

PHÂN LẬP CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY POLY(L-LACTIC AXIT)

Nguyễn Thị Thanh Lịch¹, Lê Hải Vân¹, Nguyễn Quang Huy^{1, 2}

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

²Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ protein và enzyme

Email: huy_nq@hus.edu.vn

Đến Toà soạn ngày: 7/9/2011; Chấp nhận đăng ngày: 20/4/2012

TÓM TẮT

Ngày nay, các sản phẩm nhựa truyền thống ngày càng được sử dụng phổ biến. Tuy nhiên, do đặc tính khó phân hủy, các sản phẩm nhựa có nguồn gốc hóa dầu này đã gây nên hiện tượng ô nhiễm rác thải đáng báo động. Việc sử dụng các vật liệu sinh học (biopolymer) có tính năng tự phân hủy như hydroxybutyrate (PHB), poly (lactic acid) (PLA), poly (ϵ -caprolactone) (PCL)... để thay thế các sản phẩm nhựa truyền thống đã và đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu. Mặc dù là vật liệu có khả năng tự phân hủy sinh học, tuy nhiên có ít nghiên cứu về khả năng tự phân hủy sinh học của PLA, đặc biệt là sự phân hủy nhờ các vi sinh vật. Từ các mẫu đất và nước thải thu được tại các địa điểm ô nhiễm rác thải ở Việt Nam, 12 chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy PLA đã được phân lập bằng phương pháp làm giàu môi trường. Trong số các chủng phân lập, chủng T2 được chọn cho nghiên cứu tiếp theo nhờ khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường tuyền chọn có bổ sung PLA là nguồn cac bon duy nhất. Sau 20 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 37 °C, chủng T2 có khả năng phân hủy hơn 79,9 % lượng PLA được bổ sung vào môi trường. Chủng T2 cũng phân hủy hơn 39,9 % PCL và 71 % PHB ban đầu sau 20 ngày nuôi cấy ở 37 °C. Kết quả phân tích trình tự 16S rDNA cho thấy chủng T2 tương đồng 99,9 % với trình tự gen 16S rDNA của *Klebsiella variicola*_AJ783916.

Từ khóa: Vi sinh vật phân hủy, Poly lactic axit, phân lập, Klebsiella

1. MỞ ĐẦU

Polymer sinh học có nhiều đặc tính tương tự như polymer tổng hợp từ dầu mỏ nhưng lại ưu điểm là có khả năng bị phân hủy bởi vi sinh vật trong tự nhiên thành các hợp chất cơ bản như cacbon, CO₂, H₂O do đó không gây ô nhiễm môi trường. Polymer sinh học là dạng polymer tổng hợp từ các polyester như poly (L-lactic) (PLA), poly (β -hydroxybutyrate) (PHB), poly (ϵ -caprolactone) (PCL)... PLA hiện được sản xuất với số lượng ngày một nhiều trong những năm gần đây. Chúng được sử dụng trong công nghiệp gia công nhựa để sản xuất các sản phẩm như chai lọ, các loại bao bì hay trong công nghiệp dược phẩm, y tế như các loại chỉ khâu, vật liệu thay thế... [1].

Vi sinh vật phân hủy polymer sinh học nói chung và PLA nói riêng luôn tồn tại trong các môi trường tự nhiên khác nhau như đất, nước, bùn... Số lượng, chủng loại các vi sinh vật có khả năng phân hủy polymer sinh học phụ thuộc vào các điều kiện tự nhiên [2 - 4]. Kết quả nghiên cứu của Song và cộng sự cho thấy trong 1g đất chứa từ $1,6 \times 10^4$ đến $8,7 \times 10^5$ tế bào, trong đất bùn là $5,1 \times 10^5$ tế bào còn nước biển cũng có từ 10^2 đến 10^3 tế bào/ml vi sinh vật có khả năng sử dụng hay phân hủy các loại polymer sinh học khác nhau [5].

