

TUYỂN CHỌN VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY VI KHUẨN KỶ KHÍ CÓ KHẢ NĂNG THỦY PHÂN RƠM

Tô Thị Ngọc Anh

TÓM TẮT

14 dòng vi khuẩn kỵ khí phân lập từ dạ cỏ bò được đem khảo sát hoạt tính trên môi trường Delafield cải tiến, sử dụng bột rơm làm cơ chất. Kết quả chọn dòng cho thấy vi khuẩn 43 cho đường kính vòng tròn thủy phân lớn nhất (13,0mm) trên môi trường nhuộm Congo-Red. Dòng 43 là vi khuẩn gram âm, cầu đôi, di động và sinh trưởng trong khoảng pH rộng 5,0-10,0, nhiệt độ 25-40°C. Tại pH 6,0, nhiệt độ 30°C, thời gian ủ 5 ngày, dòng 43 cho hoạt độ thủy phân rơm cao nhất với hàm lượng protein sinh ra 0,10mg/ml và đường khử sinh ra 0,046µg/ml.

Từ khóa: dạ cỏ bò, đường khử, kỵ khí, thủy phân, rơm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đồng bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) là vùng sản xuất lúa trọng điểm của cả nước, với diện tích trồng lúa chỉ chiếm 12,1% nhưng sản lượng lúa chiếm 51,5% và cung cấp hơn 90% lượng xuất khẩu của cả nước. Tương đương với lượng lúa gạo thì lượng rơm phát sinh là rất lớn. Ước tính lượng rơm phát sinh năm 2011 của toàn vùng ĐBSCL là 26,23 triệu tấn, trong các địa phương khảo sát thì nhiều nhất là tỉnh An Giang (4,78 triệu tấn) và thấp nhất là Cần Thơ (1,68 triệu tấn) (Tổng cục Thống kê, 2011). Khuynh hướng sử dụng rơm hiện nay của các nông hộ là: đốt rơm trên đồng, vùi trong đất, trồng nấm, bán chăn nuôi và cho rơm. Theo báo cáo của Trần Sỹ Nam (2014), hầu như tất cả người dân đều có khuynh hướng lựa chọn biện pháp đốt rơm trên đồng ruộng cho các năm tiếp theo: 98,75% (vụ Đông Xuân), 96,5% (vụ Hè Thu) và 91,25% (vụ Thu Đông). Đốt rơm rạ trên đồng ruộng chỉ tái tạo được một phần chất dinh dưỡng vô cơ cho đất, nhưng lại thúc đẩy rửa trôi chất dinh dưỡng trong đất và làm “chai đất”. Hơn nữa, đốt rơm trên các diện tích lớn ĐBSCL sẽ ảnh hưởng lớn đến môi trường đất, nước và không khí, ảnh hưởng tới sức khỏe con người, góp phần làm gia tăng biến đổi khí hậu (IPCC, 2007; Gadde *et al.*, 2009) và gây lãng phí nguồn tài nguyên sinh khối này (Ngô Thị Thanh Trúc, 2005). Do đó, nghiên cứu xử lý rơm rạ

sau thu hoạch là một vấn đề cấp thiết, đặc biệt trong thời điểm ĐBSCL đang gánh chịu những tác hại nặng nề của biến đổi khí hậu (Đoàn Thị Thu, 2014).

Cellulase là nhóm enzyme xúc tác phản ứng cắt đứt liên kết β 1-4 glucoside trong mạch phân tử cellulose, được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như xử lý phế phẩm nông nghiệp, trong các ngành công nghiệp như trong sản xuất bia, chất tẩy, dệt, giấy, thực phẩm, nhiên liệu sinh học và cả trong y dược... (Kirk et al., 2002), (Cherry và Fidantsef, 2003). Cellulase được sinh ra bởi nấm, vi khuẩn, động vật nguyên sinh, thực vật và động vật. Nhiều nghiên cứu cho thấy nấm sợi có khả năng phân hủy rất tốt các cellulase tự nhiên, tuy nhiên, vi khuẩn có tốc độ sinh trưởng cao hơn nấm nên có tiềm năng lớn được dùng trong sản xuất cellulase.

