

Phân lập các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose

Isolation of Cellulose-Degrading Actinomycetes

Nguyễn Liêu Ba*, Hoàng Thị Phương Anh, Phạm Thu Hiền, Lê Thị Hồng Hậu

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội - Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

Đến Tòa soạn: 16-12-2018; chấp nhận đăng: 20-01-2020

Tóm tắt

Mục đích của nghiên cứu là phân lập các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose. 21 chủng có khả năng phân giải cellulose được phân lập từ các mẫu đất và gỗ khác nhau như lá, rơm và gỗ mục thu thập trên địa bàn thành phố Hà Nội và phân thành 6 nhóm màu khuẩn lạc: tím, hồng, trắng, xanh lá, xám và vàng. Khả năng sinh enzyme cellulase của được xác định bằng sự xuất hiện của vòng halo trên môi trường với nguồn cơ chất CMC xung quanh thời thạch chứa khuẩn lạc, sử dụng thuốc thử lugol. Hoạt tính cellulase của các chủng phân lập được xác định định tính bằng cách đo đường kính vòng halo. Chủng G1, D4 và G3 thể hiện vòng phân giải lớn nhất với đường kính vòng halo lần lượt là 40mm, 40mm và 39mm. Khả năng sử dụng nguồn cellulose tự nhiên (rơm, bã mía) của 3 chủng này mở ra triển vọng ứng dụng vào nông nghiệp.

Từ khóa: phân lập, xạ khuẩn, phân giải cellulose

Abstract

The aim of this study is to isolate cellulose-degrading Actinomycetes. Twenty one isolates of cellulolytic Actinomycetes were isolated from different soil and woody habitats such as, leaves, straws and rotted wood collected in Hanoi and were divided into six color groups of colony: purple-violet, pink, white, green, grey and yellow. Cellulase production was indicated by the appearance of a pale halo on agar medium containing CMC as substrate around the agar piece with colony on using lugol as an indicator. Cellulase activities of isolates were determined qualitatively by measuring the diameters of halo zones. G1, D4 and G3, exhibited the maximum zones of halo around the agar piece with diameter of 40mm, 40mm and 39mm respectively. The abilities of degrading natural cellulose (straw, sugarcane bagasse) of these three strains open up potential application in agriculture.

Keywords: Isolation, Actinomycetes, cellulose-degrading

1. Đặt vấn đề

Xạ khuẩn là một nhóm vi khuẩn thật thuộc lớp *Actinobacteria*, bộ *Actinomycetales*. Phần lớn xạ khuẩn là các vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, hoại sinh, có cấu tạo dạng sợi phân nhánh. Chúng phân bố rộng rãi trong tự nhiên, thường được thấy ở môi trường đất, nước và là vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong việc tái chế nguồn cơ chất từ phế phẩm nông nghiệp [1,3]. Đặc biệt, xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose - thành phần cấu tạo thành tế bào thực vật [8].

Cellulose là nguồn carbon hữu cơ dồi dào nhất trong tự nhiên và được tích tụ hàng năm với lượng rất lớn trong nông nghiệp, công nghiệp, lâm nghiệp và các phế phụ phẩm của các ngành kinh tế trên [7]. Hầu hết các nghiên cứu về enzyme cellulase của các vi sinh vật phân lập từ đất thường hướng về nấm, và khả năng phân giải cellulose của xạ khuẩn ít được chú ý [6]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy, hệ

enzyme cellulase của xạ khuẩn là enzyme ngoại bào và chúng có khả năng tương tác với cellulose tương tự như các enzyme trong hệ cellulase của nấm [8].

Thực tế, đất là nơi cư trú của xạ khuẩn cùng nhiều loài vi sinh vật khác. Sự phát triển chậm của xạ khuẩn so với các vi sinh vật đất khiến cho việc phân lập xạ khuẩn từ đất trở nên khó khăn [5]. Do đó, sự tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose mang ý nghĩa quan trọng. Bài báo này trình bày kết quả phân lập xạ khuẩn có hoạt tính cellulase từ các mẫu đất, lá, rơm, gỗ mục thu thập ở các địa điểm khác nhau của thành phố Hà Nội cho mục đích tuyển chọn sơ bộ để ứng dụng xử lý cellulose tự nhiên.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Thu thập mẫu

Mẫu đất, rơm, lá khô, gỗ mục được thu thập ở Hà Nội, sau đó được giữ trong túi nhựa vô trùng và bảo quản ở điều kiện khô.