Vi sinh vật có khả năng sử dụng, phân hủy PLA bao gồm nấm mốc, xạ khuẩn và vi khuẩn. Jarerat và cộng sự [6] đã nghiên cứu khả năng phân hủy PLA của các chi thuộc lớp xạ khuẩn và thấy rằng các chủng xạ khuẩn có khả năng phân hủy poly(L-lactide) chủ yếu là các loài thuộc họ Pseudonocardiaceae và các chi liên quan như *Amycolatopsis*, *Saccharothrix*, *Lenzea*, *Kibdelosporangium* và *Streptoalloteichus*. Trong đó chi *Saccharothrix* có khả năng phân hủy PLA mạnh nhất. Paramuda và cộng sự [7] đã phân lập chủng xạ khuẩn *Amycolatopsis* sp có khả năng phân hủy tới 60 % PLA dạng màng mỏng sau 14 ngày nuôi cấy. Torres và cộng sự [8] đã phân lập và nghiên cứu trên 14 loài nấm khác nhau trong tự nhiên sử dụng PLA bao gồm các chi: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* và *Trichoderma*. Các chủng nấm mốc phân lập có khả năng sử dụng axit lactic và PLA khối lượng phân tử thấp. Trong số đó chủng *Fusarium moniliforme* có khả năng phân hủy mạnh nhất [8].

Tuy nhiên, hiện nay chưa có nhiều công bố đến các chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng PLA. Một số ít công trình mới đề cập đến khả năng phân hủy PLA từ các chủng vi khuẩn ưa nhiệt [9, 10]. Hiện nay ở Việt Nam số lượng các công bố điều tra nghiên cứu về vi sinh vật có khả năng phân hủy các polymer sinh học trong đó có PLA còn ít và chưa đầy đủ. Gần đây mới có một số ít công trình đề cập đến một số chủng xạ khuẩn, nấm có khả năng sử dụng PLA và một số polymer sinh học [11]. Trong bài báo này chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu trong việc phân lập các chủng vi khuẩn ở Việt Nam có khả năng phân hủy PLA cũng như một số polymer sinh học khác làm cơ sở cho việc ứng dụng trong việc tạo các chế phẩm, chủ động trong việc tăng nhanh quá trình phân hủy tự nhiên và giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Các mẫu đất được thu thập từ khu vực nhà máy xử lý rác thải Cầu Diễn, Từ Liêm, Hà Nội trong thời gian tháng 4/2011. Các mẫu sau khi thu thập được bảo quản chuyển về phòng thí nghiệm và phân tích trong vòng 24 giờ.

Poly L-lactic axit (PLA), Poly (β -hydroxybutyrate) (PHB), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) được mua từ hãng Sigma (Mỹ) và Takara (Nhật Bản), các hoá chất khác đạt độ tinh khiết trong phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường khoáng KH_2PO_4 : 1,55 g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,85 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0, 1g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 2 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2 mg; nước cất 1 lít. PLA được hoà tan hoàn toàn trong chloroform và bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ 0,2 % (w/v) là nguồn cacbon duy nhất [11].

Đánh giá sự sinh trưởng của các chủng vi sinh vật dựa trên việc đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 600 nm. Phát hiện khả năng sinh trưởng của vi khuẩn trên đĩa thạch bổ sung PLA bằng phương pháp sử dụng thuốc nhuộm Iodoritrotetrazolium chloride 0,25 % [12].

Đánh giá khả năng phân huỷ PLA được thực hiện bằng phương pháp cân thu hồi [6]. Lượng PLA được thu hồi bằng cách li tâm dịch nuôi cấy tách phần cặn, hòa tan trong chloroform sau đó được sấy 70° trong 24 giờ khối lượng không đổi. Tế bào vi sinh vật sau khi tách PLA cũng được sấy khô đến lượng không đổi ở 105 °C trong 6 giờ.

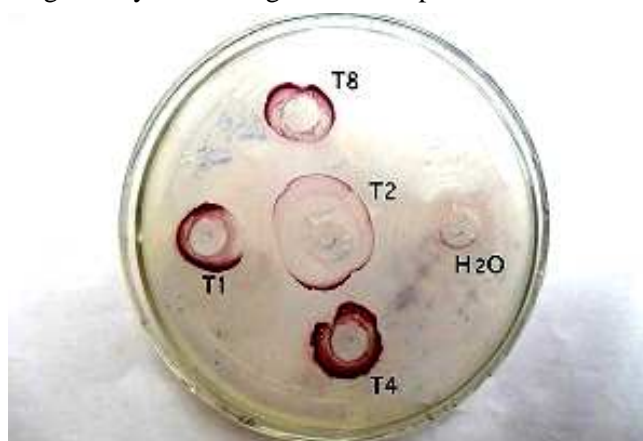
Mẫu vi khuẩn được cố định trên lamén sau đó được phủ vàng lên bề mặt. Tiến hành soi và chụp ảnh trên kính hiển vi điện tử quét JEOL 5410 LV (Nhật Bản) ở các độ phóng đại khác nhau tại Trung tâm Khoa học Vật liệu, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

