

Phân lập và sàng lọc vi khuẩn có khả năng oxy hóa khí methane gây hiệu ứng nhà kính

Isolation and screening of bacteria capable of oxidizing methane - causing greenhouse effect

Nguyễn Văn Minh^{1*}, Dương Nhật Linh¹, Đinh Thị Mai Anh¹,
Nguyễn Hoài Linh¹, Trần Kiên Đức^{2,3}

¹Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: minh.nv@ou.edu.vn

THÔNG TIN

DOI: 10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.18.2.2351.2023

Ngày nhận: 15/06/2022

Ngày nhận lại: 09/09/2022

Duyệt đăng: 30/12/2022

TÓM TẮT

Trong các năm gần đây, nồng độ khí methane tăng lên đột biến do các hoạt động sản xuất nông nghiệp, trong đó chăn nuôi có nguồn phát thải khí methane đáng kể, một trong những tác nhân chính gây ra sự phá hủy tầng ozone. Ở nghiên cứu này đã phân lập và sàng lọc được một số chủng vi khuẩn có khả năng oxy hóa methane (Methane Oxidizing Bacteria - MOB). Từ 56 mẫu bao gồm: đất bùn, mẫu đất trồng lúa, mẫu nước thải biogas, mẫu dạ cỏ và mẫu nước sông, chúng tôi đã phân lập được 370 chủng vi khuẩn có khả năng oxy hóa khí CH₄ trên môi trường dAMS với CH₄ là nguồn carbon duy nhất. Qua kết quả định lượng của 18/370 chủng vi khuẩn có khả năng làm giảm CH₄, trong đó có hai chủng TB18 và DC11 được phân lập từ đất trồng lúa và dạ cỏ có khả năng oxy hóa methane cao nhất ($32.6 \pm 0.25\%$, $30.2 \pm 0.14\%$). Kết quả của nghiên cứu này là tiền đề cho việc ứng dụng vi khuẩn MOB vào sản xuất chế phẩm vi sinh giảm phát thải khí CH₄ trong quá trình canh tác lúa hay trong chăn nuôi gia súc ở Việt Nam.

ABSTRACT

Từ khóa:

enzyme methane monooxygenase; giảm hiệu ứng nhà kính; Methanotrophs; phân lập; vi khuẩn oxy hóa methane

Keywords:

enzyme methane monooxygenase; greenhouse effect reduction; Methanotrophs; isolation; methane oxidizing bacteria

In recent years, methane concentration has increased rapidly due to agricultural production activities, in which livestock production is a significant source of methane emissions. Methane is the second-largest carbon compound in the atmosphere and 25 times more radiatively effective than carbon dioxide which is the main reason for ozone depletion. In this study, strains of bacteria capable of oxidizing methane (Methane Oxidizing Bacteria - MOB) were isolated and screened. From 13 samples of mud soil, 32 samples of rice land, 04 samples of biogas wastewater, 03 samples of the rumen, and 04 samples of river water, we isolated 370 bacterial strains capable of reducing CH₄ on dAMS medium with CH₄ being the sole carbon source. Quantitative results show that 19 bacterial strains can reduce CH₄ including two strains TB18 and DC11 isolated from rice soil and rumen have the highest ability to oxidize methane ($32.6 \pm 0.25\%$, $30.2 \pm 0.14\%$). The results of this study are the premise for the application of MOB bacteria in order to produce microbial products so that CH₄ emissions can be reduced in Vietnam's agriculture and raising cattle.

1. Giới thiệu

Hiệu ứng nhà kính là hiện tượng làm Trái Đất nóng lên, kết quả của sự trao đổi không cân bằng về năng lượng giữa Trái Đất với không gian xung quanh, sự gia tăng nồng độ các khí nhà kính (CO_2 , CH_4 , CFC, SO_2 , hơi nước, ...) làm dẫn đến sự gia tăng nhiệt độ của khí quyển Trái Đất, nó sẽ gây ra rất nhiều hậu quả. Khí CH_4 với lượng phát thải thấp hơn khí CO_2 nhưng có khả năng giữ nhiệt cao gấp 25 lần so với CO_2 và đang tăng lên trong không khí mỗi năm 0.6% (IPCC, 2013). Phát thải methane từ các quá trình phân hủy kỵ khí chất hữu cơ diễn ra ở nhiều điều kiện môi trường khác nhau, từ đất canh tác, đất rừng, đất ngập nước đến trầm tích các thủy vực, trầm tích biển, ... Bên cạnh đó, con người cũng đóng góp vào nguồn phát thải khí methane vào khí quyển, gồm các hoạt động sản xuất công nghiệp (chưng cất than đá, khai thác dầu mỏ), nông nghiệp (chất thải chăn nuôi, dạ dày của các loài nhai lại, canh tác lúa nước, ...) và các quá trình phân hủy chất thải hữu cơ (đốt sinh khối, bãi chôn lấp rác). Hoạt động sản xuất nông nghiệp là nguồn gây phát thải lượng khí nhà kính lớn nhất và được dự báo tiếp tục tăng trong những năm tiếp theo. Đặc biệt là canh tác lúa ngập nước gây phát thải trên 57% lượng khí nhà kính của cả ngành do phát thải lớn khí Methane (Mai, Tran, & Bui, 2013). Dân số ngày càng tăng dẫn đến việc trồng lúa nước cũng sẽ tăng 60% trong vòng 03 thập kỷ tới. Do đó, việc giảm thải CH_4 từ việc trồng lúa nước là vô cùng quan trọng để giảm thiểu biến đổi khí hậu.