Động vật nhai lại có khả năng tiêu hóa thức ăn có thành phần cellulose nhờ một hệ vi sinh vật rất phong phú, đa dạng cộng sinh trong dạ cỏ: nấm, vi khuẩn và nguyên sinh vật. Trong đó, nấm và vi khuẩn đóng góp 80% trong sự tiêu hóa thức ăn ở dạ cỏ, nguyên sinh vật chỉ chiếm 20% (Dijkstra và Tamminga, 1995). Nghiên cứu của Cheng và cộng sự (1991), Forsberg và Cheng (1992) chỉ ra *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* và *Ruminococcus albus* là những vi khuẩn có vai trò chính trong phân giải tế bào thực vật trong dạ cỏ. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng enzyme được sinh ra bởi các chủng *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* và *Fusarium* sp., phân lập từ dạ cỏ bò, cừu và dê có thể ứng dụng trong phân giải switchgrass, một nguồn nhiên liệu tái tạo mới. Nghiên cứu của Krushna Chandra Das và Wensheng Qi (2012) cho thấy vi khuẩn *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus* sp., và *Clostridium aminophilum* phân lập từ dịch dạ cỏ gia súc có thể sinh cellulase hoạt tính cao.

Từ những tiền đề và cơ sở trên cho thấy được tiềm năng to lớn của việc sử dụng vi khuẩn phân lập từ dạ cỏ bò phân giải rơm rạ sau thu hoạch để sản xuất cellulase. Biện pháp này không chỉ nghiên cứu hướng xử lý nguồn rơm thải bỏ mà còn tận dụng nguồn tài nguyên sinh khối dồi dào ở ĐBSCL, đem lại hiệu quả kinh tế.

Mục tiêu đề tài: tuyển chọn được dòng vi khuẩn phân lập từ dạ cỏ bò có khả năng thủy phân rơm hiệu quả cao. Những yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn và khả năng thủy phân rơm đều được tiến hành nghiên cứu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Rom: Mẫu rom thu được tại huyện Cờ đỏ, quận Ô Môn, thành phố Cần Thơ. Rom được xử lý rửa sạch chất bẩn, sấy khô và nghiền thành bột mịn để làm cơ chất nuôi vi khuẩn.

Nguồn vi khuẩn: 14 dòng vi khuẩn kỵ khí phân lập từ dạ cỏ trâu bò, được đánh số 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 49, 50, 51, 52. Vi khuẩn được trữ bằng glycerol 20%, nhiệt độ -20°C , tại phòng thí nghiệm Sinh hóa, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí

Cấy vi khuẩn trên môi trường thạch Delafield (2002) cải tiến, thành phần 5g/l CMC (Carboxymethyl Cellulose), 1g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g/l K_2HPO_4 , 0,5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001g/l NaCl. Vi khuẩn được ủ trong bình hút ẩm bên trong có đặt một ngọn lửa đèn cây để loại bỏ hoàn toàn oxy trong bình, tại nhiệt độ phòng, trong 2 ngày. Cấy chuyển vi khuẩn qua nhiều lần cho đến khi thu nhận được từng dòng vi khuẩn thuần nhất. Tiến hành mô tả hình thái khuẩn lạc, nhuộm Gram, quan sát hình dạng và chuyển động của vi khuẩn.