Trình tự gen 16S rDNA của các chủng vi khuẩn được đọc trực tiếp trên máy phân trình tự tự động 3100-Avant Genetic Analyzer (Mỹ) với sự giúp đỡ của Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Trình tự gen được so sánh với trình tự gen 16S rDNA trong ngân hàng gen quốc tế, xây dựng trên cây phân loại dựa trên phần mềm Treeview.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng phân huỷ PLA

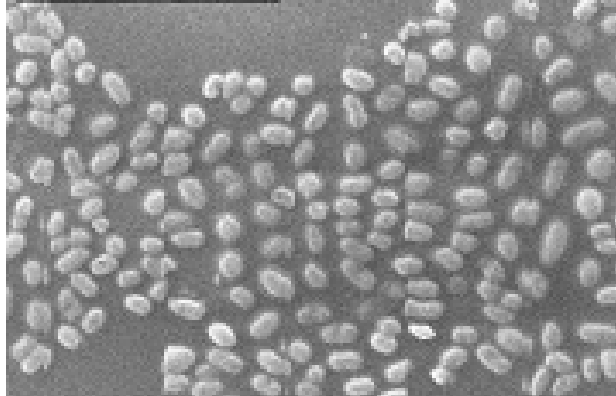
Từ các mẫu đất, nước tại khu vực xử lý rác thải Cầu Diễn, Từ Liêm, Hà Nội chúng tôi đã phân lập được 12 chủng vi sinh vật có hình thái khác nhau có khả năng sinh trưởng trên môi trường khoáng có bổ sung PLA là nguồn cacbon duy nhất. Trong số 12 chủng vi sinh vật được phân lập, chúng tôi lựa chọn 4 chủng sinh trưởng mạnh nhất ký hiệu T1, T2, T4, T8. Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch khoáng bổ sung PLA cả 4 chủng đều có khả năng tạo vòng phân huỷ khá rõ trong đó chủng T2 có khả năng tạo vòng phân huỷ lớn nhất đường kính vòng phân huỷ gần 2,5 cm các chủng còn lại có vòng phân huỷ thấp hơn, đều dưới 1,2 cm (hình 1). Khả năng phân huỷ PLA được tìm thấy ở vi khuẩn, nấm sợi và xạ khuẩn nhưng hầu hết đều thuộc lớp xạ khuẩn [5]. Không có nhiều công bố về khả năng phân huỷ PLA từ các chủng vi khuẩn do vậy, chúng tôi lựa chọn chủng T2 này cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Khả năng sinh trưởng và tạo vòng phân huỷ PLA của các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường thạch bổ sung PLA (sử dụng thuốc nhuộm Iodoritrotetrazolium chloride)

3.2. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, phân loại chủng T2

Nghiên cứu đặc điểm hình thái của chủng T2 cho thấy tế bào chủng T2 có dạng hình que ngắn (rod), khuẩn lạc bóng hơi nhày và là chủng gram (-) (hình 2).



Hình 2. Hình thái tế bào chủng T2 dưới kính hiển vi điện tử ($\times 5000$)

