

NGHIÊN CỨU LỰA CHỌN CHỦNG VI KHUẨN *STREPTOMYCES* SP. CÓ HOẠT TÍNH CHUYỂN HOÁ CHẤT CACBON ĐỂ XỬ LÝ THAN Bùn

■ ThS. Trần Quốc Thành⁽¹⁾, ThS. Lê Minh Thanh⁽²⁾
ThS. Đàm Trọng Anh⁽³⁾, KS. Đàm Thị Huyền⁽³⁾



I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Than bùn là nguồn tài nguyên thiên nhiên của nước ta và nhiều nước trên thế giới. Than bùn là sản phẩm phân hủy của thực vật có màu đen hoặc nâu, là một hỗn hợp của thực vật đầm lầy đủ loại: mùn, vật liệu vô cơ và nước chưa bị phân hủy hoàn toàn trong điều kiện kỵ khí. Một trong những hướng sử dụng than bùn có ý nghĩa thiết thực là làm phân bón. Phân bón trên cơ sở than bùn kết

hợp với khoáng dinh dưỡng đã được sản xuất và sử dụng ở nhiều nước như Nga, Belarus, Mỹ... cho những kết quả khả quan. Than bùn có cấu trúc xốp, có khả năng trao đổi cation, cũng như chứa axit humic có hoạt tính sinh học nên khi đưa khoáng dinh dưỡng N, P, K (nitơ, photpho, kali) hoặc các nguyên tố vi lượng vào, những chất dinh dưỡng này được tồn giữ trong các lỗ xốp của than bùn và nhả dần ra cho cây trồng sử dụng, không bị tan nhanh và rửa trôi trong nước. Tuy nhiên, than bùn có hợp chất bitumic rất khó phân giải, nếu bón trực tiếp cho cây không những

⁽¹⁾ Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Nghệ An; ⁽²⁾ Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ Nghệ An

⁽³⁾ Viện Môi trường Nông nghiệp

không có tác dụng tốt mà còn làm giảm năng suất cây trồng. Để bón cho cây, người ta thường ủ than bùn cùng với phân chuồng, phân rác, phân bắc, nước giải sau đó mới đem bón cho cây. Trong quá trình ủ, hoạt động của các loài vi sinh vật làm phân hủy các chất có hại và khoáng chất hữu cơ tạo thành chất dinh dưỡng cho cây. Các chủng vi sinh vật này đảm bảo có khả năng phân giải các hợp chất cacbon trong than bùn, không gây ảnh hưởng đến môi trường và thực vật.

Từ thực tế trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu lựa chọn chủng xạ khuẩn *Streptomyces* có hoạt tính chuyển hóa chất cacbon trong than bùn. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. là các chủng được tìm thấy chủ yếu trong đất và thảm thực vật mục nát và là sinh vật phân hủy rất quan trọng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Bộ chủng giống xạ khuẩn sử dụng trong nghiên cứu gồm 7 chủng xạ khuẩn: *Streptomyces thermocoprophilus*, *Streptomyces lividoclavatus*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces griseosporus*, *Streptomyces badius*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces lydicus*.

- Nguyên liệu giàu cacbon được sử dụng trong nghiên cứu là mẫu than bùn được lấy từ mỏ. Thành phần hóa học trong than bùn gồm: Hàm lượng chất hữu cơ 55%, Hemicellulose 24,1%, Cellulose 17,1%, Lignin 18%, Hợp chất chứa N 0,8%, Humic acid 5%, pH 5,8%.

- Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm gồm: glucose, tinh bột, CMC, agar,

K₂HPO₄, KH₂PO₄, KCl, NaCl, NaOH, NaNO₃, MgSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O, lugol, thuốc thử DNS, nước cất,...

- Thành phần các môi trường sử dụng trong nghiên cứu:

Gause-TB: 20g/l tinh bột; 3g/l MgSO₄.7H₂O; 3g/l K₂HPO₄; 1g/l KNO₃; 0,5g/l NaCl; 0,01g/l FeSO₄.7H₂O, nước cất 1 lít.

Gause-CMC: K₂HPO₄ 1g/l, MgSO₄ 1g/l, NaCl 1g/l; (NH₄)₂SO₄ 2g/l; CaCO₃ 2g/l; FeSO₄ 0,1g/l; MnCl₂ 0,1g/l; ZnSO₄.7H₂O 0,1g/l; agar 20g/l và bổ sung cơ chất CMC 0,1%.