2.3. Xác định khả năng thủy phân rom của 14 dòng vi khuẩn

Thử khả năng thủy phân rom của 14 dòng vi khuẩn phân lập. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần cho mỗi dòng vi khuẩn. Cấy vi khuẩn sang dịch môi trường Delafield (2002) cải tiến bổ sung 0,5% bột rom và để ổn định tại nhiệt độ phòng trong 2 ngày. Cấy vi khuẩn sang môi trường agar Delafield 0,5% bột rom, ủ trong 5 ngày, nhiệt độ phòng. Sau đó, các đĩa petri được với nhuộm Congo Red để đánh giá khả năng thủy phân cellulose có trong rom của các dòng vi khuẩn kỵ khí thông qua độ lớn của đường kính vòng tròn thủy phân. Việc kiểm tra hoạt tính cellulase bằng việc đo đường kính vòng tròn thủy phân được tiến hành theo phương pháp đã miêu tả bởi Laurent et al. (2000).

2.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến dòng vi khuẩn tuyển chọn được

2.4.1. pH và nhiệt độ

Thử nghiệm sự tương tác của nhiệt độ và pH đến sự phát triển của dòng vi khuẩn tuyển chọn và hiệu suất thủy phân rom. Tiến hành bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 2 nhân tố, lặp lại 3 lần cho dòng vi khuẩn tuyển chọn. Cấy vi khuẩn trên môi trường agar

0,5% bột rom, pH môi trường 4,0-11,0. pH được điều chỉnh bằng dung dịch NaOH 5M và HCl 6M. Ủ đĩa petri tại điều kiện nhiệt độ 25-50°C, trong 5 ngày và tiến hành so sánh đường kính đường tròn thủy phân để xác định pH và nhiệt độ thích hợp.

2.4.2. Thời gian nuôi cấy

Thử nghiệm ảnh hưởng thời gian nuôi cấy đến sự phát triển của dòng vi khuẩn trên rom để đạt được hiệu quả thủy phân cao nhất. Tiến hành thí nghiệm trong thời gian 7 ngày, 3 lần lặp lại cho dòng vi khuẩn khảo sát. Vi khuẩn được nuôi trong 24 ống falcon 50ml môi trường Delafield (2002) cải tiến bột rom 0,5%. Sau mỗi ngày lấy ra 3 ống để đo mật số vi khuẩn, hàm lượng protein và đường khử sinh ra và hoạt tính CMCase.

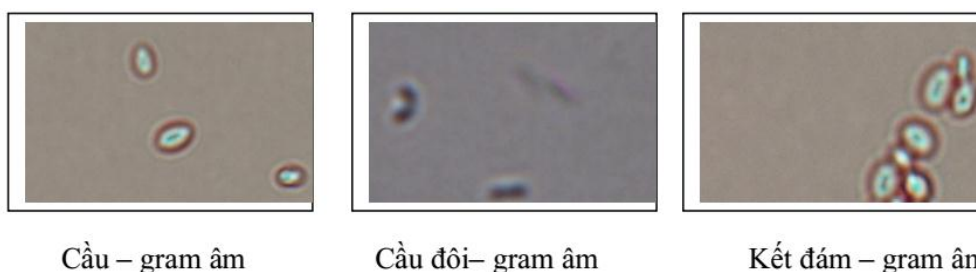
2.4.3. Bố trí thí nghiệm và phân tích thống kê

Tất cả số liệu thu được trong đề tài được phân tích thống kê ANOVA (Analysis of Variance) dưới bố trí thí nghiệm hoàn toàn ngẫu nhiên CRD (Completely Randomized Design). Tất cả thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị trung bình được so sánh bằng việc kiểm tra thống kê khác biệt có ý nghĩa LSDT (Least Significant Difference Test) bằng phần mềm *Statgraphic version 3.0*.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Khảo sát đặc tính sinh học của 14 dòng vi khuẩn.

Mười bốn dòng vi khuẩn phân lập là cầu khuẩn Gram âm, kết thành chuỗi (kết đám), bắt cặp hoặc riêng lẻ, đa số các dòng có khả năng chuyển động ngoại trừ ba dòng 30, 32, 39, 42. Trên môi trường thạch, khuẩn lạc có ba dạng: trắng sữa, vàng cam và vàng nhạt, bề mặt khuẩn lạc nhày, riêng dòng 39 có dạng sần cứng. Kết quả khảo sát được thể hiện trong Hình 1 và Bảng 1.



