

NGHIÊN CỨU CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN VÀ NẤM MỐC CÓ HOẠT TÍNH CELLULOSE Ở KHU VỰC TÂY NAM VƯỜN QUỐC GIA KON KA KINH - GIA LAI

Nhận bài:

07 – 03 – 2017

Chấp nhận đăng:

28 – 06 – 2017

<http://jshe.ued.udn.vn/>

Trần Văn Vươn^{a*}, Ngô Thị Vân Kiều^a, Tạ Thị Hương^a, Nguyễn Thị Lan Phương^{a,b}

Tóm tắt: Cellulose là polyme sinh học phong phú trên trái đất được sinh tổng hợp chủ yếu bởi thực vật và tích lũy một lượng lớn trong đất. Vi sinh vật là một trong những tác nhân phân giải tích cực nhất loại hợp chất này. Nghiên cứu được thực hiện tại khu bảo tồn nhằm bước đầu tìm kiếm, ứng dụng và phát triển nguồn gen quý từ các khu hệ vi sinh vật ở đây. Từ 10 điểm thu mẫu được lấy tại khu vực Tây Nam Vườn Quốc gia Kon Ka Kinh Gia Lai, chúng tôi đã phân lập được 46 chủng gồm nấm mốc và xạ khuẩn có hoạt tính cellulase. Trong đó có 9 chủng xạ khuẩn và 10 chủng nấm mốc có khả năng chịu đựng tốt với các tác động từ môi trường. Đồng thời, 2 chủng C2 và G3 có khả năng sinh hoạt tính cellulase mạnh nhất được tuyển chọn để tạo chế phẩm vi sinh và cho hiệu quả xử lý tốt thành phần cellulose trong rác thải hữu cơ ở điều kiện hiếu khí.

Từ khóa: cellulose; vi sinh vật; xạ khuẩn; nấm mốc; vườn quốc gia Kon Ka Kinh.

1. Đặt vấn đề

Vườn Quốc gia (VQG) Kon Ka Kinh là khu vực được ưu tiên bảo tồn đa dạng sinh học của Việt Nam với những dãy núi cao và các hệ sinh thái rừng độc đáo [7]. Với những khảo cứu về các thảm thực vật và động vật thì việc bước đầu nghiên cứu sự đa dạng của hệ vi sinh vật trong khu vực này cũng góp phần bổ sung thông tin về sự đa dạng của thiên nhiên VQG Kon Ka Kinh. Bên cạnh đó, việc tìm ra các chủng vi sinh vật có nguồn gen quý để bảo tồn cũng như phát triển ứng dụng vào các lĩnh vực sinh học nói chung cũng là một hướng nghiên cứu mang lại ý nghĩa thực tiễn. Cellulose là một trong những thành phần không thể thiếu ở các VQG, chúng được tích lũy ở tầng thảm mục và là điều kiện thuận lợi cho nhiều nhóm sinh vật có khả năng phân giải cellulose sinh sống. Việc nghiên cứu các chủng xạ khuẩn và nấm mốc có hoạt tính cellulase ở khu vực phía Tây Nam, vườn quốc gia Kon Ka Kinh nhằm góp phần đánh giá sự đa dạng về loài của các chủng VSV bản địa, đồng thời

tìm ra được những chủng có hoạt tính cellulase mạnh, rất cần thiết để tạo chế phẩm vi sinh nhằm giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường do các nguồn thải gây ra [6, 10].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng nấm mốc và xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất ở các tiểu khu 432, 435, 436A tại khu vực Tây Nam, VQG Kon Ka Kinh.

2.2. Phương pháp thu mẫu

Mẫu được lấy từ đất, lá mục, rễ cây. Tại mỗi điểm, thu mẫu ở 5 vị trí khác nhau có bán kính 50m. Các điểm lấy mẫu cách nhau 1km, được xác định bằng GPS. Thu mẫu vào 2 đợt: mùa mưa và mùa khô.

Bảo quản mẫu ở 4°C và phân lập trong vòng 24h.

2.3. Phương pháp phân lập vi sinh vật

Mẫu thu về được phân tích và phân lập dựa trên phương pháp phân lập của Egorov [16].

Sử dụng môi trường Gause II, ISP4 để phân lập xạ khuẩn [11] và môi trường PDA, Czapeck để phân lập nấm mốc [11, 12].