Môi trường chọn lọc 1: cao malt (48g/l), lignin kiềm (4g/l), CaCO₃ (2g/l) và toluidene blue (0,025g/l).

Môi trường ISP1 (g/l): tryptone 5, cao nấm men 3, agar 20, pH=7-7,2.

Môi trường ISP2 (g/l): cao nấm men 4, dịch chiết malt 10, glucose 4, agar 20, pH=7,3.

Môi trường ISP3 (g/l): bột yến mạch 20, agar 20, dung dịch muối vi lượng 1,0ml, pH=7.

Môi trường ISP4 (g/l): tinh bột tan 10, K₂HPO₄ 1, MgSO₄.7H₂O 1, NaCl 1, (NH₄)₂SO₄ 2, CaCO₃ 2, dung dịch muối vi lượng 1,0ml, agar 20, pH=7,5.

Môi trường ISP5 (g/l): L- asparagine 1, glycerine 10, K₂HPO₄ 1, dung dịch muối vi lượng 1,0ml, agar 20, pH=7-7,4.

Môi trường ISP6 (g/l): Petone 15, cao nấm men 1, amonium citrate sắt 0,5, K₂HPO₄ 1, Na₂S₂O₃ 0,08, agar 20, pH=7,0.

Môi trường ISP7 (g/l): Glycerine 15, L- tyrosine 0,5, L-asparagine 1, K₂HPO₄ 0,5, MgSO₄.7H₂O 0,5, NaCl 0,5; FeSO₄.7H₂O 0,01; dung dịch muối vi lượng 1,0ml; agar 20, pH=7,0.

Môi trường ISP9 (g/l): (NH₄)₂SO₄ 2,64; KH₂PO₄ 2,38; K₂HPO₄.3H₂O 5,65; MgSO₄.7H₂O 1,0; dung dịch vi lượng 1,0ml; agar 20; pH=7,0. Dung dịch muối vết (g/l): FeSO₄.H₂O 0,1; MnCl₂.4H₂O 0,1; ZnSO₄.7H₂O 0,1; nước cất 100ml.

- Dụng cụ thí nghiệm: nồi hấp vô trùng, bình tam

giác, ống nghiệm, đĩa petri, đèn cồn, que chang, que cấy, giấy quỳ, bông mỡ...

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp tuyển chọn chủng *Streptomyces* có khả năng chuyển hóa cơ chất giàu cacbon trong than bùn

Việc tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng chuyển hóa cơ chất giàu cacbon trong than bùn dựa trên việc xác định khả năng phân cắt cơ chất lignin và phân cắt cơ chất cellulose của các chủng xạ khuẩn. Các chủng xạ khuẩn có khả năng phân cắt mạnh cả 2 cơ chất trên được lựa chọn. Nguyên tắc: dựa vào sự khuếch tán enzyme trên môi trường thạch đĩa.

Các chủng xạ khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng Gause-TB ở 37°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 3 ngày. Dịch nuôi cấy ly tâm 5.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút, thu dịch lỏng phía trên được enzyme thô (Mekar et al., 2014).

a) Phương pháp xác định khả năng phân cắt cơ chất lignin của các chủng xạ khuẩn

Môi trường chọn lọc 1 được đục các lỗ trên đĩa petri. Nhỏ phần dịch enzyme thô vào các lỗ đã đục ở đĩa petri. Các đĩa được ủ ở 37°C trong 48 giờ, theo dõi cho sự tăng trưởng và sự phát triển của khuẩn lạc xạ khuẩn trên môi trường. Các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải lignin khi xuất hiện vòng phân giải (mất màu môi trường) xung quanh khuẩn lạc. Khả năng phân cắt cơ chất lignin được tính bằng đường kính vòng phân giải (ΔD) (Nyi, Wikwiek, 2014): $\Delta D = D - d$ (mm). Trong đó:

D: đường kính vòng phân giải (mm);

d: đường kính lỗ thạch (mm).

b) Phương pháp xác định khả năng phân cắt cơ chất cellulose của chủng *Streptomyces*

Nhỏ phần dịch enzyme thô vào các lỗ đã đục ở đĩa petri chứa môi trường Gause- CMC, đặt

các đĩa thạch ở 37°C. Sau 48 giờ, để đĩa petri vào tủ lạnh trong 12 giờ, sau đó cho vào tủ ẩm 40°C trong 6 giờ. Lấy ra, cho vào mỗi đĩa petri 5ml thuốc thử lugol, dàn đều khắp mặt thạch; để trong 15 phút rồi gạn bỏ hết thuốc thử trắng dung dịch Lugol. Quan sát vòng phân giải tạo thành.