Hiện nay, có nhiều phương pháp giảm thiểu khí methane như: phương pháp vật lý, hóa học như hấp thụ bằng cacbon hoạt tính hoặc đốt, tuy nhiên các phương pháp này có hiệu quả không cao và đòi hỏi chi phí cao. Trong khi đó, phương pháp ứng dụng công nghệ sinh học là một phương pháp có thể thay thế cho các phương pháp vật lý, hóa học vừa thân thiện với môi trường vừa tiết kiệm chi phí, dựa trên hoạt động của các vi khuẩn có khả năng oxy hóa methane (MOB). Các chủng vi sinh vật có hoạt tính oxy hóa khí methane có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất các chế phẩm vi sinh cho nông nghiệp trồng trọt, chăn nuôi, góp phần làm giảm lượng phát thải khí nhà kính.

Methanotrophs là nhóm vi khuẩn Gram âm sử dụng khí methane làm nguồn carbon và năng lượng duy nhất, do đó làm giảm lượng khí phát thải ra môi trường và góp phần giảm thiểu sự nóng lên toàn cầu (Trotsenko & Murrell, 2008). Các vi khuẩn Methanotrophs cũng được báo cáo sinh sống ở ruộng lúa (Frenzel, 2012), hồ (Oswald & ctg., 2016), đất ngập nước (Dedysh, 2009), hồ nước ngọt (Antony & ctg., 2012), đồng ủ compost (Kim, Han, Eom, & Kim, 2008), đầm lầy than bùn (Pytlak, Kuzniar, & Stepniewska, 2012), suối nước nóng (Hirayama & ctg., 2011) và trầm tích biển (Tavormina & ctg., 2015). Vi khuẩn oxy hóa methane (MOB) là nhóm vi sinh vật duy nhất sử dụng methane như nguồn năng lượng và cacbon để sinh trưởng ở điều kiện hiếu khí (Hanson & Hanson, 1996) bao gồm một số chi như: *Methylosphaera*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, ... Đây là nhóm tham gia chủ yếu vào chu trình chuyển hóa methane trong tự nhiên, do đó vi khuẩn oxy hóa methane đóng góp quan trọng trong kiểm soát phát thải methane toàn cầu (Hanson & Hanson, 1996). Methane Oxidizing Bacteria (MOB) là một tập hợp con của methylotrophs (Hanson & Hanson, 1996) và có khả năng sử dụng methane làm nguồn carbon và năng lượng duy nhất. Methanotrophs oxy hóa CH_4 thông qua enzyme methane monooxygenase (MMO) tồn tại dưới dạng chất hòa tan (sMMO) và dạng hạt (pMMO), cả hai đều oxy hóa methane (MOBs) chuyển hóa methane thành sinh khối tế bào và CO_2 , trong đó methanol là một chất trung gian (Semrau & ctg., 1995). Trong các sinh vật có cả enzyme sMMO và pMMO; khi nồng độ đồng quá cao sẽ làm chậm quá trình chuyển hóa methane nhờ enzyme sMMO của vi khuẩn và gây nên sự biểu hiện của pMMO gắn với màng intracytoplasmic; ngược lại khi nồng độ đồng thấp sẽ thúc đẩy quá trình chuyển hóa methane nhờ enzyme sMMO, biểu hiện và liên kết với methanobactins (Nielsen, Gerdes, & Murrell, 1997). Stepniewska, Goraj, Kuźniar, Łopacka, và Małysz (2017) đã phân lập được các chủng vi khuẩn *Methylomonas* sp. từ một số thực vật ở khu vực Hồ Moszne nằm ở phía tây bắc của Vườn Quốc

gia Poleski, Ba Lan có khả năng oxy hóa CH_4 từ 0.463 ± 0.067 đến 5.928 ± 0.169 $\mu\text{mol/L}$ $\text{CH}_4/\text{ml/ngày}$, tương đương giảm 70% CH_4 sau 06 ngày nuôi ủ. Theo nghiên cứu Adrian, Santoso¹, Akhdiya, và Wihardjaka (2021) đã phân lập được 15 chủng vi khuẩn MOB từ 03 canh tác lúa khác nhau, trong đó khả năng oxy hóa methane cao nhất là 23% sau 15 ngày ủ. Nguyen và Dinh (2016) đã phân lập được chủng vi khuẩn có khả năng oxy hóa khí methane nhằm nghiên cứu ứng dụng để tạo nguồn đạm vi sinh. Nhóm tác giả nhận thấy rằng khi sinh trưởng với methane và oxy, chủng vi khuẩn này đã sản sinh ra lượng sinh khối có hàm lượng protein thô cao (68.69%) với hiệu suất chuyển hóa methane là $2,805 \text{ m}^3/\text{kg}$ sinh khối khô.

Ở nghiên cứu này, từ các mẫu đất bùn, đất trồng lúa, nước thải biogas, mẫu dạ cỏ và mẫu nước sông, tiến hành phân lập và sàng lọc vi khuẩn có khả năng oxy hóa khí methane nhằm xây dựng bộ sưu tập các chủng vi khuẩn có hoạt tính mong muốn, làm tiền đề nghiên cứu chế phẩm vi sinh giúp giảm phát thải khí CH_4 trong trong chăn nuôi gia súc hay quá trình canh tác lúa ở Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Thu nhận 56 mẫu bao gồm: 13 mẫu đất bùn (ở Tây Ninh, Kiên Giang, Đà Lạt), 32 mẫu đất trồng lúa (ở Tây Ninh, Kiên Giang, Vĩnh Long, Đà Lạt), 04 mẫu nước thải biogas (ở Thành phố Thủ Dầu Một, Bình Dương, Vĩnh Long), 03 mẫu dạ cỏ (ở Tân Biên, Tây Ninh) và 04 mẫu nước sông (ở Thủ Đức, Bình Dương). Đối với mẫu đất được lấy sâu xuống dưới và cách mặt đất khoảng 20cm (Svenning, Warttinen, Hestnes, & Binnerup, 2003). Đối với mẫu nước được lấy và đựng bằng túi zipper hoặc hủ nhựa vô trùng có nắp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng oxy hóa khí methane