* Địa chỉ liên hệ: Tel: (+84) 947121115

Email: ba.nguyenliu@hust.edu.vn

2.2. Dụng cụ và hóa chất

Các dụng cụ, thiết bị sử dụng thuộc phòng thí nghiệm Bộ môn Vi sinh – Hóa sinh – Sinh học phân tử, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội. Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm là hóa chất của các hãng Merck (Đức), Himedia (Ấn Độ) và từ Trung Quốc.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân lập xạ khuẩn

Các mẫu đã thu thập được cắt và nghiền nhỏ. 1g mẫu được cho vào bình tam giác vô trùng chứa sẵn 99ml nước cất vô trùng, sau đó được lắc ở nhiệt độ 30°C với tốc độ 150 vòng/phút trong 30 phút. Sau khi đồng nhất, dịch huyền phù được pha loãng đến độ pha loãng 10^{-12} bằng dung dịch nước muối sinh lý. Với mỗi độ pha loãng từ 10^{-8} - 10^{-12} , 0,1ml dịch pha loãng được trải lên đĩa petri chứa sẵn môi trường ISP4 (Tinh bột tan 10g/L, K_2HPO_4 1g/L, NaCl 1g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L, $CaCO_3$ 2g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2g/L, $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 0,001g/L, $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,001g/L, $FeSO_4$ 0,001g/L; pH 7) có bổ sung cycloheximide (50 μ g/mL) sau đó đem ủ ở nhiệt độ 30°C trong

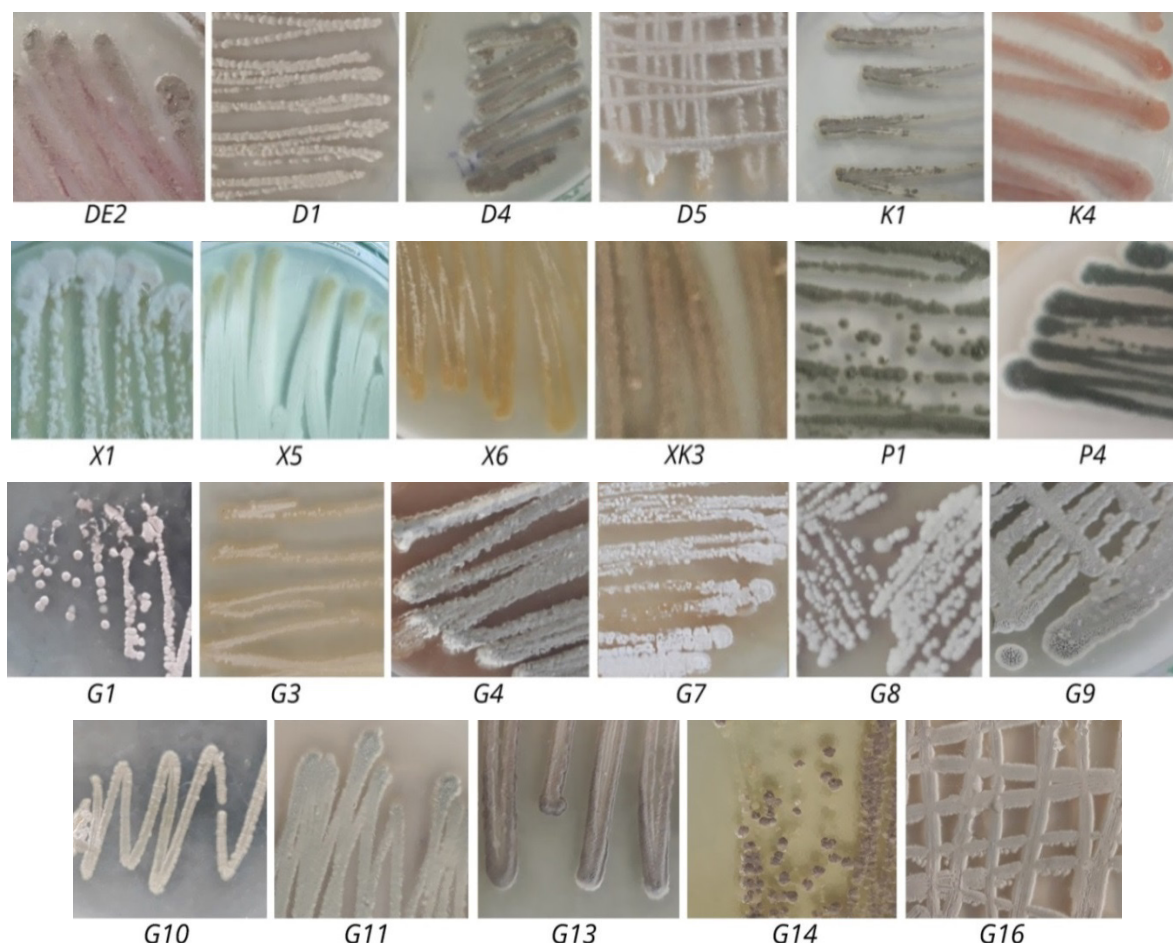
4 -7 ngày. Khuẩn lạc riêng rẽ được cấy ria sang đĩa petri chứa môi trường ISP4 để làm thuần ở 30°C trong 4-7 ngày [9].

