production of inoculant.

Key words: *Xenluloza, Streptomyces rochei, innoculant.*

1. Mở đầu.

Số liệu ước tính đàn gia súc, gia cầm của Việt Nam thải ra khoảng 539.733,15 tấn chất thải rắn/ngày, trong đó khoảng 50% được xử lý bằng phương pháp ủ trước khi bón ruộng, phần còn lại được sử dụng ngay hoặc cho thải trực tiếp ra môi trường gây ra nhiều vấn đề ô nhiễm làm lây lan nguồn bệnh ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng cũng như chính ngành chăn nuôi. Phế thải chăn nuôi, ngoài hàm lượng dinh dưỡng còn chứa khoảng 20-30% các hợp chất hydratcacbon mà cây trồng không sử dụng được, trong đó xenluloza chiếm tỷ lệ cao nhất. Phân giải xenluloza tự nhiên là quá trình phức tạp, thường kéo dài 3-6 tháng. Trong các biện pháp xử lý phế thải chăn nuôi hiện nay, phương pháp ủ nhanh có sự trợ giúp của vi sinh vật khởi động có khả năng sinh enzyme xenlulaza ngoại bào đem lại hiệu quả cao nhất. Nghiên cứu *Tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng phân giải xenluloza cao để sử dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý nhanh phế thải chăn nuôi* nhằm mục tiêu rút ngắn thời gian ủ, hạn chế ô nhiễm môi trường, tạo ra sản phẩm phân bón hữu cơ có chất lượng, đáp ứng yêu cầu quản lý tổng hợp dinh dưỡng cây trồng và phát triển nông nghiệp bền vững.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu.

¹ Bài viết do GS. TSKH. Trần Duy Quý phản biện, đã được đăng trên Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam (ISSN 1859-1558) số 3(24) 2011

² Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

³ Viện Môi trường Nông nghiệp

2.1. Vật liệu nghiên cứu.

- Bộ chủng giống VSV phân giải xenluloza có ký hiệu từ PTCX01-PTCX10 được lưu giữ tại Viện Môi trường Nông nghiệp.

- Hóa chất và các thiết bị cần thiết trong phân tích, đánh giá VSV.

2.2. Phương pháp xác định khả năng phân giải xenluloza.

- Phương pháp định tính: Sử dụng phương pháp khuếch tán trên thạch đĩa Enzym xenlulaza thủy phân CMC trong môi trường sẽ tạo thành vòng không màu với thuốc thử lugol quanh giếng chứa dịch enzym. Hoạt lực enzym của VSV được biểu thị bằng giá trị D-d (mm) trong đó: D là đường kính vòng thủy phân và d là đường kính của lỗ khoan.

- Phương pháp định lượng: dựa trên nguyên tắc xác định hoạt lực enzym C_1 và C_x xúc tác phản ứng phân cắt bột giấy hoặc CMC thành các gốc đường khử.

+ Định lượng đường khử: Xác định bằng thuốc thử DNSA.

2.3. Phương pháp xác định tên vi sinh vật bằng kỹ thuật phân tử

Định tên VSV bằng phương pháp phân loại học phân tử dựa trên cơ sở giải trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom của chủng nghiên cứu, so sánh với các trình tự có sẵn trong ngân hàng gen quốc tế EMBL bằng phương pháp FASTA 33 để định loại đến loài. Cặp môi được thiết kế dựa trên trình tự đoạn gen mã hóa 16s ARN riboxom của chủng E. coli (J01695), tương ứng với các vị trí nucleotit 15-33 (cho môi xuôi) và 1548-1532 (cho môi ngược). Trình tự nucleotit của các chủng nghiên cứu được giải trình trên máy tự động ABI-377, sau đó được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03 và chương trình AssemblyLIGN 1.9 trong hệ chương trình MacVector 6.5.3. Truy cập Ngân hàng Gen bằng chương trình Entrez/nucleotide/ tìm kiếm các trình tự gen 16s ARN riboxom của VSV. So sánh đối chiếu và xử lý số liệu của tất cả các chuỗi bằng chương trình GENDOC2.5. Thành phần nucleotit được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của VSV bậc thấp (vi khuẩn) trong Ngân hàng Gen (bảng mã di truyền số 11) thông qua chương trình GENDOC 2.5. Tên VSV được xác định với xác suất tương đồng cao nhất.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng phân giải xenluloza cao.

