

TÌM HIỂU KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE CỦA VI SINH VẬT PHÂN LẬP TỪ CHẤT THẢI RẮN CỦA NHÀ MÁY FOCOCEV THỪA THIÊN HUẾ

Nguyễn Ngọc Trúc Ngân^{1*}, Phạm Thị Ngọc Lan²

¹ Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Huế

² Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Huế

* Email: ms.trucngan@gmail.com

TÓM TẮT

Chất thải rắn, đặc biệt là phần vỏ gỗ của nhà máy sản xuất tinh bột sắn thường chứa một lượng lớn cellulose. Đây là hợp chất hữu cơ khó phân hủy, thời gian phân hủy khá dài và chiếm một diện tích mặt bằng đáng kể. Chính vì vậy, nghiên cứu hệ vi sinh vật phân giải cellulose trong khối ủ, cũng như đánh giá khả năng phân hủy của chúng và tìm ra chủng có hoạt tính cellulase mạnh là rất cần thiết để xử lý khối ủ, góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường và tạo ra phân hữu cơ sinh học. Kết quả nghiên cứu cho thấy: số lượng vi sinh vật có sự biến động lớn và chênh lệch rất rõ giữa các nhóm, cao nhất là vi khuẩn (dao động trong khoảng từ $56,02 \times 10^6$ đến $343,23 \times 10^6$ CFU/g mẫu khô), tiếp đó là xạ khuẩn (từ $5,63 \times 10^6$ đến $96,24 \times 10^6$ CFU/g mẫu khô) và nấm mốc chiếm số lượng thấp nhất (từ $2,43 \times 10^6$ đến $34,78 \times 10^6$ CFU/g mẫu khô). Phân lập được 112 chủng vi khuẩn, 92 chủng xạ khuẩn và 55 chủng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose và chọn được các chủng PV₄₁, PX₉₀ và PM₃₉ có hoạt tính mạnh nhất. Trong môi trường dịch thể với nguồn carbon là CMC, nuôi cấy lắc xạ khuẩn, nấm mốc sau 120 giờ và vi khuẩn sau 60 giờ cho hoạt tính cellulase cũng như sinh khối cao nhất.

Từ khóa: nấm mốc, xạ khuẩn, vi khuẩn, cellulose, hoạt tính cellulase.

1. MỞ ĐẦU

Trong những năm trở lại đây, hoạt động của nhà máy sản xuất tinh bột sắn ở Thừa Thiên Huế ngày càng phát triển mạnh mẽ. Nhà máy đã tiêu thụ một lượng lớn sắn nguyên liệu, đồng thời đã tạo ra việc làm cho nhiều nông dân. Mặc dù vậy, chất thải của nhà máy theo đó cũng tăng lên đáng kể nên vấn đề đặt ra là cần phải giải quyết triệt để những chất thải này nhằm bảo vệ môi trường sinh thái cho vùng phụ cận. Hiện nay, nhà máy đã đầu tư xây dựng hệ thống xử lý chất thải lỏng và thu hồi biogas nên một phần nào đó đã giải quyết được ô nhiễm do nước thải gây ra. Tuy nhiên, xử lý chất thải rắn vẫn chưa được quan tâm nhiều. Vỏ gỗ của sắn sau khi bóc ra chỉ được chất thành đống để ủ tự nhiên, sau đó được đốt mà chưa có một biện pháp xử lý tích cực nào. Thành phần chính của chất thải rắn này là cellulose, là một hợp chất cao phân tử rất khó phân hủy và thời gian phân hủy là khá lâu, do đó, sẽ chiếm một diện tích mặt bằng đáng kể. Đồng thời, các đống ủ này là nguyên nhân chính gây ô nhiễm không khí (mùi hôi thối), ô nhiễm đất và cả nguồn nước ngầm. Chính vì vậy, việc nghiên cứu hệ vi sinh vật bản

địa có khả năng phân giải cellulose trong khối ủ, đánh giá khả năng phân hủy của chúng, cũng như tìm ra chủng vi sinh vật có hoạt tính cellulase mạnh là rất cần thiết để giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường do nguồn thải này gây ra [1], đồng thời chuyển phế phẩm này thành một sản phẩm có lợi là phân hữu cơ sinh học.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm mốc có khả năng phân giải cellulose phân lập từ bã thải vỏ sắn ở nhà máy tinh bột sắn Thừa Thiên Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Phân lập và xác định số lượng tế bào [2]*: sử dụng phương pháp Koch để phân lập và đếm số lượng xạ khuẩn, vi khuẩn, nấm mốc phân giải cellulose trên môi trường lần lượt là Gauses I, Vinogradski và Czapek với nguồn carbon là CMC (Carboxymethyl Cellulose).