Môi trường phân lập và giữ giống vi khuẩn có khả năng oxy hóa khí methane là môi trường dAMS. Môi trường dAMS bao gồm: Salt stock 20mL, FeNaEDTA Stock 1mL, $\text{Na}_2\text{HPO}_4.12\text{H}_2\text{O}$ Stock 10mL, Trace solution 1mL, nước cất 968mL; trong đó Salt stock gồm: $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 10g/L, NH_4Cl 5g/L, $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ 1.5g/L; FeNaEDTA 0.5g/100mL; $\text{Na}_2\text{HPO}_4.12\text{H}_2\text{O}$ 71.7g/L; Trace solution gồm: $\text{Na}_2\text{EDTA}.2\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L, H_3BO_3 0.03g/L, $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ 0.02g/L, $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L, $\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ 0.003g/L, $\text{NaMoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ 0.003g/L, $\text{NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ 0.002g/L, CuSO_4 2.5g/L.

Đối với mẫu đất, đất bùn, dạ cỏ: Cân 3g mẫu cho vào bình serum chứa 10ml môi trường dAMS, đậy kín bằng nút cao su silicon (Leadbetter & Foster, 1958). Hút khí trong bình ra bằng kim tiêm và bơm CH_4 qua màng lọc $0.2\mu\text{m}$ vào bình, tỉ lệ CH_4 với không khí bình là 50:50 hoặc 70:30, nuôi ủ lắc ở 30°C từ 03 đến 07 ngày (Dianou, Espiritu, Adachi, & Senboku, 1997).

Đối với mẫu nước sông, nước thải biogas: Hút 3ml mẫu cho vào bình serum chứa 10ml môi trường dAMS có bổ sung khí CH_4 tương tự như đối với mẫu đất bùn, tiến hành nuôi ủ lắc ở 30°C từ 03 đến 05 ngày.

Sau 03 - 05 ngày nuôi ủ, tiến hành hút 05 - 10ml dịch nuôi vào bình chứa 45ml môi trường dAMS có bổ sung tỉ lệ khí CH_4 trong bình 30 - 50% , 03 - 05 ngày lặp lại một lần. Sau khoảng 25 ngày nuôi ủ, pha loãng dịch nuôi đến độ pha loãng đến nồng độ pha loãng 10^{-5} . Tiến hành cấy trải 100 μL dịch ở các nồng độ pha loãng lên môi trường dAMS agar, nuôi ủ ở 30°C trong hộp kín có bổ sung 30 - 50% khí CH_4 . Khi xuất hiện các khuẩn lạc mọc trên môi trường, tiếp tục cấy phân lập sang môi trường dAMS agar (Dedysh & Dunfield, 2011).

2.2.2. Định lượng khả năng làm khí methane của các vi khuẩn oxy hóa methane

Vi khuẩn oxy hóa khí methane đã phân lập được nuôi trong bình có nắp cao su và kẹp nhôm chứa 100ml dAMS và 50 - 70% khí CH₄. Đậy kín nắp lọ, ủ 30°C, nuôi lắc 200 vòng/phút.

Sau khi bổ sung khí CH₄, tiến hành lấy mẫu khí gửi đi phân tích lần 01 tại Viện Công nghệ Hóa học. Mẫu khí được phân tích bằng phương pháp sắc kí khí GC, đầu dò FID và sau khi phân tích lần 01, tiến hành bổ sung 5 - 10ml vi khuẩn. Hỗn hợp phản ứng được phân tích trên máy phân tích sắc ký khí Agilent Technologies 6890 Plus, máy được trang bị phần mềm GC Chem Station để xử lý số liệu, tại Viện Công nghệ Hóa học. Phân tích CH₄ sử dụng detector ion hóa ngọn lửa FID và cột mao quản DB-624 (chiều dài 30m, đường kính trong của cột 250µm, độ dày lớp phim 0.32µm) với chế độ hoạt động: Nhiệt độ lò 60°C; Áp suất 20.0 PSI; Tỷ lệ chia dòng 25/1; Nhiệt độ buồng tiêm 250°C; Nhiệt độ đầu dò 250°C; và khí mang N₂. Thể tích mẫu bơm phân tích: 0.2mL.

Sau 07 ngày nuôi ủ, tiếp tục lấy mẫu khí gửi đi phân tích lần 02 để xác định % CH₄ giảm.