Hoạt tính enzyme của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn được tính bằng đường kính vòng phân giải (ΔD) (Nyi, Wikwiek, 2014): $\Delta D = D - d$ (mm). Trong đó:

D: đường kính vòng phân giải (mm);

d: đường kính lỗ thạch (mm).

Trên cơ sở xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào, lựa chọn các chủng có đường kính vòng phân giải lớn nhất và ≥ 20 mm.

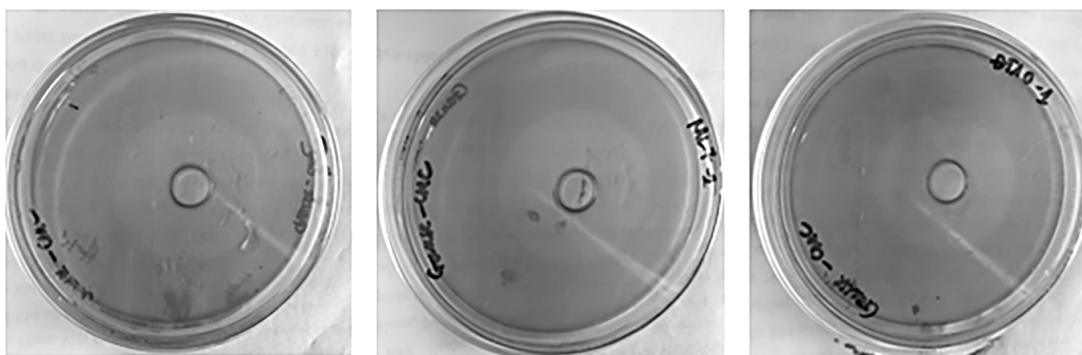
2.2. Phương pháp xác định khả năng lên men chuyển hóa cơ chất giàu cacbon trong than bùn của chủng *Streptomyces*

Xác định khả năng lên men chuyển hóa cơ chất giàu cacbon trong than bùn dựa trên năng suất tạo sản phẩm axit humic sau lên men.

Các chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn được nuôi cấy hoạt hóa trên môi trường nuôi cấy chọn lọc là Gause - TB. Dịch sau nuôi cấy được bổ sung vào hệ thống lên men than bùn (than bùn được nghiền nhỏ đến kích cỡ khoảng 74 μ m, hòa tan vào nước với tỷ lệ 10% trọng lượng/thể tích than bùn) dung tích 5 lít (tỷ lệ cấp giống 10% trọng lượng/thể tích).

Thực hiện lên men ở nhiệt độ 37°C, tốc độ khuấy 150 vòng/phút, mức cấp khí: 1 lít không khí/lít môi trường/phút, thực hiện nuôi cấy trong 48 giờ. Thực hiện lấy mẫu và phân tích hàm lượng axit humic, hàm lượng cellulose, hàm lượng lignin tại thời điểm ban đầu chưa cấp giống và ở thời điểm sau lên men 48 giờ.

2.3. Phương pháp nghiên cứu một số đặc điểm sinh lý, sinh thái của các chủng vi sinh vật được tuyển chọn



Hình 1. Hình ảnh thể hiện vòng phân giải cơ chất CMC của 3 chủng xạ khuẩn

Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy bao gồm: màu sắc của khuẩn ty khí sinh; màu sắc của khuẩn ty cơ chất; khả năng sinh sắc tố tan (Tresner and Backus, 1963) và sự hình thành sắc tố melanin trên môi trường GauseI, GauseII) và hệ thống môi trường ISP (1-7).

Xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường ISP9 có bổ sung các nguồn đường khác nhau như: D-glucose; Larabinose; saccarose; D-xylose; I-inositol; mannitol; rhamnose; raffinose; cellulose; lactose để xác định khả năng đồng hóa cacbon của chủng đã lựa chọn.