- *Xác định khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật [2]*:

Nguyên tắc chung: Trên môi trường chứa CMC, vi sinh vật sẽ tiết ra cellulase ngoại bào phân hủy cơ chất để sinh trưởng và làm cho môi trường trong hơn khi nhuộm bằng thuốc thử Lugol. Độ lớn của khoảng môi trường trong suốt và vết cây phản ánh khả năng sinh trưởng phát triển và phân giải CMC của vi sinh vật.

- *Xác định hoạt tính cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch [2]*:

Nguyên tắc: cellulase tác động lên cơ chất CMC trong môi trường thạch. CMC bị phân hủy làm độ đục của môi trường bị giảm và trở nên trong suốt khi nhuộm bằng Lugol. Độ lớn của vòng phân giải phản ánh hoạt tính của enzyme.

Phương pháp tiến hành: Các ống thạch nghiêng chứa giống được chuyển vào môi trường dịch thể. Tiến hành nuôi cấy lắc 120 vòng/phút trong thời gian 4 ngày ở nhiệt độ phòng rồi thu dịch chiết enzyme. Thử hoạt tính cellulase trên đĩa thạch – CMC và biểu diễn hoạt tính bằng đường kính (mm) vòng thủy phân cellulose.

- *Xác định thời gian tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp cellulase và sự tích lũy sinh khối của vi sinh vật [2]*: các chủng xạ khuẩn, vi khuẩn, nấm mốc được nuôi trong các môi trường lần lượt là Gauses I, Vinogradski và Czapek dịch thể để thu dịch enzyme và sinh khối. Xác định hoạt tính cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch và xác định sinh khối khô theo phương pháp cân.

- *Xử lý số liệu*: Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần; số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2010.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và xác định số lượng tế bào

Chúng tôi đã tiến hành 7 đợt thu mẫu tại các đồng vỏ sắn khác nhau ở nhà máy tinh bột sắn Thừa Thiên Huế. Từ 11 mẫu vỏ thải thu được, tiến hành phân lập trên ba môi trường Gausies I, Vinogradski và Czapek thạch đĩa thu được 92 chủng xạ khuẩn, 112 chủng vi khuẩn và 55 chủng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose. Số lượng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose trong mẫu vỏ sắn được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Số lượng vi sinh vật phân giải cellulose trong mẫu vỏ sắn phân lập

STT	Ký hiệu mẫu	pH mẫu	CFU/g mẫu khô ($\times 10^6$)		
			Nấm mốc	Vi khuẩn	Xạ khuẩn
1	A1	4,52	9,45	128,18	88,35
2	A2	5,11	21,56	111,34	35,68
3	A3	5,86	14,78	56,02	53,43
4	A4	4,11	7,90	167,57	24,79
5	A5	5,52	11,32	188,72	96,24
6	A6	5,63	34,78	156,91	46,69
7	A7	5,41	2,43	101,03	68,95
8	A8	4,34	3,61	132,79	11,34
9	A9	4,08	18,69	230,47	29,67
10	A10	5,71	20,05	343,23	76,56
11	A11	4,01	27,45	208,55	5,63

(Ghi chú: CFU: Colony Forming Unit (đơn vị hình thành khuẩn lạc))

Số lượng vi sinh vật trong bã thải vỏ sắn là khá cao và có sự chênh lệch rất rõ giữa các nhóm xạ khuẩn, vi khuẩn và nấm mốc. Số lượng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose trong mẫu là cao nhất, dao động trong khoảng từ $56,02 \times 10^6$ đến $343,23 \times 10^6$ CFU/g mẫu khô. Trong khi đó, số lượng nấm mốc lại thấp nhất (dao động trong khoảng từ $2,43 \times 10^6$ đến $34,78 \times 10^6$ CFU/g mẫu khô) mặc dù pH mẫu là phù hợp cho sự sinh trưởng phát triển của nấm mốc nói chung. Điều này có thể là do vỏ sắn được chất thành những đồng lớn nên tạo ra vùng kỵ khí hạn chế sự phát triển của nấm mốc. Kết quả này so với các mẫu khác như mùn rác, mẫu nước,... thì số lượng vi sinh vật ở đây thấp hơn nhiều [3], [4], [5].