3. Kết quả và thảo luận

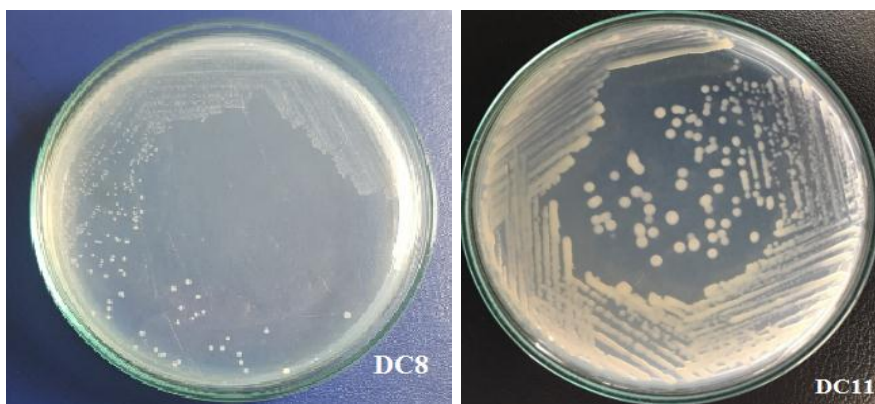
3.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng oxy hóa methane

Từ 56 mẫu được thu thập, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 370 chủng vi khuẩn trên môi trường dAMS với CH₄ là nguồn carbon duy nhất. Trong bộ sưu tập chủng vi khuẩn đã phân lập có 177 chủng vi khuẩn Gram dương và 183 chủng vi khuẩn Gram âm. Kết quả được thể hiện qua Bảng 1. Các chủng vi khuẩn phân lập được từ mẫu nước thải biogas, hầu hết các chủng ở mẫu này có hình thái đại thể đều bóng ướt với màu trắng trong và trắng đục, khuẩn lạc nhỏ. Các chủng thu được từ mẫu dạ, hầu hết các chủng từ mẫu này có hình thái đại thể đều bóng ướt, có nhiều màu sắc và khuẩn lạc nhỏ. Kết quả quan sát đại thể, vi thể của một số chủng vi khuẩn phân lập được mô tả ở Hình 1, 2 và 3.

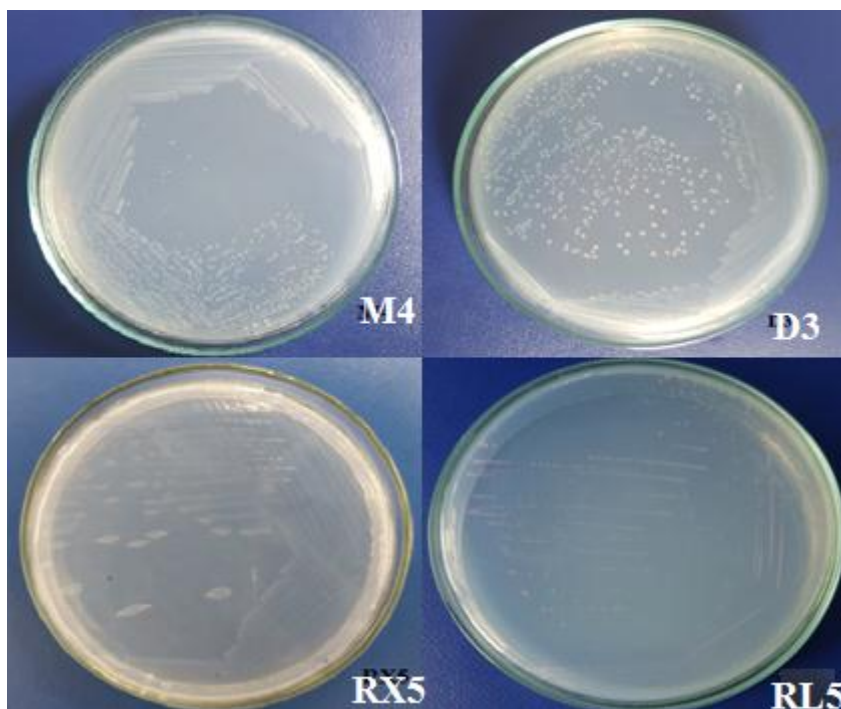
Bảng 1

Kết quả phân lập các chủng vi sinh vật

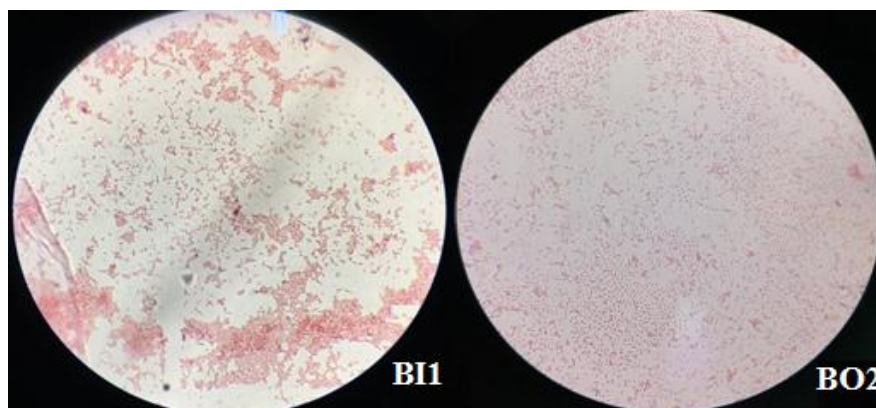
Mẫu	Số mẫu	Số chủng thu được	Gram dương	Gram âm
Nước thải biogas	4	37	17	10
Đất bùn	13	105	58	47
Đất trồng lúa	32	190	78	112
Dạ cỏ	3	18	9	9
Nước sông, nước kênh	4	20	15	5
Tổng cộng	56	370	177	183



Hình 1. Khuẩn lạc của chủng vi khuẩn DC8 và DC11 phân lập từ mẫu dạ cỏ trên môi trường dAMS



Hình 2. Khuẩn lạc một số chủng vi khuẩn từ mẫu đất bùn và đất trồng lúa ở Tây Ninh trên môi trường dAMS



Hình 3. Kết quả nhuộm Gram chủng vi khuẩn BI1 và BO2 phân lập từ mẫu nước thải biogas trên môi trường dAMS