Phương pháp nhuộm Gram: nguyên tắc dựa trên sự khác nhau về cấu trúc của vách tế

bào nên trong quá trình nhuộm gram, vi khuẩn gram dương sẽ giữ được phức hợp tím gentians-iod không bị tẩy màu bởi cồn, trong khi vi khuẩn gram âm không giữ được phức hợp này. Do vậy, kết quả sau khi nhuộm là vi khuẩn gram dương vẫn giữ được màu tím của gentians, còn vi khuẩn gram âm bắt màu hồng của safranine. Cách tiến hành: Mẫu cần nhuộm được nhỏ trên lam kính, cố định mẫu bằng ngọn lửa đèn cồn, sau đó nhuộm bằng dung dịch tím gentian trong 1 phút, rửa nước, thấm khô. Tiếp tục cố định mẫu bằng lugol trong 30 giây, rửa nước, thấm khô. Nhỏ dung dịch tẩy màu ethanol 95%, giữ khoảng 30 giây cho đến khi vừa thấy mất màu. Nhuộm dung dịch đỏ safarin trong 1 phút, rửa nước, để khô.



Than bùn được chuyển hóa chất cacbon tạo thành dinh dưỡng cho cây

Cuối cùng quan sát dưới vật kính dầu với độ phóng đại 100x. Vi khuẩn gram âm sẽ bắt màu hồng, vi khuẩn gram dương sẽ bắt màu tím.

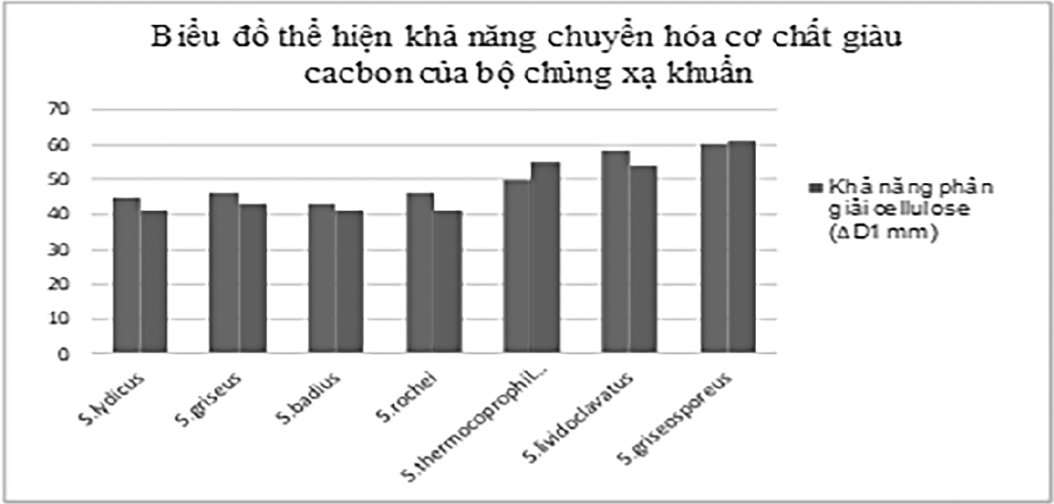
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Tuyển chọn vi sinh vật có khả năng chuyển hóa cơ chất giàu cacbon trong bùn

Từ quỹ gen chúng tôi đã tiến hành tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cơ chất giàu cacbon bao gồm lignin, cellulose. 7 chủng xạ khuẩn được tiến hành tuyển chọn, kết quả được tổng hợp trong bảng 1:

Bảng 1. Khả năng phân giải cơ chất lignin và cellulose của các chủng xạ khuẩn

TT	Vi sinh vật	Khả năng phân giải cellulose (ΔD1 mm)	Khả năng phân giải lignin (ΔD2 mm)
1	<i>S.lydicus</i>	45	41
2	<i>S.griseus</i>	46	43
3	<i>S.badius</i>	43	41
4	<i>S.rochei</i>	46	41
5	<i>S.thermocoprophilus</i>	50	55
6	<i>S.livido clavatus</i>	58	54
7	<i>S.griseosporeus</i>	60	61