Hình 1. Hình thái vi khuẩn

Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc của 14 dòng vi khuẩn phân lập

STT	Vi khuẩn	Bề mặt	Độ nổi	Màu sắc khuẩn lạc
1	30	Nhày	Lài	Trắng sữa
2	31	Nhày	Mô	Trắng sữa
3	32	Nhày	Lài	Trắng sữa
4	33	Nhày	Lài	Vàng nhạt
5	36	Nhày	Lài	Vàng cam
6	37	Nhày	Lài	Trắng sữa
7	38	Nhày	Lài	Trắng sữa
8	39	Sần cứng	Lài	Trắng sữa
9	42	Nhày	Lài	Vàng cam
10	43	Nhày	Lài	Vàng nhạt
11	44	Nhày	Lài	Trắng sữa
12	49	Nhày	Mô	Vàng nhạt
13	51	Nhày	Lài	Trắng sữa
14	52	Nhày	Lài	Trắng sữa

3.2. Tuyển chọn dòng vi khuẩn kỵ khí có khả năng thủy phân rơm cao

Mười bốn dòng vi khuẩn đều tạo được đường tròn thủy phân trên môi trường CMC 1% có bổ sung Congo red Ind, cho thấy 14 dòng vi khuẩn phân lập đều có khả năng sinh cellulase để sử dụng cellulose (Võ Chí Đức, 2010). Tuy nhiên, khi thử nghiệm trên môi trường thạch rơm, chỉ có hai dòng 43 và 51 tạo được đường tròn thủy phân (Hình 2).



Hình 2. Đường kính đường tròn thủy phân của 2 dòng 51 và 43 sau 5 ngày ủ.

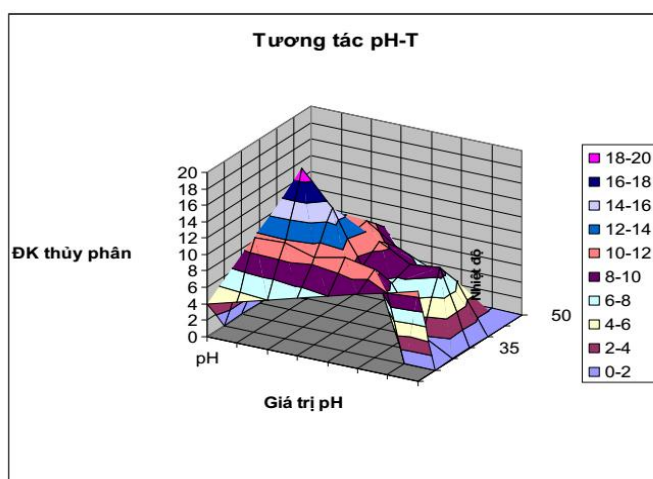
Đường tròn thủy phân của dòng 51 có đường kính 23,00mm. Đường kính đường tròn thủy phân của dòng 43 ở ba lần lặp lại là 13,00, 12,00 và 14,00mm. Kết quả thống kê cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa ở 5% đường kính đường tròn thủy phân của hai dòng 43 và 51. Tuy nhiên, dòng 51 chỉ tạo được 1 đường tròn thủy phân ở thí nghiệm 3 lần lặp lại, kém ổn định hơn so với dòng 43. Do đó, dòng 43 được chọn để khảo sát ở các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của dòng vi khuẩn 43 pH và nhiệt độ

pH và nhiệt độ là một trong những nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn và hoạt tính cellulase. Biểu đồ 1 cho thấy dòng 43 không tạo đường tròn thủy phân sau 5 ngày ủ trên môi trường pH 4,0 và 11,0. Tại pH 10,0, đường tròn thủy phân không xuất hiện ở các nhiệt độ 25, 25 và 50°C. Khả năng thủy phân rom của vi khuẩn tăng tại pH 5,0, 6,0 và giảm trong khoảng pH 7,0-10,0.