2.3.2. Phương pháp tuyển chọn dựa trên khả năng phân giải cellulose

Các thoi thạch có đường kính 6mm được lấy từ các đĩa cấy ria các chủng xạ khuẩn sau đó đặt lên đĩa thạch chứa sẵn môi trường ISP4 thay nguồn carbon bằng CMC và ủ ở 30°C. Sau 4 ngày lugol được nhỏ lên đĩa thạch để quan sát khả năng phân giải CMC. Nếu thuốc thử lugol không bắt màu quanh thoi thạch tức là xạ khuẩn có khả năng phân giải CMC [10].

2.3.3. Phương pháp xác định một số đặc điểm hình thái của các chủng phân lập

Các chủng phân lập được nuôi lỏng trong môi trường ISP4 và môi trường cám gạo (môi trường ISP4 thay nguồn carbon bằng cám gạo) trong 4 ngày trên máy lắc tốc độ 150 rpm ở 30°C. Quan sát đặc điểm canh trường và pellet tạo thành. Sử dụng canh trường làm tiêu bản nhuộm tế bào và quan sát dưới kính hiển vi có độ phóng đại 1000 lần.



Hình 1. Khuẩn lạc các chủng phân lập

2.3.4. Phương pháp xác định khả năng phân giải nguồn cellulose tự nhiên

Rơm được cắt thành những đoạn dài 3cm và bã mía từ Nhà máy đường Lam Sơn được sấy khô ở 60°C. 50g rơm và bã mía khô mỗi loại được ngâm trong 1L NaOH 1% (w/v) ở điều kiện phòng trong 24h sau đó được rửa bằng nước và sấy khô đến khối lượng không đổi [4].

Các chủng xạ khuẩn thể hiện khả năng phân giải CMC cao được tuyển chọn để tiếp tục kiểm tra khả năng phân giải các nguồn cellulose tự nhiên. Sau khi hoạt hóa, các chủng tuyển chọn được nuôi lỏng (thể tích giống cấp 4%) trong môi trường ISP4 thay nguồn carbon bằng rơm và bã mía ở 30°C với tốc độ lắc 150 rpm. Lượng bã mía và rơm còn lại sau 4, 8 và 12 ngày được rửa bằng dung dịch acid acetic/acid nitric (80% acetic acid, 68% nitric acid (10/1, v/v)), sau đó rửa lại bằng nước và được lọc qua rây có kích thước 0,03mm. Phần cellulose sau xử lý được sấy khô đến khối lượng không đổi. Môi trường không cấy xạ khuẩn được sử dụng làm mẫu kiểm chứng [2], [4].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose

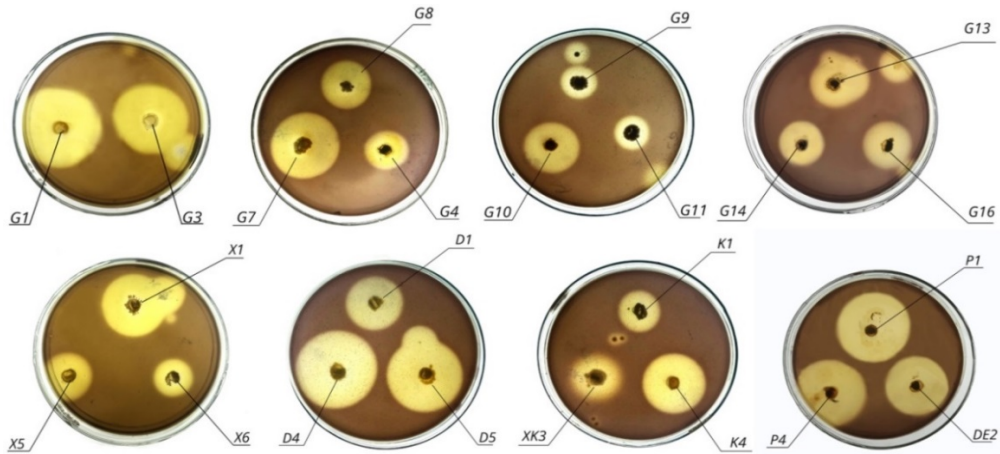
Từ các mẫu đất, gỗ mục, lá, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 23 chủng có các đặc điểm hình thái khác nhau (hình 1).

Màu sắc khuẩn lạc, màu sắc mặt dưới khuẩn lạc, kết cấu bề mặt và sắc tố hòa tan thể hiện khác nhau giữa các chủng phân lập. Màu sắc khuẩn lạc phân thành 6 nhóm: tím, hồng, trắng, xanh lá, xám đen, vàng; trong đó đa số các chủng có hệ sợi khí sinh màu xám đen (7 chủng) hoặc màu trắng (6 chủng). Màu sắc mặt dưới của khuẩn lạc cũng khá đa dạng và phần lớn có ánh vàng hoặc cam. Các chủng phân lập có kết cấu bề mặt khuẩn lạc chủ yếu là nhung, ngoài ra 1 số ít có kết cấu vôi, bột hoặc trơn. Chỉ có một số chủng phân lập sinh sắc tố hòa tan làm thay đổi màu của môi trường và màu của sắc tố hòa tan cũng rất khác nhau giữa các chủng (Bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc các chủng phân lập

Nguồn	Chủng	Màu khuẩn lạc		Kết cấu bề mặt	Sắc tố hòa tan	Đường kính vòng halo (mm)
		Hệ sợi khí sinh	Mặt dưới			
Mẫu đất 1	K1	Xám đen	Vàng kem	Nhung	-	22,3±1,2
	K4	-	Hồng cam	Trơn	-	31,7±1,5
Mẫu đất 2	DE2	Xám đen	Tím hồng	Nhung	-	34,0±1,7
	X1	Vàng nâu	Trắng	Nhung	-	33,0±1,0
Mẫu đất 3	X5	Trắng	Vàng cam	Nhung	-	25,7±1,2
	X6	Trắng	Vàng cam	Vôi	Vàng nhạt	21,3±1,2
	D1	Trắng	Trắng ngà	Nhung	Tro nhạt	26,7±0,6
Mẫu đất 4	D4	Xám đen	Xám nhạt	Vôi	Xám nhạt	40,3±0,6
	D5	Trắng	Vàng cam	Nhung	-	36,0±1,0
	G1	Phớt hồng	Đỏ tím	Nhung	-	40,3±1,5
Mẫu gỗ mục	G3	Trắng	Vàng cam	Vôi	Vàng nhạt	39,3±0,6
	G4	Xám đen	Nâu cam	Nhung	Nâu cam đậm	20,0±1,0
	G7	Phớt hồng	Cam	Vôi	Cam vàng	32,3±2,1
Mẫu lá 1	G8	Trắng	Tím hồng	Nhung	Nâu nhạt	26,0±1,0
	G9	Xanh xám	Xanh nhạt	Nhung	Tro nhạt	17,3±0,6
	G10	Trắng	Vàng kem	Vôi	-	26,0±1,0
Mẫu lá 2	G11	Trắng xanh	Kem	Nhung	Xám nhạt	17,0±0,0
	G13	Xám trắng	Vàng	Nhung	Xám xanh nhạt	25,0±1,0
	G14	Xám đen	Vàng chanh	Nhung	Vàng chanh	23,0±1,7
	G16	Xám đen	Cam	Nhung	Cam nhạt	25,7±0,6
Mẫu lá 3	P1	Xanh lá	Trắng xanh	Bột	-	39,0±0,0
	P4	Xanh đen viền trắng	Nâu vàng	Bột	-	39,0±1,7
Mẫu rơm	XK3	Hồng xám	Nâu đen	Nhung	-	25,3±0,6

- : không sinh sắc tố hòa tan



Hình 2. Khả năng phân giải CMC của các chủng phân lập

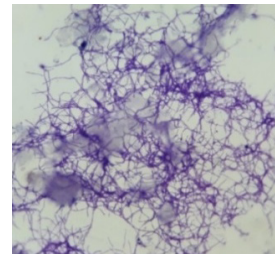
Tiến hành kiểm tra khả năng phân giải CMC của các chủng phân lập bằng phương pháp thời thạch sử dụng thuốc thử lugol thấy xuất hiện vòng thủy phân cơ chất xung quanh thời thạch (hình 2).