3.2. Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật

3.2.1. Khả năng phân giải cellulose của các chủng nấm mốc phân lập

Để đánh giá khả năng phân giải cellulose của các chủng nấm mốc phân lập được, chúng tôi tiến hành nuôi cấy nấm mốc trên môi trường thạch đĩa Czapek với nguồn cơ chất là CMC. Khả năng phân giải cellulose được đánh giá bằng sự tạo thành khuẩn lạc trên môi trường và kích thước vạch phân giải cellulose. Với 55 chủng nấm mốc đã phân lập được, số chủng có hoạt lực mạnh chiếm 16,36% và rất mạnh chiếm 20,00%. Số chủng có hoạt lực trung bình chiếm tỷ lệ lớn nhất là 41,82%, gấp đôi số chủng có hoạt lực mạnh và rất mạnh. Từ 55 chủng này, chúng tôi đã chọn ra 2 chủng có hoạt lực mạnh nhất là PM₃₉ và PM₄₁ để tiến hành nuôi cấy dịch thể, thu dịch chiết

enzyme và sinh khối nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và hoạt tính cellulase. Kết quả được trình bày ở bảng 2, hình 1 và hình 2.

Hoạt tính cellulase của 2 chủng nấm mốc này chênh lệch rất ít, thể hiện ở đường kính vòng phân giải của các dịch chiết enzyme chủng PM_{39} và PM_{41} lần lượt là 28,5 mm và 27 mm. Chủng PM_{39} vừa có hoạt lực mạnh hơn vừa tích lũy sinh khối cao hơn (2,89 mg/ml) nên chúng tôi chọn chủng này cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Kích thước vòng phân giải và sinh khối khô của các chủng nấm mốc

Chủng nấm mốc	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/ml)
PM_{39}	$28,50 \pm 0,33$	$2,89 \pm 0,03$
PM_{41}	$27,00 \pm 0,00$	$2,52 \pm 0,01$



Hình 1. Vạch phân giải cellulose và khuẩn lạc của các chủng nấm mốc



Hình 2. Vòng phân giải CMC của dịch enzyme từ 2 chủng nấm mốc PM_{39} (phải) và PM_{41} (trái)

3.2.2. Khả năng phân giải cellulose của các chủng xạ khuẩn phân lập

Tương tự như các bước đánh giá khả năng phân giải của các chủng nấm mốc, đối với các chủng xạ khuẩn, chúng tôi tiến hành cấy vạch trên môi trường Gause I thạch đĩa với nguồn carbon là CMC. Sau khi đo kích thước khuẩn lạc và vạch phân giải, kết quả thu được như sau: mức độ phân giải cellulose của các chủng xạ khuẩn là khá đồng đều từ yếu đến mạnh (lần lượt là 41,3%, 31,52% và 21,74%), trong khi tỷ lệ chủng có khả năng phân giải rất mạnh chỉ chiếm 5,44% trong tổng số 92 chủng phân lập được. Từ 92 chủng này, chủng PX_{16} và PX_{90} được chọn ra để nuôi cấy dịch thể, thu dịch chiết enzyme và sinh khối nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và hoạt tính cellulase. Kết quả được trình bày ở bảng 3, hình 3 và hình 4.

Hai chủng xạ khuẩn này có hoạt tính cellulase khá chênh lệch nhau, trong đó chủng PX_{90} vừa thể hiện hoạt tính mạnh hơn khi nuôi cấy dịch thể vừa tích lũy sinh khối nhiều hơn chủng PX_{16} nên được chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3. Kích thước vòng phân giải và sinh khối khô của các chủng xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/ml)
PX_{19}	$21,00 \pm 0,33$	$1,91 \pm 0,01$
PX_{90}	$24,00 \pm 0,67$	$2,74 \pm 0,01$



Hình 3. Vạch phân giải cellulose và khuẩn lạc của các chủng xạ khuẩn



Hình 4. Vòng phân giải CMC của dịch enzyme tách từ 2 chủng xạ khuẩn PX₁₆ (trái) và PX₉₀ (phải)