Về sự ảnh hưởng của nhiệt độ, sự thay đổi đường kính thủy phân cũng tương tự như với ảnh hưởng của giá trị pH. Giá trị trung bình đường kính vòng tròn thủy phân đạt cao nhất tại nhiệt độ 30°C sau đó giảm dần ở các nhiệt độ còn lại với mọi giá trị pH thay đổi.

Tóm lại, kết quả thí nghiệm đã chỉ ra rằng có sự ảnh hưởng tương tác giữa nhân tố pH và nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của dòng vi khuẩn 52. Giá trị pH 6,0 và nhiệt độ là 30°C (ứng với đường kính đường tròn thủy phân 26,33mm) được chọn bố trí cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo.



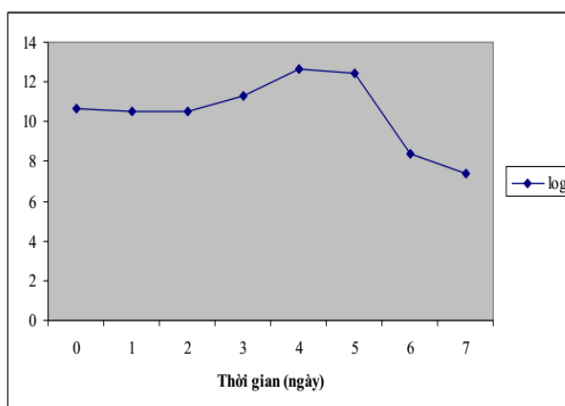
Biểu đồ 1. Ảnh hưởng pH và nhiệt độ đến đường kính đường tròn thủy phân của dòng vi khuẩn 43

Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy

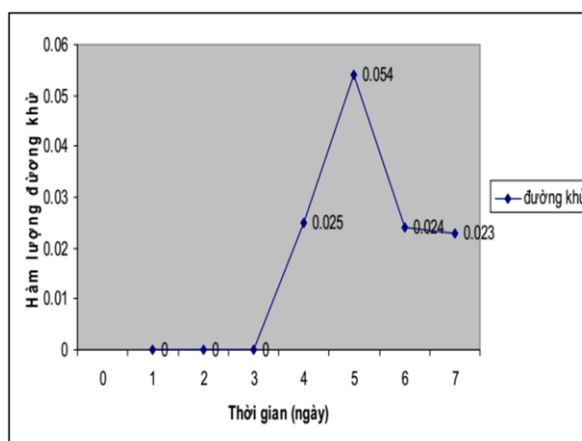
Kết quả nghiên cứu cho thấy dòng vi khuẩn 43 tăng trưởng chậm (Biểu đồ 2a). Giai đoạn tiềm phát kéo dài trong 2 ngày, mật số vi khuẩn giảm từ $4,5 \times 10^8$ CFU/ml (ngày 0) còn 3×10^8 CFU/ml (ngày 2). Tại ngày 3, vi khuẩn bước vào giai đoạn pha chỉ số, mật số vi khuẩn tăng lên 2×10^9 CFU/ml và đạt được cao nhất $4,5 \times 10^{10}$ CFU/ml (ngày 4). Mật số vi khuẩn giảm nhẹ trong ngày 5 $2,8 \times 10^{10}$ CFU/ml. Lượng đường khử sinh ra và hoạt tính CMCase tại ngày 1, 2, 3 đo được bằng 0 (Biểu đồ 2b, c). Hàm

lượng đường khử và hoạt tính CMCase tăng tuyến tính tại ngày 4, 5 và đạt được giá trị cao nhất tại ngày 5 0,054 μ g/ml, 0,006 U/ml. Tại ngày 6, 7, vi khuẩn bước vào pha suy vong, mật số vi khuẩn, hàm lượng đường khử sinh ra và hoạt tính CMCase đo được giảm mạnh (Biểu đồ 2a, b).