Kết quả thí nghiệm cho thấy tất cả 23 chủng phân lập được đều có khả năng phân giải cơ chất CMC (hình 2, bảng 1). Số liệu cũng chỉ ra rằng khả năng này ở chủng G9 và G11 không lớn bằng các chủng có cùng nguồn gốc (đường kính chỉ 17mm), trong khi G1, D4, G3, P1, P4 có thể tạo vòng phân giải CMC lớn hơn gấp ~ 2,4 lần vòng phân giải CMC của G9 và G11. Có thể nhận định sơ bộ rằng khả năng này của 3 chủng G1, G3 và D4 tốt hơn cả trong số các chủng phân lập.

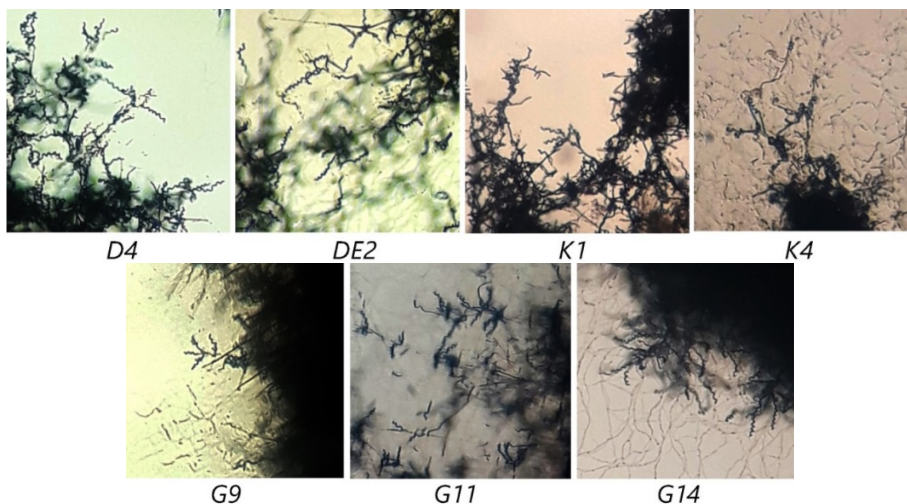
3.2. Đặc điểm hình thái của các chủng phân lập

Nghiên cứu về đặc điểm hình thái các chủng phân lập được thể hiện qua hình dạng tế bào, chuỗi bào tử và đặc điểm sinh trưởng trong môi trường lỏng của các chủng.

Hầu hết các chủng phân lập được là vi khuẩn gram dương, có cấu tạo dạng sợi phân nhánh phức tạp đan xen nhau như nấm nhưng không có vách ngăn, kích thước tế bào tương tự vi khuẩn (hình 3). Đây là đặc điểm hình thái đặc trưng của xạ khuẩn. Chủng P1 và P4 mặc dù có đường kính vòng phân giải CMC lớn nhưng hình dạng và kích thước tế bào giống nấm nên không được đưa vào bộ sưu tập các chủng xạ khuẩn.



Hình 3. Hình dạng tế bào chủng G14 dưới kính hiển vi với hệ số phóng đại 1000



Hình 4. Bào tử của một số chủng xạ khuẩn phân lập có dạng xoắn của chi *Streptomyces* dưới kính hiển vi với hệ số phóng đại 100

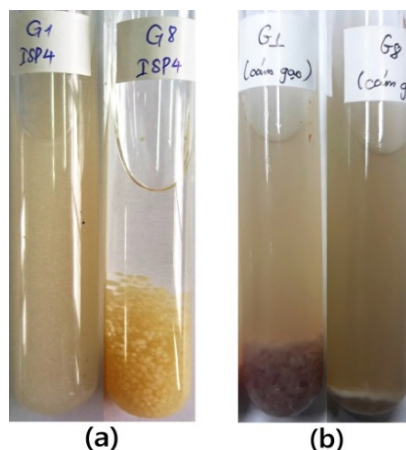
Qua hình 4 dễ thấy các chủng D4, DE2, G9, G11, G14, K1, K4 có hình dạng chuỗi bào tử xoắn đặc trưng của chi *Streptomyces*.