2.4. Phương pháp giữ giống vi sinh vật

^aTrường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng

^b GMPA, INRA-AgroParisTech, Grignon, Pháp

* Liên hệ tác giả

Trần Văn Vươn

Email: tranvanvuon.cnsh@gmail.com

Để bảo quản chủng giống VSV cho những nghiên cứu tiếp theo, tiến hành cấy chuyển định kì trên môi trường thạch nghiêng, để ở tủ ẩm ở 28°C trong vòng 3-4 ngày cho đến khi hình thành các bào tử đối với nấm mốc, ở 30°C từ 7-14 ngày đối với xạ khuẩn. Sau đó bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C, cấy chuyển định kì để giữ giống [2].

2.5. Phương pháp xác định hoạt tính phân giải cellulose

Enzyme cellulase thủy phân CMC trong môi trường tạo thành vòng thủy phân màu vàng xung quanh lỗ đục đã được nhỏ dịch vi sinh vật và hiện màu bằng dung dịch lugol. Dựa vào hiệu số giữa đường kính vòng thủy phân (D) và đường kính lỗ đục mà ta xác định được hoạt tính cellulase của vi sinh vật [13].

2.6. Phương pháp nhận diện các chủng vi sinh vật

Nghiên cứu hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào, khả năng bắt màu thuốc nhuộm khi nhuộm gram... kết hợp với sử dụng các khóa phân loại Bergey (1989), Robert A. samson (1984), khóa phân loại Waksman [3, 8, 14].

2.7. Phương pháp xử lí sơ bộ rác thải hữu cơ từ chợ Đà Nẵng

Lựa chọn từ 2-4 chủng hoạt tính mạnh và không đối kháng nhau.

Thành phần môi trường lên men dịch thể Gause II đối với xạ khuẩn và PDA đối với nấm mốc có bổ sung 10% CMC.

Tiến hành bổ sung 10% giống cấp 2 từ nguồn giống cấp 1 đã được nuôi cấy 48h vào môi trường lên men dịch thể. Sau đó thu sinh khối sau 72h nuôi cấy lỏng.

Trọng lượng rác thải xử lí là 10kg. Bổ sung sinh khối thu được vào rác thải với tỉ lệ 1:10. Tiến hành xác định hàm lượng cellulose phân hủy qua 21 ngày ủ hiếu khí.

2.8. Phương pháp xác định hàm lượng cellulose

Sử dụng 10g mẫu nghiên cứu bổ sung 50ml NaOH 10% và 500ml nước cất; đun sôi 5 phút; lọc nhiều lần, thêm 50ml HCl và 500ml nước cất, sau đó đun sôi cách thủy trong 5 phút; lọc lại như trên, thêm 5ml NaClO, để hỗn hợp chờ tối trong 20 phút; lọc rửa lại lần nữa, đem đi clo hóa với NaClO trong 20 phút; rửa sạch với nước lạnh và 500ml H₂O₂ 2%, rồi rửa nước sôi. Cuối cùng cellulose còn lại được xác định bằng cách sấy khô ở 100°C và cân [1, 9].

2.9. Phương pháp xử lí số liệu

Số liệu nghiên cứu được tính toán thống kê bằng chương trình Excel 2013.

3. Kết quả

3.1. Phân bố của nấm mốc và xạ khuẩn tại phía Tây Nam VQG Kon Ka Kinh

Bảng 1. Phân bố xạ khuẩn và nấm mốc trên các điều kiện địa hình ở phía Tây Nam VQG Kon Ka Kinh

Mẫu	Tọa độ (UTM)		Độ cao (m)	Đặc điểm mẫu đất	Số chủng xạ khuẩn	Số chủng nấm mốc	Tổng số chủng thu được trên từng mẫu
	X	Y					
M1	0205587	1575006	1044	Mẫu đất ẩm, mịn, nhiều lá mục	3	3	6
M2	0205310	1574622	1018	Đất ướt, đen	4	1	5
M3	0206360	1576252	1115	Lớp thảm mục dày, ven suối đất ẩm	3	4	7
M4	0206384	1575735	1120	Đất ướt, hơi mịn	3	1	4
M5	0205998	1575244	1091	Đất ẩm, mềm	4	3	7
M6	0205290	1573997	1043	Đất khô, đất đỏ	2	1	3
M7	0205350	1573602	1014	Đất cứng, khô	1	2	3
M8	0205833	1573361	991	Đất khô, hơi mềm	2	2	4
M9	0206086	1573174	927	Đất khô, cứng	2	1	3
M10	0206466	1572731	900	Đất khô, cứng	2	2	4
Tổng cộng					26 chủng	20 chủng	46 chủng

Từ 10 điểm thu mẫu tại VQG Kon Ka Kinh tại các khu vực địa hình và trong điều kiện thời tiết khác nhau, chúng tôi đã phân lập được 46 chủng VSV trong đó có 26 chủng xạ khuẩn, 20 chủng nấm mốc có đặc điểm

hình thái đặc trưng, phân bố rộng ở nhiều điều kiện địa hình và thời tiết khác nhau (Bảng 1).