3.1.1. Xác định định tính khả năng phân giải xenluloza

Từ bộ chủng giống VSV được phân lập, lưu giữ bảo quản tại bộ môn Sinh học môi trường-Viện Môi trường Nông nghiệp, đề tài đã xác định định tính và tuyển chọn chủng có khả năng phân giải xenluloza cao.

Bảng 1. Tuyển chọn vi sinh vật phân giải xenluloza.

STT	Ký hiệu chủng	Nguồn gốc	Nhóm VSV	Đường kính vòng phân giải xenluloza (D-d)mm.
1	PTCX01	Phân lập từ đất	Vi khuẩn	17,0
2	PTCX02	-nt-	Vi khuẩn	20,0
3	PTCX03	-nt-	Xạ khuẩn	15,0
4	PTCX04	-nt-	Xạ khuẩn	30,0
5	PTCX05	Từ phế thải chăn nuôi	Xạ khuẩn	23,0
6	PTCX06	-nt-	Vi khuẩn	21,0
7	PTCX07	-nt-	Vi khuẩn	15,0
8	PTCX08	Phân lập từ đất	Xạ khuẩn	13,0
9	PTCX09	-nt-	Xạ khuẩn	18,0
10	PTCX10	-nt-	Vi khuẩn	17,0

Trong 10 chủng VSV nghiên cứu có 5 chủng thuộc nhóm vi khuẩn và 5 chủng thuộc nhóm xạ khuẩn. Tất cả các chủng đều có hoạt tính phân giải xenluloza. Chủng PTCX08 có hoạt lực enzym xenlulaza thấp nhất (đạt 13,0mm), cao nhất là chủng xạ khuẩn PTCX04 (đạt 30,0mm). Các chủng còn lại có đường kính vòng phân giải xenluloza (D-d) trung bình từ 17,0 đến 23,0mm. Từ kết quả nghiên cứu, đề tài đã lựa chọn được 1 chủng xạ khuẩn ký hiệu PTCX04 sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2. Định lượng hoạt độ xenlulaza của chủng xạ khuẩn PTCX04.

Xenlulaza là một phức hệ enzym bao gồm 3 enzym chủ yếu sau: Endo-1,4-glucanaza (hay CMC-aza, C_x), Exo- 1,4-glucanaza (hay xenlobiohydrolaza, C_1) và β -1,4-glucanaza (hay xenlobiaza). Những enzym này hoạt động cùng nhau để thủy phân xenluloza.

Bảng 2. Kết quả xác định hoạt độ enzyme của chủng PTCX04.

Hoạt tính	Mật độ (OD_{540nm})	Hoạt lực enzyme (U/ml)
Endo-glucanase	0,84	5,32
Exo-glucanase	0,23	0,41

Kết quả định lượng và định tính khẳng định chủng xạ khuẩn PTCX04 có hoạt tính phân giải xenluloza cao. Dịch enzyme ngoại bào của chủng PTCX04 có khả năng thủy phân cả 2 loại

cơ chất CMC và bột giấy, do đó có thể sử dụng tốt cho sản xuất chế phẩm VSV xử lý phế thải chăn nuôi giàu cơ chất xenluloza.