Xạ khuẩn có khả năng sản sinh ra sắc tố hòa tan khuếch tán vào dịch canh trường. Đối với các môi trường khác nhau, mỗi loài xạ khuẩn lại sinh ra sắc tố hòa tan với màu sắc khác nhau. Đây cũng là 1 đặc điểm quan trọng trong việc phân loại và định danh xạ khuẩn [1]. Màu sắc của pellet, màu của dịch canh trường khi nuôi các chủng phân lập trong môi trường lỏng ISP4 và môi trường cám gạo được thể hiện qua hình 4 và mô tả chi tiết tại bảng 3.

Sự hình thành pellet và tổng hợp sắc tố của các chủng xảy ra đồng thời sau 3-4 ngày nuôi cấy. Đối với một số chủng như X6, D4, G3, G4, G10, G14, và XK3, màu của pellet gần với màu của dịch nuôi. Một số chủng khác màu của pellet không tương đồng với màu của sắc tố tạo thành điển hình là các chủng G8, K1, D5, DE2 trong môi trường ISP4 (bảng 3).

Khi nuôi trong môi trường có thành phần khác nhau, màu sắc của pellet và màu của canh trường nuôi cấy các chủng xạ khuẩn khác nhau là khác nhau

và thay đổi không theo quy luật. Sự khác biệt rõ rệt nhất có thể quan sát được từ kết quả của chủng G1 và G8. Pellet trong môi trường cám gạo của 2 chủng G1 và G8 có màu sắc lần lượt là tím và tím đậm trong khi ở môi trường ISP4, 2 chủng này tạo pellet có màu lần lượt là trắng và vàng sáng (hình 5).



Hình 5. Màu sắc dịch canh trường và pellet chủng G1 và G8 trên môi trường (a) ISP4 và (b) cám gạo

Bảng 3. Màu sắc của pellet và dịch nuôi xạ khuẩn trên môi trường ISP4 và môi trường cám gạo

Chủng	Môi trường cám gạo		ISP4	
	Màu pellet	Màu môi trường	Màu pellet	Màu môi trường
K1	Nâu xám	Vàng nhạt	Cam đậm	-
K4	Hồng nâu	Ánh vàng	Trắng ngà	-
DE2	Hồng	Vàng nhạt	Hồng nhạt	Trắng
X1	Nâu sáng	Nâu cam	Nâu cam	-
X5	Vàng xám	Vàng xám	Trắng ngà	Trắng
X6	Nâu đậm	Nâu cam	Nâu cam đậm	Cam nâu
D1	Trắng ngà	Vàng xanh nhạt	Trắng	Trắng
D4	Nâu đậm	Vàng nâu nhạt	Nâu đậm	Nâu
D5	Nâu nhạt	Vàng nâu nhạt	Vàng nâu nhạt	-
G1	Tím	Vàng tím nhạt	Trắng	Trắng
G3	Vàng nhạt	Vàng nhạt	Nâu đồng	Cam nâu
G4	Nâu nhạt	Cam nâu đậm	Cam nâu	Nâu đỏ đậm
G7	Vàng nhạt	Vàng	Nâu nhạt	Vàng
G8	Tím đậm	Nâu nhạt	Vàng sáng	-
G9	Nâu xám	Vàng xám nhạt	Đen xám	Xám đen nhạt
G10	Vàng	Vàng	Vàng chanh đậm	Vàng chanh đậm
G11	Xanh xám	Vàng nhạt	Vàng xám	Xám nhạt
G13	Nâu cam nhạt	Vàng nhạt	Cam đậm	Vàng nhạt
G14	Cam	Vàng chanh	Trắng vàng	Vàng chanh nhạt
G16	Nâu cam đậm	Nâu	Cam đậm	Nâu nhạt
XK3	Vàng nâu nhạt	Vàng nâu nhạt	Trắng	-

- : không sinh sắc tố hòa tan

3.3. Khả năng phân giải nguồn cellulose tự nhiên

Các chủng G1, G3 và D4 với đường kính vòng phân giải CMC cao được tiến hành kiểm tra khả năng sử dụng nguồn cellulose tự nhiên là rơm và bã mía.