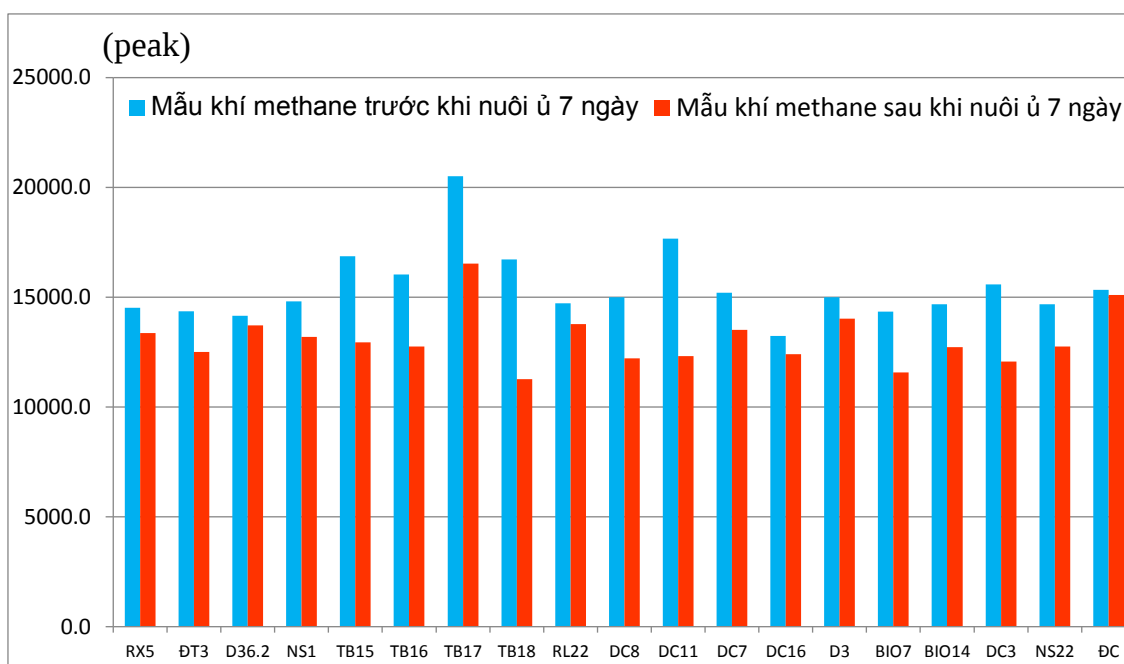
Năm 2012, Dianou, Ueno, Ogiso, Kimura, và Asakawa đã phân lập từ mẫu đất trồng lúa được các chủng vi khuẩn MOB, các chủng này có màu sắc đa dạng (trắng đục, vàng, hồng, tím, cam) và chủ yếu các khuẩn lạc đều tròn và bóng ướt. Ở nghiên cứu này, kết quả thu được khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn được phân lập từ đất bùn và đất trồng lúa đều có nhiều màu sắc và khuẩn lạc nhỏ có sự đặc điểm tương đồng với kết quả nghiên cứu của Dianou và cộng sự (2012).

Kết quả quan sát vi thể của các chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu đất bùn và đất trồng lúa của nhóm nghiên cứu cũng có hình dạng và cách sắp xếp là cầu khuẩn, trực khuẩn, trực ngắn, trực mảnh, tương tự với nghiên cứu của Dianou và cộng sự (2012).

3.2. Định lượng khả năng oxy hóa methane của các chủng vi khuẩn oxy hóa methane

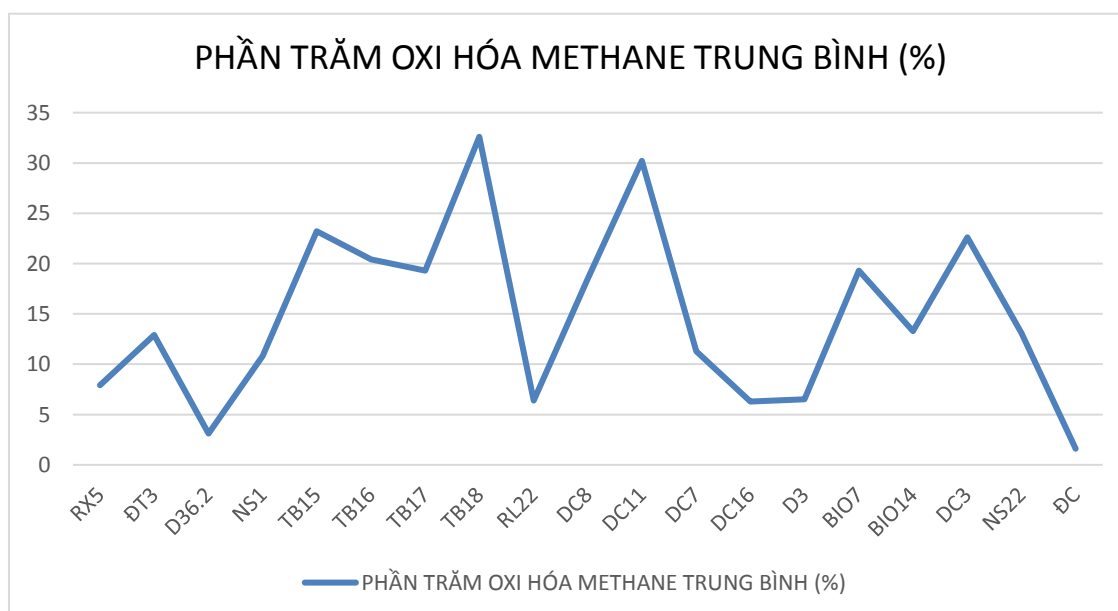
Từ 370 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường dAMS có CH₄ là nguồn carbon duy nhất, nhóm nghiên cứu tiến hành gửi mẫu định lượng khí methane chủng vi khuẩn thử nghiệm trước và sau 07 ngày nuôi cấy. Chúng tôi tiến hành gửi 19 mẫu kiểm tra khí methane trong các bình serum