3.2. Đặc điểm sinh hóa của chủng vi sinh vật nghiên cứu

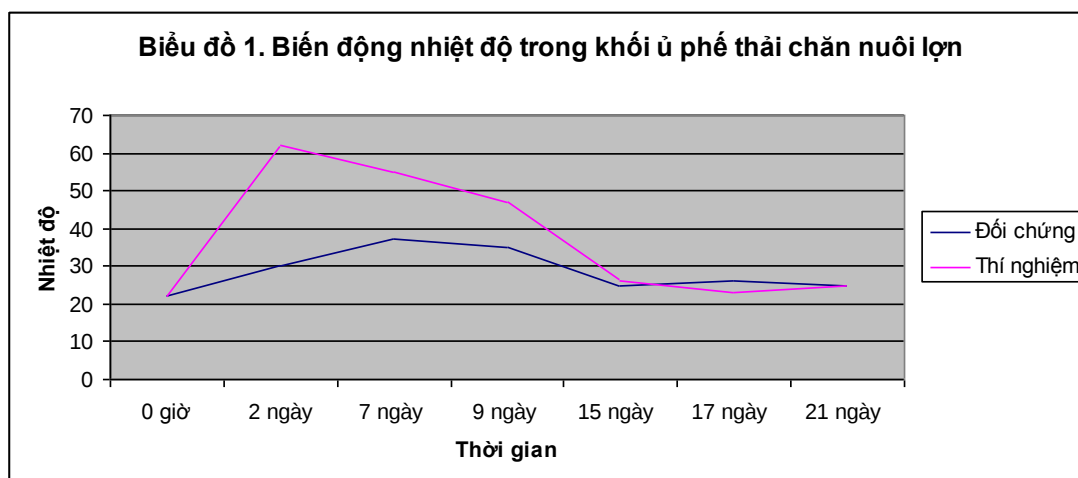
- Đặc điểm sinh lý, hình thái: Khuẩn lạc PTCX04 nuôi cấy trên môi trường Gauze có hình tròn, đường kính 2,2-2,5mm, màu trắng ngà, chân khuẩn lạc bám sâu trong môi trường. Nuôi cấy lắc trên môi trường dịch thể, sau 72 giờ tạo thành hạt nhỏ kích cỡ khoảng 1 mm, làm trong môi trường nuôi cấy, trên thành bình tạo vòng vầng màu trắng, bám chặt vào thành bình, mật độ tế bào đạt 2.10^9 CFU/ml, hoạt độ enzyme là 3,0mm. Sau 3 tháng lưu giữ, mật độ tế bào đạt $3,6.10^8$, hoạt độ enzym là 2,8mm.

Bảng 3. Các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho hoạt tính sinh xenlulaza của chủng PTCX04

Điều kiện nuôi cấy	Kết quả xác định
Nhiệt độ thích hợp	35±2
Phổ pH	6,0- 7,5
Nhu cầu O ₂ (Lưu lượng cấp khí (dm ³ O ₂ /dm ³ môi trường/h)	0,75
Thời gian nuôi cấy (h)	72
Nguồn hydratcacbon	CMC, bột giấy, tinh bột, giẻ đường
Nguồn Nitơ	Pepton, cao nấm men

3.3. Thử nghiệm sử dụng chủng PCTX04 trong ủ, xử lý phế thải chăn nuôi.

Thử nghiệm khả năng ứng dụng chủng PCTX04 trong ủ, xử lý phế thải chăn nuôi. Đo nhiệt độ đồng ủ theo thời gian, sau 21 ngày xác định một số đặc điểm lý hoá của phân ủ để đánh giá khả năng chuyển hoá chất hữu cơ trong phế thải chăn nuôi.



Bảng 4. Biến đổi thành phần lý, hóa học của phế thải chăn nuôi lợn được xử lý bằng chủng PTCX04 .

Công thức	Định tính sự biến đổi lý học			Hàm lượng OC tổng số (%)
	Thành phần cơ giới	Màu sắc	Mùi	
Trước xử lý	Bết, không xốp	Vàng	Hôi	45,5
Sau xử lý	Tơi xốp	Nâu sẫm	Không còn mùi	25,7

Bảng 5. Quần thể vi sinh vật gây bệnh trong phế thải chăn nuôi lợn được xử lý bằng chủng PTCX04 .