3.2.3. Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn phân lập

Các chủng vi khuẩn được cấy vạch trên môi trường Vinogradski thạch đĩa với nguồn carbon là CMC. Kết quả thu được cho thấy mức độ phân giải cellulose khác nhau ở các chủng vi khuẩn phân lập. Trong số 112 chủng vi khuẩn phân lập được, chủng có hoạt tính yếu chiếm tỷ lệ rất cao với 76,79%. Số chủng có mức độ phân giải từ trung bình đến rất mạnh chỉ chiếm số lượng ít, trong đó số chủng trung bình chiếm 13,39%, số chủng có hoạt tính mạnh chiếm 7,14% và số chủng có hoạt tính rất mạnh chỉ được tìm thấy với tỷ lệ là 2,68%. Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi chọn ra hai chủng có hoạt tính mạnh nhất để tiến hành nuôi cấy dịch thể, thu dịch chiết enzyme và sinh khối là PV₄₁ và PV₆₉. Kết quả được trình bày ở bảng 4, hình 5 và hình 6.

Khả năng phân giải cellulose của hai chủng vi khuẩn này khá đồng đều và sự tích lũy sinh khối cũng thể hiện mạnh hơn ở chủng có khả năng phân giải cao hơn nên ta chọn chủng PV₄₁ (với đường kính vòng phân giải là 24,5 mm và sinh khối khô đạt 4,72 mg/ml) để tiến hành nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 4. Kích thước vòng phân giải và sinh khối khô của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/ml)
PV ₄₁	24,50 ± 0,67	4,72 ± 0,01
PV ₆₉	23,00 ± 0,33	3,26 ± 0,07



Hình 5. Vạch phân giải cellulose và khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn



Hình 6. Vòng phân giải CMC của dịch enzyme từ 2 chủng vi khuẩn PV₄₁ (phải) và PV₆₉ (trái)

3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến quá trình sinh tổng hợp cellulase và tích lũy sinh khối của vi sinh vật

Để thăm dò ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính cellulase cũng như khả năng tích lũy sinh khối, chúng tôi tiến hành nuôi cấy lắc (120 vòng/ phút) các chủng vi sinh vật trong môi trường dịch thể (Czapek, Vinogradski, Gause I) với các khoảng thời gian khác nhau.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính cellulase và sự tích lũy sinh khối của vi sinh vật

Chủng vi sinh vật	Thời gian (giờ)	Đường kính vòng phân giải (mm)	Sinh khối khô (mg/ml)
PM ₃₉	24	15,00 ± 0,00	1,78 ± 0,01
	48	19,50 ± 0,67	2,03 ± 0,01
	72	22,00 ± 0,00	2,45 ± 0,01
	96	28,00 ± 0,67	2,77 ± 0,01
	120	31,50 ± 0,33	2,73 ± 0,01
	144	30,00 ± 0,00	2,54 ± 0,01
PV ₄₁	24	8,50 ± 0,00	2,47 ± 0,01
	36	18,50 ± 0,67	3,94 ± 0,01
	48	24,00 ± 0,00	4,85 ± 0,03
	60	31,50 ± 0,00	4,64 ± 0,01
	72	22,50 ± 0,33	3,74 ± 0,01
	96	14,50 ± 0,00	2,20 ± 0,01
PX ₉₀	24	7,50 ± 0,33	1,56 ± 0,01
	48	13,00 ± 0,67	1,87 ± 0,03
	72	16,00 ± 0,67	2,30 ± 0,03
	96	23,50 ± 0,00	2,75 ± 0,01
	120	26,50 ± 0,67	2,73 ± 0,01
	144	15,00 ± 0,33	2,66 ± 0,01



Hình 7. Vòng phân giải CMC của chủng PV₄₁ (trái), PM₃₉ (giữa) và PX₉₀ (phải) sau 60 giờ (vi khuẩn) và 120 giờ (xạ khuẩn và nấm mốc) nuôi cấy

Qua kết quả cho thấy hoạt tính cellulase và sự tích lũy sinh khối của hai chủng nấm mốc PM₃₉ và xạ khuẩn PX₉₀ biến thiên trong khoảng thời gian nuôi cấy khá rộng (144 giờ) và đạt cực đại tại thời điểm 120 giờ với sinh khối đạt được 2,7 mg/ml và đường kính vòng phân giải lần lượt là 31,5 mm và 26,5 mm. Trong khi đó chủng vi khuẩn PV₄₁ đạt cực đại chỉ sau 60 giờ nuôi cấy với đường kính vòng phân giải đạt 31,5 mm và sinh khối khô thu được là 4,64 mg/ml. Như vậy, trong 3 chủng vi sinh vật thu

được, chủng vi khuẩn PV₄₁ có thời gian nuôi cấy ngắn nhất, thể hiện hoạt tính cellulase mạnh nhất cũng như khả năng tích lũy sinh khối là cao nhất nên chủng này có nhiều ưu điểm vượt trội hơn cả (bảng 5 và hình 7).