chứa chủng vi khuẩn thử nghiệm trước và sau 07 ngày nuôi cấy (trong đó bao gồm 18 chủng vi khuẩn ngẫu nhiên đại diện các nguồn mẫu (RX5, ĐT3, D36.2, NS1, TB15, TB16, TB17, TB18, RL22, DC8, DC11, DC7, DC16, D3, BIO7, BIO14, DC3, NS22) và 01 mẫu đối chứng), kết quả so sánh lượng khí methane của các bình serum chứa chủng thử nghiệm trước và sau khi nuôi ủ được thể hiện qua Hình 4.



Hình 4. So sánh số liệu kiểm tra khí methane của các chủng thử nghiệm trước và sau khi nuôi ủ 07 ngày

Từ kết quả Hình 4 cho thấy: Mẫu khí methane sau khi nuôi ủ 07 ngày của 19 chủng giảm so với mẫu khí methane trước khi nuôi ủ. Từ kết quả như trên, tiến hành định lượng phần trăm oxy hóa methane của 18 chủng vi khuẩn có khả năng làm giảm khí methane và mẫu đối chứng. Kết quả được thể hiện ở Hình 5.



Hình 5. Kết quả khả năng oxy hóa methane của các chủng oxy hóa methane đã phân lập

Từ kết quả Hình 5 cho thấy: Từ 370 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường dAMS có CH₄ là nguồn carbon duy nhất, nhóm nghiên cứu đã định lượng khả năng oxy hóa methane của 18 chủng vi khuẩn ngẫu nhiên đại diện các nguồn mẫu, hầu hết các chủng đều có khả năng oxy hóa methane từ $3.1 \pm 0.69\%$ đến $32.6 \pm 0.25\%$. Tất cả các chủng đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu Đối Chứng (ĐC). Trong đó: Hai chủng TB18, DC11 có khả năng oxy hóa methane cao nhất lần lượt là: $32.6 \pm 0.25\%$, $30.2 \pm 0.14\%$ và thấp nhất là chủng D36.2 ($3.1 \pm 0.69\%$), sự khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng với mức ý nghĩa $p = 0.000 < p = 0.05$. Các chủng vi khuẩn còn lại trong bộ sưu tập sẽ tiếp tục được định lượng khả năng oxy hóa methane và so sánh, tuyển chọn chủng vi khuẩn oxy hóa metan cao nhất.

Các vi khuẩn oxy hóa metan đóng vai trò quan trọng trong quá trình làm giảm lượng khí phát thải gây hiệu ứng nhà kính. Vi khuẩn oxy hóa metan có nhiều ứng dụng công nghệ sinh học tiềm năng, chủ yếu là trong ba lĩnh vực: giảm thiểu sinh học khí nhà kính methane, sản xuất các sản phẩm giá trị cao từ methane và xử lý sinh học các chất ô nhiễm (Jiang & ctg., 2010; Wendlandt & ctg., 2010). Theo nghiên cứu của Hoefman, van der Ha, De Vos, Boon, và Heylen (2012) đã phân lập được 22 chủng MOB từ bể khử nitơ của nhà máy xử lý nước thải, mẫu bùn ủ hiếu khí, bộ lọc sinh học của bể phân hủy kỵ khí và lớp trên của vùng đất ướt. Theo nghiên cứu của Stępniewska và cộng sự (2017) đã phân lập được các chủng vi khuẩn *Methylomonas* sp. từ bộ cây cỏ có khả năng oxy hóa CH₄ từ 0.463 ± 0.067 đến 5.928 ± 0.169 $\mu\text{mol/L CH}_4/\text{ml/ngày}$, tương đương giảm 70% CH₄ sau 06 ngày nuôi ủ. Theo nghiên cứu của Le, Nguyen, và Nguyen (2018) đã phân lập được 04 chủng vi khuẩn từ các mẫu nước thải, hầm biogas, bùn lúa và dạ cỏ có khả năng oxy hóa khí methane, trong đó chủng vi khuẩn S15b có khả năng oxy hóa cao nhất (53.2%), được định danh sinh học phân tử tương đồng với loài *Dyadobacter sediminis*. Theo nghiên cứu Adrianly và cộng sự (2021) đã phân lập được 15 chủng vi khuẩn MOB từ 03 canh tác lúa khác nhau, trong đó khả năng oxy hóa methane cao nhất là 23% sau 15 ngày ủ. Vi khuẩn oxy hóa metan được kỳ vọng là một công nghệ để giảm lượng khí thải CH₄ từ ruộng lúa.