Tại ngày 5, mật số vi khuẩn đạt $2,8 \times 10^{10}$ CFU/ml thấp hơn ngày 4; tuy nhiên, hàm lượng đường khử sinh ra và hoạt tính CMCase đạt cao nhất 0,054 μ g/ml và 0,006 U/ml. Do đó, thời gian ủ thích hợp cho hiệu suất thủy phân rơm cao nhất của dòng 43 là 5 ngày.



Biểu đồ 2a. Đường cong tăng trưởng của dòng vi khuẩn 43



Biểu đồ 2b. Lượng đường khử sinh ra theo thời gian

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong 14 dòng vi khuẩn kỵ khí khảo sát, đề tài đã chọn được dòng vi khuẩn 43 có khả năng sinh cellulase cao nhất trên môi trường rơm. Việc sinh enzyme cellulase của dòng 43 là tốt nhất tại điều kiện nhiệt độ 30°C, pH 6,0 với thời gian ủ là 5 ngày.

4.2. Đề nghị

Tiến hành định danh dòng vi khuẩn 43. Khảo sát các nhân tố ảnh hưởng đến hiệu quả thủy phân rơm của vi khuẩn: phương pháp xử lý rơm, nồng độ rơm, mật độ vi khuẩn ban đầu để làm cơ sở tiến hành tách chiết và tinh sạch enzyme cellulase.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abhaykumar, V.K. and H.C. Dube, (1992). Cellulases of *Vibrio agar-liquefaciens* isolated from sea mud. *Microbiol. and Biotechnol.* (8): 313-315.
- Abidin, and T.J.Kempton. (1981). Effects of treatment of barley straw with anhydrous ammonia and supplementation with heat-treated protein meals on feed intake and liveweight performance of growing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 6:145:155.
- Akin, D. E., and R. Benner. (1988). Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:1117-1125
- Adebawale, E.A., Orskov, E.R. and P.M. Hoten. (1989). Rumen degradation of straw. 8: Effect of alkaline hydrogen peroxide on degradation of straw using either sodium hydroxide or gaseous ammonia as source of alkali. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 6:145:155.
- Abou-Taleb, A.A. Khadiga, W.A. Mashhoor, A. Sohair, M.S. Sharaf and H.M. Hoda, (2009). Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacilli. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3): 2429-2436.
- Amtul, J. S., (1989). Purification and Characterization of Microbial Cellulolytic Enzymes. Ph.D. Thesis, Institute of Chemistry, University of the Punjab Lahore – 1, Pakistan, pp: 176.
- Ariffin, H, N. Abdullah, M.S.U. Kalsom, Y. Shirai, M.A. Hassan, (2006). Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *Int. J. Eng. Tech.* 3(1):47-53.
- Azzaz, H.H., (2009). Effect of cellulolytic enzymes addition to diets on the productive performance of lactating goats. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt, pp: 141.

- Badhan, A.K., B.S. Chadha, K.G. Sonia, H.S. Saini and M.K. Bhat, (2004). Functionally diverse multiple xylanases of thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Enz. and Microbiol. Technol.* 35, 460–466.
- Bahkali, A.H., (1996). Influence of various carbohydrates on xylanase production by *V. tricorpus*. *Bioresource Technol.* 33(3): 265 - 268.
- Bauchop, T. (1979). The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. *Ann. Rech. Vet.* 10:246-248.
- Bauchop, T. (1981). The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agric. Environ.* 6:339-348.
- Cherry, J.R. and Fidantsef, A.L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, no. 4, p. 438-443.
- Kirk, O.; Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, no. 4, p. 345-351.
- Trần Sỹ Nam, Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Hữu Chiêm, Nguyễn Võ Châu Ngân, Lê Hoàng Việt và Kjeld Ingvorsen, (2014). ƯỚC TÍNH LƯỢNG VÀ CÁC BIỆN PHÁP XỬ LÝ RÔM RẠ Ở MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần A: Khoa học Tự nhiên, Công nghệ và Môi trường*: 32 (2014): 87-93