4. KẾT LUẬN

1. Số lượng vi sinh vật trong chất thải vỏ sắn ở Nhà máy FOCOCEV Thừa Thiên Huế cao và có sự biến động lớn theo thời gian: nấm mốc: $2,43 \times 10^6$ - $34,78 \times 10^6$ CFU/g mẫu khô, vi khuẩn: $56,02 \times 10^6$ - $343,23 \times 10^6$ CFU/g mẫu khô và xạ khuẩn: $5,63 \times 10^6$ - $96,24 \times 10^6$ CFU/g mẫu khô.

2. Đánh giá khả năng phân giải cellulose của 259 chủng vi khuẩn, nấm mốc và xạ khuẩn, trong đó chủng có hoạt tính rất mạnh chiếm tỷ lệ 5,4 – 20%.

3. Thời gian nuôi cấy tối ưu cho quá trình tích lũy sinh khối và sinh tổng hợp cellulase của chủng nấm mốc PM₃₉ và xạ khuẩn PX90 là 120 giờ, của chủng vi khuẩn PV₄₁ là 60 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1].Gautam SP, Bundela PS, Pandey AK, Jamaluddin, Awasthi MK, Sarsaiya S (2012). Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain. *Int. J. Microbiol.*, article ID 325907.
- [2].Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Giáo trình thực tập vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Đại học Huế.
- [3].Phạm Thị Ngọc Lan, Phạm Thị Hòa, Lý Kim Bằng (1999). Tuyển chọn một số giống xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ mùn rác. *Báo cáo khoa học. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội*, 177 – 182.
- [4].Đặng Minh Hằng (1999). Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của một số chủng vi sinh vật để xử lý rác. *Báo cáo Khoa học. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội*, 333 – 339.
- [5].Nguyễn Lan Hương (1999). Phân lập và hoạt hóa vi sinh vật ưa nhiệt có hoạt tính cellulase cao để bổ sung vào khối ủ, rút ngắn chu kỳ xử lý rác thải sinh hoạt. *Báo cáo khoa học. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội*, 531 – 536.

**STUDY ON CELLULOSE BIODEGRADABILITY OF MICROORGANISM
STRAINS ISOLATED FROM CASSAVA PEEL WASTE AT FOCOCEV
THUA THIEN HUE TAPIOCA STARCH FACTORY**

Nguyen Ngoc Truc Ngan^{1*}, Pham Thi Ngoc Lan²

¹Department of Environmental Science, Hue University of Sciences

² Department of Biology, Hue University of Sciences

* Email: ms.trucngan@gmail.com

ABSTRACT

The solid waste, especially the peel of cassava waste from Fococev Thua Thien Hue tapioca starch factory contains high amounts of cellulose. This organic compound is decomposed hardly and decay times are quite long so they occupy space significantly. Therefore, studying cellulose-degrading microbiota in this waste pile, estimating their decomposition ability as well as finding the highest cellulase activity strains are essential to tackle this pile that reduces pollution and creates bioorganic fertilizer.

The results showed that the number of microorganisms had a high fluctuation and was different between 3 groups of microorganism, the highest density was bacteria (around from $56,02 \times 10^6$ to $343,23 \times 10^6$ CFU/g dry sample), the next was actinomycetes (from $5,63 \times 10^6$ to $96,24 \times 10^6$ CFU/g dry sample) and molds had the lowest amount (from $2,43 \times 10^6$ to $34,78 \times 10^6$ CFU/g dry sample). There were 112 bacterium strains, 92 actinomycete ones and 55 mold ones isolated from cassava peel, in which 3 strains PV₄₁, PX₉₀ and PM₃₉ show the highest cellulase activity as well as the driest biomass were selected. In the liquid medium with carbon source as CMC, these strains reached to the top of cellulase activity and dry biomass after shaking culture with 120 hours of PX₉₀, PM₃₉ and 60 hours of PV₄₁.

Keywords: molds, actinomycetes, bacteria, cellulose, cellulase activity.