Trong nghiên cứu này, nhóm chúng tôi đã tiến hành lấy các mẫu ở những nơi có lượng phát thải khí CH₄ cao nhằm giúp gia tăng khả năng phân lập được các chủng vi khuẩn có khả năng oxy hóa methane. Qua đó, có thể thấy được ở nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 370 chủng vi khuẩn trên môi trường dAMS với CH₄ là nguồn carbon duy nhất, từ 18 chủng gửi mẫu định lượng khả năng làm giảm khí methane cho thấy có 18 chủng có khả năng giảm khí methane, trong đó hai chủng TB18 và DC11 được phân lập từ đất trồng lúa và dạ cỏ có khả năng oxy hóa methane cao nhất ($32.6 \pm 0.25\%$, $30.2 \pm 0.14\%$) so với các mẫu khác, kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Adrianly và cộng sự (2021). Theo nghiên cứu của Khatri, Mohite, Pandit, Bahulikar, và Rahalkar (2021) đã phân lập được chủng vi khuẩn B1B1 từ phân của một con linh dương Ấn Độ, được định danh trình tự vùng gen 16S rRNA tương đồng với *Methylobacter marinus* (Khatri & ctg., 2021). Những nghiên cứu gần đây cho thấy dưới điều kiện ngập nước kéo dài thì lượng chất hữu cơ gia tăng, lượng đường chất thừa có thể tích tụ chuyển hóa thành CH₄ gây hiệu ứng nhà kính. Mặt khác, có sự khác biệt về khả năng oxy hóa methane của mỗi chủng phân lập cũng bị ảnh hưởng bởi loại enzyme MMO. Vi khuẩn Methanotrophic có thể được ứng dụng trong các quá trình phân hủy sinh học các chất ô nhiễm hữu cơ chủ yếu dựa vào enzyme methanooxygenase của vi khuẩn MOB, thúc đẩy các phản ứng oxy hóa đặc hiệu khác nhau (Hanson & Hanson, 1996). Trong vi khuẩn MOB có hai dạng methane monooxygenase (MMO): một dạng hòa tan (sMMO) và một dạng hạt (pMMO). MOB sử dụng enzyme methane monooxygenase (MMO) cho quá trình oxy hóa bước đầu, chuyển methane thành methanol diễn ra ở màng nội bào (Dong, Ding, Wang, Chi, & Lei, 2015; Horz, Yimga, & Liesack, 2001). Methanotrophs có khả năng sử dụng khí

methane làm nguồn năng lượng carbon duy nhất nhờ enzyme sMMO và enzyme pMMO tham gia vào quá trình chuyển hóa (Dong & ctg., 2015; Hanson & Hanson, 1996). Ngoài ra, lượng oxy sẵn có cũng có thể ảnh hưởng đến quá trình oxy hóa methane trên ruộng lúa. Oxy là một yếu tố giới hạn rất quan trọng để vi khuẩn methanotrophic chuyển methane thành carbon dioxide, nước, sinh khối tế bào, và lấy năng lượng để tăng trưởng (Auman, Speake, & Lidstrom, 2001; Serrano-Silva, Sarria-Guzmán, Dendooven, & Luna-Guido, 2014).

4. Kết luận

Từ các mẫu đất bùn, đất trồng lúa, nước thải biogas, dạ cỏ và nước sông, nhóm nghiên cứu này đã phân lập được 370 chủng vi khuẩn tiềm năng trên môi trường dAMS với CH₄ là nguồn carbon duy nhất. Kết quả xác định khả năng làm giảm CH₄ của 18 chủng vi khuẩn ngẫu nhiên đại diện các nguồn mẫu cho thấy đều có khả năng oxy hóa methane, trong đó hai chủng TB18 và DC11 được phân lập từ đất trồng lúa và dạ cỏ có khả năng oxy hóa methane cao nhất. Kết quả của nghiên cứu này giúp xây dựng đa dạng bộ sưu tập các chủng vi khuẩn có khả năng oxy hóa methane, làm tiền đề nghiên cứu ứng dụng chế phẩm vi sinh giúp giảm phát thải khí CH₄ trong chăn nuôi gia súc, quá trình canh tác lúa hay các nhà máy xử lý rác ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường Đại học Mở Thành Phố Hồ Chí Minh tài trợ trong đề tài mã số T2019.03.2.

Tài liệu tham khảo

- Adriany, T. A., Santoso1, A. A., Akhdiya, A., & Wihardjaka, A. (2021). Preliminary study of methane oxidizing bacteria isolation and selection on three rice agroecosystems. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 648(1), 1-7. doi:10.1088/1755-1315/648/1/012173
- Antony, C. P., Doronina, N. V., Boden, R., Trotsenko, Y. A., Shouche, Y. S., & Murrell, J. C. (2012). *Methylophaga lonarensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic methylotroph isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(7), 1613-1618. doi:10.1099/ij.s.0.035089-0
- Auman, A. J., Speake, S. S., & Lidstrom, M. E. (2001). nifH sequences and nitrogen fixation in type I and type II Methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4009-4016.
- Dalton, H. (2005). The Leeuwenhoek Lecture 2000 - The natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1458), 1207-1222.
- Dedysh, S. N. (2009). Exploring methanotroph diversity in acidic northern wetlands: Molecular and cultivation-based studies. *Microbiology*, 78(6), 655-669.
- Dedysh, S. N., Dunfield, P. F. (2011). Facultative and obligate methanotrophs: How to identify and differentiate them. *Methods in Enzymology*, 495(3), 31-44.
- Dianou, D., Espiritu, B. M., Adachi, K., Senboku, T. (1997). Isolation and some properties of methane-oxidizing bacteria from a subtropical paddy field. *Soil Science Plant Nutrition*, 43, 735-740.