Như vậy, xét về sự phong phú số lượng, số chủng xạ khuẩn phân lập được nhiều hơn (26 chủng, chiếm

56,52% so với 20 chủng nấm mốc, chiếm 43,47% trong tổng số 46 chủng phân lập được). Sự phân bố vi sinh vật tại các điều kiện địa hình khác nhau có sự khác biệt rõ rệt (Bảng 1). Mẫu số 3 và số 5 phân lập được nhiều VSV nhất, gồm 7 chủng nấm mốc và xạ khuẩn, chiếm 15,21% so với tổng số mẫu phân lập được. Đây là các khu vực có độ cao tương đối, độ ẩm lớn và rừng có tán lá rộng.

Xét về sự phong phú theo mùa, chúng tôi nhận thấy vào mùa mưa khu hệ xạ khuẩn và nấm mốc đa dạng hơn so với mùa khô và có nhiều chủng có phạm vi phân bố rộng. Kết quả phân lập các mẫu được lấy vào mùa mưa cho thấy có tất cả 29 chủng, chiếm 63,04% số chủng phân lập (Bảng 2). Như vậy, độ ẩm có ảnh hưởng rõ rệt đến sự phân bố cũng như tính đa dạng của khu hệ vi sinh vật.

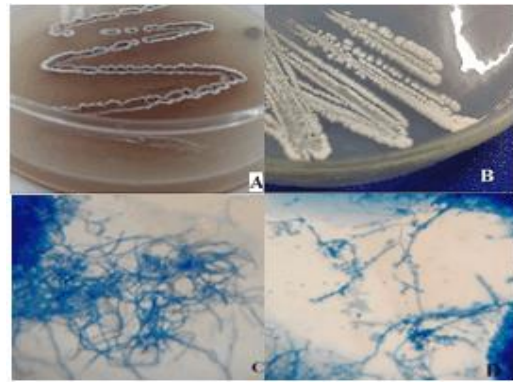
Bảng 2. Sự phân bố xạ khuẩn và nấm mốc theo mùa

Mùa	Số chủng xạ khuẩn	Số chủng nấm mốc	Tổng vi sinh vật phân lập theo mùa
Mùa mưa	17	12	29 chủng
Mùa khô	9	8	17 chủng

3.2. Phân loại các chủng xạ khuẩn, nấm mốc và xác định hoạt tính phân giải cellulose

3.2.1. Phân loại xạ khuẩn

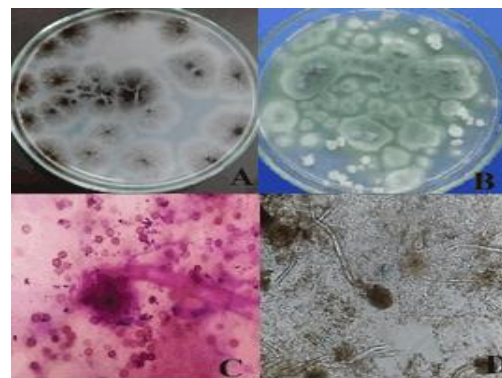
Từ sự quan sát hình thái khuẩn lạc, khả năng sinh sắc tố hòa tan, màu sắc khuẩn ty khí sinh, cuống sinh bào tử và dựa vào các khóa phân loại của Wasmann (1961) và Krassilnikov (1970) chúng tôi đã bước đầu xác định các chủng xạ khuẩn phân lập thuộc chi *Streptomyces*, có các đặc điểm nhận dạng: khuẩn lạc ban đầu thường trơn nhẵn nhưng sau đó khuẩn ty khí sinh sẽ phát triển mạnh mẽ làm khuẩn lạc sần sùi, hệ sợi sinh dưỡng phân nhánh nhiều lần, khuẩn ty tạo chuỗi từ ba đến nhiều bào tử, một số hình thành chuỗi bào tử ngắn trên khuẩn ty cơ chất.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và chuỗi bào tử được của các chủng đại diện được phân lập thuộc chi *Streptomyces*. Khuẩn lạc (A) và chuỗi bào tử (B) dạng bó được phân lập và quan sát trên môi trường GauseII. Khuẩn lạc (C) và chuỗi bào tử ngắn (D) được phân lập và quan sát trên môi trường ISP4.