Biểu đồ thể hiện khả năng chuyển hóa cơ chất giàu cacbon của bộ chủng xạ khuẩn

Số liệu bảng 1 và biểu đồ cho thấy, 3 chủng xạ khuẩn *S.thermocoprophilus*; *S.livido clavatus*; *S.griseosporeus* là những chủng vừa có hoạt tính phân giải cơ chất cellulose cao, vừa có hoạt tính phân giải lignin là mạnh (các vòng phân giải cellulose và lignin của 3 chủng đều lớn hơn 50mm). Chủng *S.griseosporeus* có khả năng phân giải mạnh nhất trong 7 chủng được nghiên cứu (vòng

phân giải cellulose là 60mm, vòng phân giải lignin là 61mm). Các chủng này được lựa chọn cho quá trình nghiên cứu tiếp theo.

Để phục vụ cho công tác nghiên cứu tiếp theo, một số đặc điểm sinh trưởng, phát triển của các chủng vi sinh vật lựa chọn được đánh giá và khảo sát. Kết quả được tập hợp trong bảng 2:

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn được chọn

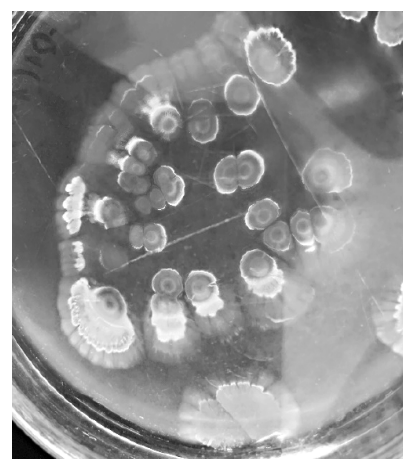
Đặc điểm sinh lý, sinh hóa	<i>S.thermophilus</i>	<i>S.lividoclavatus</i>	<i>S.griseosporus</i>
Glucose	+	+	+
Arabinose	+	+	+
Saccharose	-	-	-
Xylose	+	-	+
Inositol	+	-	-
Manitol	+	+	+
Fructose	+	+	+
Rafinose	-	-	-
pH tối ưu	7,0	7,5	7,5
Nhiệt độ phát triển tối ưu (°C)	30-35	35-40	35-40
Nhu cầu về ôxy	Hiếu khí	Hiếu khí	Hiếu khí
Gram	+	+	+
Cấp độ an toàn sinh học	2	2	2



Khuẩn lạc tròn, đường kính 2-2,5mm, màu trắng đục, tâm tròn xám, có mùi thơm ngái, chân khuẩn lạc bám sâu và chặt vào môi trường, bề mặt khuẩn lạc xốp có sợi nhỏ li ti.



Khuẩn lạc tròn, đường kính 2-2,5 mm, rìa ngoài màu trắng đục và không đều, tâm màu xanh, có mùi hắc, chân khuẩn lạc bám sâu, chặt vào môi trường.



Khuẩn lạc tròn, tâm màu trắng ngà, đường kính 2-2,2mm, rìa ngoài mọc thành sợi, có mùi hắc, chân khuẩn lạc bám sâu, chặt vào môi trường.

Hình 2. Đặc điểm khuẩn lạc của 3 chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

2. Xác định khả năng lên men chuyển hóa cơ chất giàu cacbon trong than bùn của chủng vi sinh vật

Qua quá trình nghiên cứu khả năng lên men chuyển hóa cơ chất giàu cacbon trong than bùn của các vi sinh vật tuyển chọn, chúng tôi nhận thấy rằng: Sau 48 giờ thực hiện quá trình lên men với cơ chất là than bùn,

hàm lượng axit được hình thành lớn, gấp 2-3 lần so với thời điểm ban đầu (thời điểm 0 giờ khi chưa bổ sung chủng vi sinh vật). Đồng thời, hàm lượng cellulose, hemicellulose, lignin, hàm lượng hữu cơ trong mẫu nghiên cứu đều có sự giảm nhất định. Điều này tiết lộ rằng các chủng vi sinh vật (*Streptomyces thermocoprophilus*; *Streptomyces lividoclavatus*; *Streptomyces griseosporus*) đã

phân cắt, chuyển hóa một cách hiệu quả các cơ chất giàu cacbon trong than bùn đến dạng sản phẩm cuối là axit humic. Cụ thể như sau:

- Chủng *S.thermocoprophilus* có khả năng phân cắt cơ chất giàu cacbon: hàm lượng chất hữu cơ giảm 27,3% sau 48 giờ lên men; hàm lượng các cơ chất là hemicellulose, cellulose và lignin giảm lần lượt là 21,2%, 33,9% và 44,4%. Ngoài ra, hàm lượng acids humic tạo thành sau 48 giờ lên men, tăng gấp 2,4 lần so với ban đầu khi chưa bổ sung chủng xạ khuẩn.