- Dianou, D., Ueno, C., Ogiso, T., Kimura, M., & Asakawa, S. (2012). Diversity of cultivable methane-oxidizing bacteria in microsites of a rice paddy field: Investigation by cultivation method and Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). *Microbes and Environments*, 27(3), 278-287.
- Dong, J., Ding, L., Wang, X., Chi, Z., & Lei, J. (2015). Vertical profiles of community abundance and diversity of anaerobic methanotrophic archaea (ANME) and bacteria in a simple waste landfill in North China. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(5), 2729-2740.
- Frenzel, P. (2012). Plant-associated methane oxidation in rice fields and wetlands. *Advances in Microbial Ecology*, 16, 85-114.
- Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiology Reviews*, 60(2), 439-471.
- Hirayama, H., Suzuki, Y., Abe, M., Miyazaki, M., Makita, H., Inagaki, F., ... Takai, K. (2011). *Methylothermus subterraneus* sp. nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated from a terrestrial subsurface hot aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(11), 2646-2653. doi:10.1099/ij.s.0.028092-0
- Hoefman, S., van der Ha, D., De Vos, P., Boon, N., & Heylen, K. (2012) Miniaturized extinction culturing is the preferred strategy for rapid isolation of fast-growing methane-oxidizing bacteria. *Microbial Biotechnology*, 5(3), 368-378.
- Horz, H. P., Yimga, M. T., & Liesack, W. (2001). Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxsA*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4177- 4185.
- IPCC. (2013). *Climate change 2013: The physical science basis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Jiang, H., Chen, Y., Jiang, P., Zhang, C., Smith, T. J., Murrell, J. C., & Xing, X.-H. (2010). Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 277-288.
- Khatri, K., Mohite, J., Pandit, P., Bahulikar, R. A., & Rahalkar, M. C. (2021). Isolation, description and genome analysis of a putative novel *Methylobacter* Species ('*Ca. Methylobacter coli*') Isolated from the faeces of a blackbuck (Indian Antelope). *Microbiology Research*, 12(2), 513-523. doi:10.3390/microbiolres12020035
- Kim, H. G., Han, G. H., Eom, C. Y., & Kim, S. W. (2008). Isolation and taxonomic characterization of a novel type I methanotrophic bacterium. *The Journal of Microbiology*, 46(1), 45-50. doi:10.1007/s12275-008-0017-2
- Le, G. H. N., Nguyen, T., & Nguyen, M. V. (2018). *Phân lập và sàng lọc vi khuẩn có khả năng làm giảm khí methane - Gây hiệu ứng nhà kính [Isolation and screening of bacteria capable of reducing methane - Causing the greenhouse effect]*. Hà Nội, Việt Nam: NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ.
- Leadbetter, E. R., & Foster, J. W. (1958). Studies on some methane - utilizing bacteria. *Archives of Microbiology*, 30, 91-118.
- Mai, T. V., Tran, T. V., & Bui, L. T. P. (2013). Tiềm năng giảm thiểu phát thải khí nhà kính của ngành sản xuất lúa nước Việt Nam [Potential to reduce greenhouse gas emissions of Vietnam's wet rice industry]. *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 1859-4581.

- Nguyen, T. T. H., & Dinh, H. T. (2016). Phân lập vi khuẩn oxy hóa khí methane nhằm nghiên cứu ứng dụng để tạo nguồn đạm vi sinh [Isolation of methane-oxidizing bacteria for application research to create microbial protein sources]. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14(3), 581-588.
- Nielsen, A. K., Gerdes, K., & Murrell, J. C. (1997). Copperdependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Molecular Microbiology*, 25(2), 399-409.
- Oswald, K., Milucka, J., Brand, A., Hach, P., Littmann, S., Wehrli, B., ... Schubert, C. J. (2016). Aerobic gammaproteobacterial methanotrophs mitigate methane emissions from oxic and anoxic lake waters. *Limnology and Oceanography*, 61(S1), S101-S118.
- Pytlak, A., Kuzniar, A., & Stepniewska, Z. (2012). pmoA based detection of methanotrophic bacteria in coal-bed rocks of the Lublin coal basin. *Acta Agrophysica*, 19(2), 403-413.
- Semrau, J. D., Chistoserdov, A., Lebron, J., Costello, A., Davagnino, J., Kenna, E., ... Lidstrom, M. E. (1995). Particulate methane monooxygenase genes in Methanotrophs. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 3071-3079.
- Serrano-Silva, N., Sarria-Guzmán, Y., Dendooven, L., & Luna-Guido, M. (2014). Methanogenesis and methanotrophy in soil. *A Review Pedosphere*, 24(3), 291-307.
- Stępniewska, Z., Goraj, W., Kuźniar, A., Łopacka, N., & Małysza, M. (2017). Enrichment culture and identification of endophytic methanotrophs isolated from peatland plants. *Folia Microbiologica*, 62(5), 381-391. doi:10.1007/s12223-017-0508-9
- Svenning, M. M., Warttinen, I., Hestnes, A. G., & Binnerup, S. J. (2003). Isolation of methane oxidising bacteria from soil by use of a soil substrate membrane system. *FEMS Microbiology Ecology*, 44(3), 347-354.
- Tavormina, P. L., Hatzenpichler, R., McGlynn, S., Chadwick, G., Dawson, K. S., Connon, S. A., & Orphan, V. J. (2015). *Methyloprofundus sedimenti* gen. nov., sp. nov., an obligate methanotroph from ocean sediment belonging to the 'deep sea-1' clade of marine methanotrophs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 251-259. doi:10.1099/ij.s.0.062927-0
- Trotsenko, Y. A., & Murrell, J. C. (2008). Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. *Advances Applied Microbiology*, 63, 183-230.
- Wendlandt, K. D., Stottmeister, U., Helm, J., Soltmann, B., Jechorek, M., & Beck, M. (2010). The potential of methane-oxidizing bacteria for applications in environmental biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 10(2), 87-102.