3.2.2. Phân loại nấm mốc

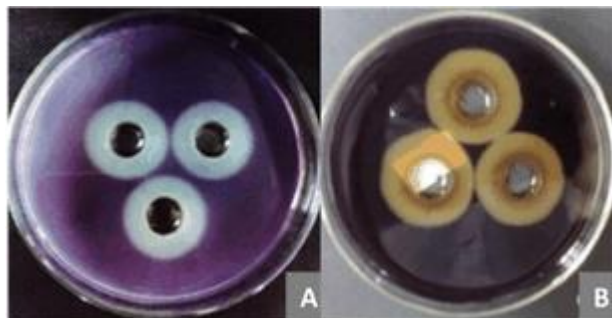
Dựa vào sự nghiên cứu về màu sắc hệ sợi, hình dạng khuẩn lạc, hệ sắc tố hòa tan, màu sắc khuẩn lạc, hình thái, màu sắc bào tử và cuống sinh bào tử cùng với đó là dựa vào khóa phân loại Robert A. Sam Son (1984); chúng tôi bước đầu xác định các chủng phân lập thuộc chi *Aspergillus*, các chủng này có khuẩn lạc phát triển màu lục, màu nâu hoặc màu trắng, hệ sợi màu trắng, thể bình một tầng và hai tầng, bong bóng giống hình chùy.



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc và chuỗi bào tử được của các chủng đại diện được phân lập thuộc chi *Aspergillus*. Khuẩn lạc (A) và hệ cuống sinh bào tử (C) được phân lập và quan sát trên môi trường Czapek. Khuẩn lạc (B) và cuống sinh bào tử (D) được phân lập và quan sát trên môi trường PDA.

3.2.3. Hoạt tính phân giải cellulose

Từ các chủng phân lập được, chúng tôi tiến hành đánh giá hoạt tính phân giải cellulose. Kết quả cho thấy tất cả 26/26 chủng xạ khuẩn và 20/20 chủng nấm mốc đều có khả năng sinh enzyme phân hủy loại hợp chất này. Trong đó, chủng xạ khuẩn G3 và chủng nấm mốc C2 là hai chủng đại diện có hoạt tính mạnh nhất, được thể hiện qua đường kính vòng phân giải trên cơ chất CMC như Hình 3. 2 chủng này được chúng tôi lựa chọn để ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học xử lý chất thải hữu cơ trong điều kiện hiếu khí.



Hình 3. Vòng phân giải trong suốt của xạ khuẩn G3 (A) và nấm mốc C2 (B) trên cơ chất CMC

3.3. Hiệu quả xử lý sơ bộ rác thải hữu cơ tại chợ Đầu mối Đà Nẵng

Để đánh giá hiệu quả ứng dụng của các chủng nghiên cứu, chúng tôi tiến hành bổ sung dịch sinh khối lỏng của vi sinh vật cơ chất là rác thải là rau củ quả hư thối thu thập tại các chợ đầu mối trên địa bàn thành phố Đà Nẵng, thông qua phương pháp ủ hiếu khí và kiểm tra đánh giá chỉ tiêu cellulose (Bảng 3):

Bảng 3. Sự thay đổi hàm lượng cellulose qua 21 ngày xử lý

Thời gian	0 ngày (%)	7 ngày (%)	14 ngày (%)	21 ngày (%)
Mẫu TN	34,7	29,5	21,4	12,3
Mẫu ĐC	34,7	33	31	29,2

Sau 21 ngày quan sát và phân tích mẫu đã cho thấy hiệu quả của việc bổ sung chế phẩm trong quá trình phân hủy rác thải hữu cơ, có tiềm năng trong việc nghiên cứu phát triển nhằm ứng nguồn giống vào sản xuất chế phẩm sinh học.

4. Kết luận

Qua các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Phân lập được tổng số 46 chủng xạ khuẩn và nấm mốc có khả năng phân giải cellulose từ 10 điểm thu mẫu thuộc khu vực phía Tây Nam VQG Kon Ka Kinh.

- Bước đầu phân loại các chủng các chủng xạ khuẩn vào chi *Streptomyces*, các chủng nấm mốc vào chi *Aspergillus*.