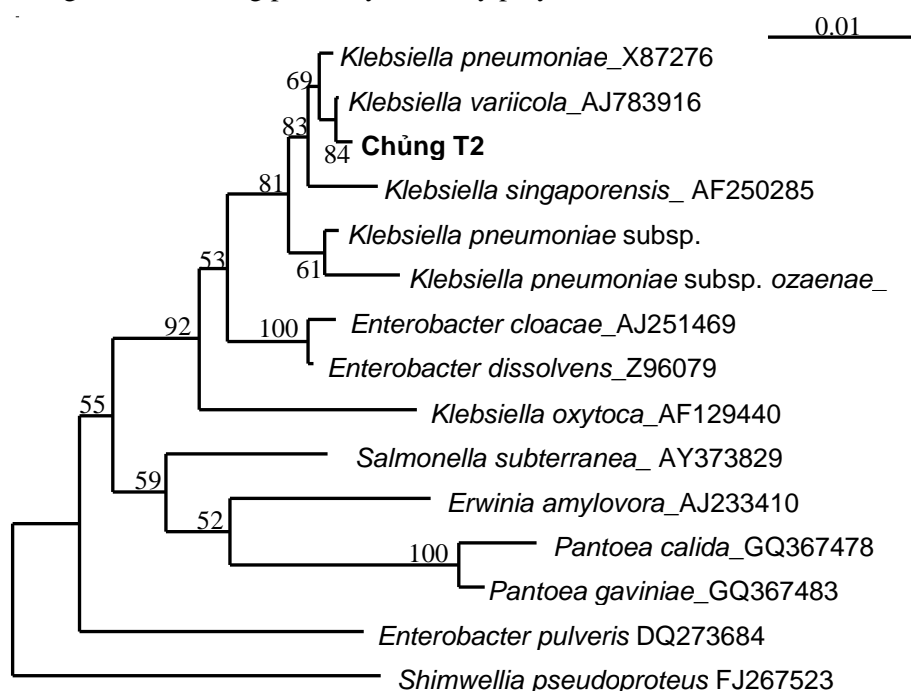
Bảng 1. Một số đặc điểm sinh học của chủng T2

Đặc điểm nghiên cứu	Chủng T2
Nhiệt độ sinh trưởng	37-65 °C
pH tối ưu	5
Nồng độ NaCl tối ưu	0,5%
Khả năng sử dụng đường	
D(+) Galactose	+
D(+) Glucosamin	-
L(-) Fucose	+
Fructose	+
Sucrose	+
D(+) Glucose	+
L(+) Arabinose	+
Lactose	+
Hoạt tính enzym	
Catalase	+
Cellulase	+
Protease	+
Amylase	-

Nghiên cứu các điều kiện sinh trưởng của chủng T2 trong môi trường khoáng có bổ sung PLA là nguồn cacbon duy nhất, nhận thấy khi nhiệt độ môi trường nuôi cấy dưới 20 và trên 65 °C chủng T2 đều không sinh trưởng. Chủng T2 sinh trưởng tốt trong khoảng nhiệt độ từ 37 đến 65 °C. Về độ pH môi trường kết quả nghiên cứu cho thấy chủng T2 sinh trưởng tốt trong môi trường axit yếu và trung tính và không sinh trưởng trong môi trường kiềm. Chủng T2 có khả năng sử dụng nhiều loại đường khác nhau. Trong số 8 loại đường thí nghiệm chủng T2 chỉ không sử dụng được D(+) Glucosamine trong quá trình sinh trưởng. Nghiên cứu hoạt tính của một số enzym phân giải như amylase, catalase, protease và cellulase nhận thấy chủng T2 không có khả năng tổng hợp amylase nhưng có hoạt tính protease, cellulase và catalase (bảng 1).

Nghiên cứu các điều kiện sinh trưởng của chủng T2 trong môi trường khoáng có bổ sung PLA là nguồn cacbon duy nhất, nhận thấy khi nhiệt độ môi trường nuôi cấy dưới 20 và trên 65 °C chủng T2 đều không sinh trưởng. Chủng T2 sinh trưởng tốt trong khoảng nhiệt độ từ 37 đến 65 °C. Về độ pH môi trường kết quả nghiên cứu cho thấy chủng T2 sinh trưởng tốt trong môi trường axit yếu và trung tính và không sinh trưởng trong môi trường kiềm. Chủng T2 có khả năng sử dụng nhiều loại đường khác nhau. Trong số 8 loại đường thí nghiệm chủng T2 chỉ không sử dụng được D(+) Glucosamine trong quá trình sinh trưởng. Nghiên cứu hoạt tính của một số enzym phân giải như amylase, catalase, protease và cellulase nhận thấy chủng T2 không có khả năng tổng hợp amylase nhưng có hoạt tính protease, cellulase và catalase (bảng 1).

Kết quả giải trình tự gen 16S rDNA của chủng T2 cho thấy đoạn trình tự này tương đồng 99,9 % (1398/1400 bp) với đoạn 16S rDNA của *Klebsiella variicola*_AJ783916; tương đồng 99,6 % (1394/1400 bp) với *Klebsiella pneumoniae*_X87276 (hình 3). Chi *Klebsiella* thường phân bố trong đất, nước và trong một số mẫu bệnh phẩm ở người và động vật. Hiện nay, chưa có nhiều công bố về khả năng phân hủy PLA hay polymer sinh học của các loài thuộc chi này.