Bảng 4. Tỷ lệ khối lượng cơ chất cellulose còn lại so với khối lượng ban đầu sau 4, 8 và 12 ngày xử lý (%)

		G1	G3	D4
Bã mía	4 ngày	98,3±0,0	32,5±0,3	50,8±0,4
	8 ngày	92,9±0,1	26,8±0,4	20,5±0,3
	12 ngày	90,5±0,1	10,5±0,3	11,3±0,3
Rơm	4 ngày	98,7±0,0	30,3±0,1	37,0±0,2
	8 ngày	95,7±0,0	22,5±0,3	22,5±0,1
	12 ngày	91,3±0,0	13,0±0,2	10,5±0,1

Kết quả cho thấy cả 3 chủng đều có thể tiêu thụ 2 nguồn cơ chất trên. Tuy nhiên, khả năng xử lý không rõ nét ở chủng G1, sau 12 ngày, khối lượng rơm và bã mía còn lại lần lượt là 91,3% và 90,5%; trong khi G3, D4 thể hiện khả năng này khá tốt. Sau 12 ngày, khối lượng rơm còn lại của 2 chủng G3 và D4 lần lượt là 13,0% và 10,5% khối lượng ban đầu; khối lượng bã mía cũng giảm còn 10,5% và 11,3%.

Chủng G1 mặc dù có vòng phân giải CMC lớn nhưng khả năng sử dụng nguồn cellulose tự nhiên kém có thể giải thích là do việc phân giải cellulose một cách hiệu quả cần có sự hoạt động kết hợp của cả 3 enzyme trong hệ cellulase là endoglucanase, exoglucanase, và β-glucosidase trong khi việc phân giải CMC trên đĩa thạch mới chỉ có thể xác định tính khả năng sinh enzyme endoglucanase. Hơn nữa, ngoài cellulose, các nguồn cơ chất tự nhiên là rơm và bã mía còn được cấu tạo từ nhiều thành phần khác như mannan, xylan, lignin... do đó ngoài việc xác định định lượng hoạt độ của 3 enzyme trong hệ cellulase, khả năng sinh tổng hợp xylanase hay ligninase cũng cần được kiểm tra để có thể tuyển chọn ra những chủng có khả năng phân giải các nguồn cơ chất từ phế thải nông nghiệp tốt.

4. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã phân lập được 21 chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose. Căn cứ theo khóa phân loại Bergey và dựa vào hình dạng chuỗi bào tử, 7 chủng D4, DE2, G9, G11, G14, K1, K4 được sơ bộ nhận định thuộc chi *Streptomyces*. 3

chủng G1, G3, D4 tạo vòng phân giải CMC cao; đặc biệt chủng G3 và D4 phân hủy nguồn cellulose tự nhiên là rơm và bã mía khá tốt mở ra tiềm năng ứng dụng vào nông nghiệp.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển, Phạm Văn Ty, Vi sinh vật học, 39-42, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, 2012.
- [2] Bian, Jing & Peng, Feng & Peng, Xiao-Peng & Pai, Peng & Xu, Feng & Sun, Run-Cang, Acetic acid enhanced purification of crude cellulose from sugarcane bagasse: Structural and morphological characterization. *BioResources*. 7(4) (2012),4626-4639.
- [3] Chaudhary, B.S., A. R. Shrivastava, S. Shrivastava, Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(8) (2013), 83-94.
- [4] Hongyan Zhao, Hairu Yu, Degradation of Lignocelluloses in Rice Straw by BMC-9, a Composite Microbial System, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(5) (2014), 585–591
- [5] Jeffrey, L. S. H, Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*, 7(20) (2008), 3700-3705.
- [6] Malherbe, S.C., Thomas, Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1 (2002), 105-114
- [7] Mandels, M. Microbiological source of cellulase. *Biotechnology and Bioengineering symposium*. 5 (1975), 81-105
- [8] McCarthy, A.J., Lignocellulose-degrading Actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 46(2) (1987), 145-163.
- [9] Ravi Ranjan Kumar, V.J.J., Isolation of Actinomycetes: A Complete Approach. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5) (2016), 606-618
- [10] Swati Deep, Pratibha Sharma, Niranjana Behera, Optimization of extracellular cellulase enzyme production from *Alternaria brassicicola*, *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 3(9) (2014), 127-139