- Tuyển chọn và ứng dụng chủng G3, C2 để thử nghiệm xử lý rác thải hữu cơ tại chợ Đầu mối Đà Nẵng cho thấy kết quả tốt, có tiềm năng phát triển thành nguồn cung cấp giống.

Tài liệu tham khảo

- [1] Benko Z., Andersson A., Szengyel Z., Gaspar M., Reczey K. and Stalbrand H. (2007), "Heat extraction of corn fiber hemicellulose", Applied Biochemistry and Biotechnology, Volume 137-140, Numbers 1-12 / April.
- [2] Biên Văn Minh, Phạm Quang Chính (2009), "Nghiên cứu sự đa dạng sinh học của xạ khuẩn trong đất ở Bình Trị Thiên", Kỷ yếu Hội thảo Môi trường nông nghiệp- Nông thôn và đa dạng sinh học ở miền Trung Việt Nam, tr. 290-295.
- [3] D.H. Bergey, Noel R. Krieg, John G. Holt (1989), Bergey's manual of systematic bacteriology, Publisher: Baltimore, MD : Williams & Wilins.
- [4] Egorov N.X., Thực tập Vi sinh vật, NXB Mir, Maxcova. Nguyễn Lâm Dũng dịch, NXB ĐH&THCN Hà Nội, 1983.
- [5] Krassilnikov N A (1970), Radial Fungi (Higher Forms) Nauka, Moscow (in Russian).
- [6] M.A. Elberon, F. Malekzadeh, M.T. Yazdi, N. Kameranpour, M.R. Noori-Daloii, M.H. Matte, M. Shahamat, R.R. Colwell, K.R. Sowers (2000), Cellulomonas persica sp. nov. and Cellulomonas iranensis sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soils, J. Syst. Evol. Microbiol 50, 993.
- [7] Lê Vũ Khôi (2014), Vườn quốc gia Kon Ka Kinh, vùng đa dạng sinh học quan trọng của Tây Nguyên, NXB Nông nghiệp, tr.12-14.
- [8] Robert A. Samson at al (1984), Introduction Food - Borne Fungi, CBS, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- [9] Sun J. X. and Sun R. C. (2004), "Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse", Journal Polymer Degradation and Stability, Volume 84, Issue 2, Pages 331-339.

- [10] Trần Đình Toại, Trần Thị Hồng (2007), “Tương lai ứng dụng enzyme trong xử lý phế thải (Tổng quan)”, Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, số 23, tr.75-85.
- [11] Trịnh Thới An (2014), “Phân lập và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất kháng nấm *Pythium* sp”, Tạp chí Khoa học ĐHSPTPHCM, số 61, tr.113-121.
- [12] Vũ Duy Thanh, Nguyễn Thế Trang, “Định danh chủng *Bacillus* sp.hn16 và *Aspergillus* sp.hn18 phân lập từ không khí môi trường lao động”, Hội nghị Khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 6, tr.1655-1659.
- [13] Vũ Thúy Nga và cs (2011), Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm vi sinh để chế biến phế thải chăn nuôi làm phân bón hữu cơ sinh học tại các nông hộ ở Quý Hợp tỉnh Nghệ An, Báo cáo tổng kết, Dự án khoa học công nghệ nông nghiệp vốn vay ADB; tr.24-25.
- [14] Waksman, S. A. (1961), The actinomycetes. Vol. II, Classification, Identification, and Description of genera and species. Baltimore: Williams and Wilkins.

RESEARCHING CELLULASE - ACTIVE STRAINS OF ACTINOMYCETES AND MOLDS IN SOUTHWEST OF KON KA KINH NATIONAL PARK - GIA LAI

Abstract: Cellulose is the most abundant biological polymer on earth which is primarily biosynthesized by plants and then accumulated in soil with a large amount. Microorganisms are one of the most active decomposition agents in this compound. This research has been conducted at a reserve area as the first attempt to seek, apply and develop a source of valuable genes of the microorganism communities here. Based on 10 samples collected from the Southwest of Kon Ka Kinh National Park, Gia Lai has managed to isolate 46 microorganisms, among which 9 strains of actinomycetes and 10 strains of moulds show a high tolerance to environmental impacts. Besides, two strains C2 and G3 which are most capable of producing cellulase-activity have been selected to create bioproducts which exhibit an effective treatment of the cellulose component in aerobic organic waste.

Key words: cellulose; microorganism; actinomycete; moulds; Kon Ka Kinh National Park.