- Chủng *S.livido clavatus* có khả năng phân cắt cơ chất giàu cacbon: hàm lượng chất hữu cơ giảm 29,1% sau 48 giờ lên men; hàm lượng các cơ chất là hemicellulose, cellulose và lignin giảm lần lượt là 25,3%, 39,8% và 44,4%. Ngoài ra, hàm lượng acids humic tạo thành sau 48 giờ lên men tăng gấp 2,7 lần so với ban đầu khi chưa bổ sung chủng xạ khuẩn.

- Chủng *S.viridosporous* có khả năng phân cắt cơ chất giàu cacbon: hàm lượng chất hữu cơ giảm 29,5% sau 48 giờ lên men; hàm lượng các cơ chất là hemicellulose, cellulose và lignin giảm lần lượt là 25,3%, 39,8% và 44,4%. Ngoài ra, hàm lượng acids humic tạo thành sau 48 giờ lên men tăng gấp 3 lần so với ban đầu khi chưa bổ sung chủng xạ khuẩn.

IV. KẾT LUẬN

Từ quỹ gen các chủng *Streptomyces* của Viện Môi trường Nông nghiệp, đã tuyển chọn được bộ chủng vi sinh vật có khả năng chuyển hóa mạnh các cơ chất giàu cacbon trong than bùn và có hiệu suất cao trong tạo sản phẩm axit humic. Bộ chủng bao gồm 3 chủng *Streptomyces*: *Streptomyces thermocoprophilus*; *Streptomyces livido clavatus*; *Streptomyces griseosporeus*. Đồng thời các chủng *Streptomyces* được tuyển chọn trên đều có cấp độ an toàn (cấp 2). Như vậy, tổ hợp 3 chủng *Strepto-*

myces thermocoprophilus; *Streptomyces livido clavatus*; *Streptomyces griseosporeus* được tuyển chọn hoàn toàn có thể ứng dụng rộng rãi trong thực tế để xử lý than bùn./.

Lời cảm ơn

Các kết quả trình bày trong báo cáo này là một phần sản phẩm của nhiệm vụ khoa học và công nghệ theo Nghị định thư “Hợp tác nghiên cứu, ứng dụng công nghệ sản xuất phân hữu cơ khoáng dạng viên nén nhả chậm cho một số cây trồng chính tại tỉnh Xiêng Khoảng nước cộng hòa dân chủ nhân dân Lào”, mã số NĐT.93.LA/20. Tác giả cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ về sự hỗ trợ đó.

Tài liệu tham khảo

1. B. Saito¹ and M. M. Seckler, 2014. Alkaline extraction of humic substances from peat applied to organic - mineral fertilizer production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 31, No. 03, pp. 675-682
2. Bộ công thương, 2015. Quyết định số 1245/QĐ-BCT, phê duyệt quy hoạch thăm dò, khai thác, chế biến và sử dụng than bùn trên phạm vi cả nước đến năm 2020, tầm nhìn đến 2030.
3. Yan-Ling Liang, Zheng Zhang, Min Wu, Yuan Wu, and Jia-Xun Feng*, 2014. Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *BioMed Research International*. Volume 2014. 1-13pp.
4. Zuharlida Tuan Harith, Noor Azlina Ibrahim, Norazila Yusoff, 2014. Isolation and identification of locally isolated lignin degrading bacteria. *Journal of Sustainability Science and Management*. Volume 9 Number 2. ISSN: 1823-8556, 114-118pp.
5. <http://camnangcaytrong.com/tac-dung-cua-cac-chat-huu-co-va-axit-humic-trong-phan-bon-doi-voi-cac-loai-dat-nd71.html>
6. <http://camnangcaytrong.com/co-so-khoa-hoc-cua-viec-dung-than-bun-trong-nong-nghiep-nd223.html>