Công thức	Định tính sự biến đổi lý học				Trứng giun (trứng/gr)	
	<i>Coliform</i> (CFU/g)		<i>Salmonella</i> (CFU/g)			
	<i>0 giờ</i>	<i>Sau 21 ngày</i>	<i>0 giờ</i>	<i>Sau 21 ngày</i>	<i>0 giờ</i>	<i>Sau 21 ngày</i>
Đối chứng	5,2 x10 ⁵	2,2 x10 ³	6,3 x10 ³	1,6x10 ²	15	10
Thí nghiệm	5,2 x10 ⁵	-	6,3 x10 ³	-	15	0

(-): không phát hiện ở nồng độ pha loãng 10^{-1}

Bổ sung chủng PTCX04 trong đồng ủ đã đem lại hiệu quả rõ rệt trong xử lý phế thải chăn nuôi lợn. Chỉ số OC của phế thải chăn nuôi lợn từ 45,5% giảm xuống còn 25,7%. Trong quá trình chuyển hoá các hợp chất hydracacbon, nhiệt độ tăng cao không những làm rút ngắn thời gian ủ, tăng hiệu quả chuyển hoá cơ chất, tạo sản phẩm sau xử lý tơi xốp, chuyển sang màu nâu sẫm, không còn mùi hôi mà còn giúp loại bỏ các yếu tố sinh học gây hại.

3.4. Định danh chủng xạ khuẩn nghiên cứu

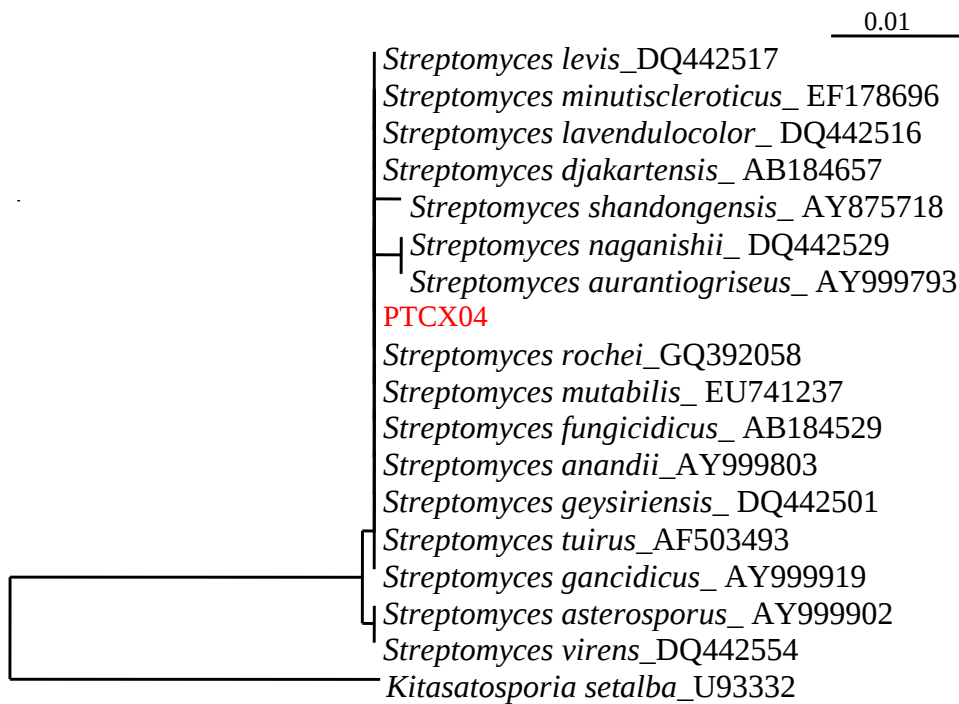
*. Giải trình tự gen chủng xạ khuẩn PTCX04.

GAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAG
GTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGG
GGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGAT
CGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCG
AAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAA
CAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCA
ACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGC
ATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGG
AAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTC
CGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTTGGTGTCTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCA
ACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGC
ACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATC
TCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGG
AGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCG

CCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTT
GTGGGAGG

GAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGC
CGTACCGGA

AGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT



Vị trí phân loại của chủng PTCX04 và các loài có quan hệ họ hàng gần dựa vào trình tự ADNr 16S vùng V1-V3 (vị trí 968-1401 của E. coli)

* *Xác định tên:* Trình tự gen rARN 16S của chủng PTCX04 tương đồng 99,7% (1297-1296/1300 bp) với đoạn 16S của xạ khuẩn *Streptomyces aurantiogriseus*, *Streptomyces levis*, *Streptomyces djakartensis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces mutabilis*, *Streptomyces fungicidicus*, *Streptomyces anandii*, *Streptomyces geysiriensis*, *Streptomyces tuius*, *Streptomyces gancidicus*.

Dựa vào kết quả xác định trình tự gen và đặc điểm sinh hóa của xạ khuẩn nghiên cứu, chủng PTCX04 có đặc điểm trùng với chủng xạ khuẩn có tên là *Streptomyces rochei*.

3.5. Xác định mức độ an toàn sinh học:

Theo Hướng dẫn số 90/679/EWG của Cộng đồng châu Âu về an toàn sinh học, nhóm tác nhân sinh học được phân làm 4 cấp độ an toàn, trong đó chỉ các VSV ở cấp độ 1 và 2 được ứng dụng trong sản xuất ở điều kiện bình thường. Mức an toàn sinh học 1-4 là các mức an toàn sinh học chung, chủ yếu cho các tác nhân sinh học như: vi khuẩn, virus, nấm, ký sinh trùng (kể cả có và không có biến đổi gen).

Kết quả đối chiếu với danh mục cho thấy chủng xạ khuẩn phân giải xenluloza *Streptomyces rochei* được xếp vào nhóm VSV có độ an toàn sinh học mức 2, có thể ứng dụng rộng rãi trong sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý nhanh phế thải chăn nuôi.

4. Kết luận.

- Đề tài đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn có hoạt tính phân giải xenluloza cao, các đặc điểm sinh học thích hợp cho sử dụng sản xuất chế phẩm VSV, bước đầu ứng dụng cho thấy chủng vi sinh vật này có hiệu quả trong xử lý phế thải dạng rắn trong chăn nuôi gà, lợn.

- Kết quả phân loại xác định chủng xạ khuẩn tuyển chọn thuộc loài *Streptomyces rochei*, được xếp vào nhóm vi sinh vật có độ an toàn sinh học mức 2, có thể ứng dụng rộng rãi trong sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý nhanh phế thải chăn nuôi.

Tài liệu tham khảo

1. Ajay (EDT) Singh, Owen P. (EDT) Ward (2004), *Biodegradation and Bioremediation*, Springer 57-74.
2. Coughlan, M. and Mayer F. (1998), *Cellulose decomposing bacteria and their enzyme system*. The prokaryotes, chapter 20, 460-502
3. Gaur A. C. (1980), *Microbial decomposition of organic material and humus in soil and compost*, FAO/UNDP, Technology composting.
4. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A, Staley J. T., Williams S. T. (2000), *Bergey's Manual of Determinative., Bacteriology*, 9th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, (4),
5. Meinke A., Gilkes N. R., Kilburn D. G., Miller R. C., Jr. and Warren R. A. J. (1993), "Cellulose-binding polypeptides from *Cellulomonas fimi*: endoglucanase D (CenD), a family A α -1,4-glucanase", *J. Bacteriol*, (175), pp. 1910-1918.
6. Smith, R. C. (1995), *Composting practices*, NDSU Extension Service. North Dakota State University of Agriculture and Applied Science, and USDA.
7. TCVN 6168:2002, *Chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo*.