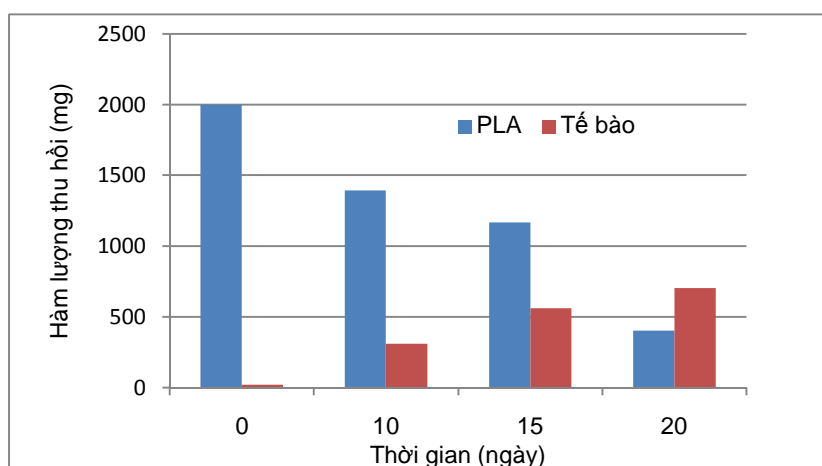


Hình 3. Vị trí phân loại chủng vi khuẩn T2 và các loài có quan hệ họ hàng gần dựa vào trình tự gen 16S rDNA

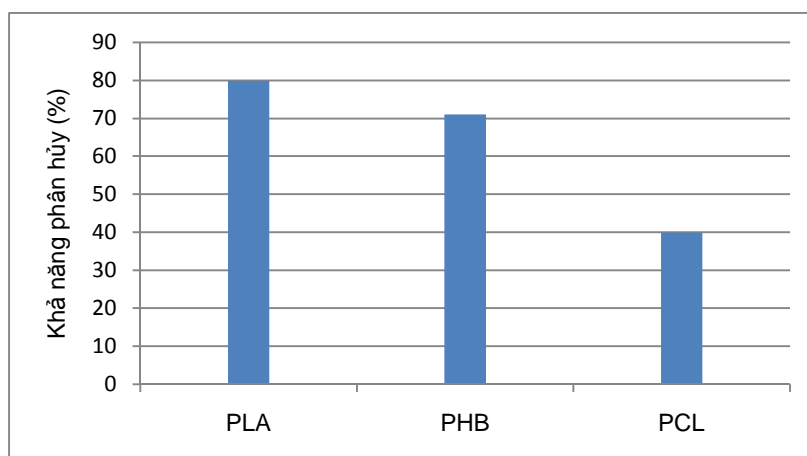
3.3. Khả năng phân huỷ PLA và một số polymer sinh học của chủng T2

Kết quả nghiên cứu cho thấy khối lượng PLA trong các mẫu thí nghiệm có mặt chủng T2 đều giảm so với mẫu đối chứng, điều này cho thấy chủng T2 đã sử dụng PLA để sinh trưởng (hình 4). Khả năng sử dụng PLA của chủng T2 tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Tuy nhiên khả năng phân huỷ chỉ tăng mạnh sau 10 ngày nuôi cấy. Sau 15 ngày khả năng phân huỷ PLA của chủng T2 là 41,65 %. Sau 20 ngày khả năng phân huỷ PLA của chủng T2 tăng lên tới 79,9 % so với mẫu đối chứng. Đồng thời khối lượng tế bào trong môi trường nuôi cấy cũng tăng từ 20 mg tế bào ở mẫu đối chứng sau 10 ngày tăng lên 310 mg và sau 20 ngày là trên 700 mg nên góp phần khẳng định sự phát triển của chủng T2 trong môi trường có PLA là nguồn cacbon duy nhất (hình 4). So sánh với các kết quả nghiên cứu trước đây của Pramuda và cộng sự [7], Ikura và Kudo [9] khả năng phân huỷ PLA của chủng T2 là chưa cao. Trong nghiên cứu của Tomita và cộng sự cho thấy trong tự nhiên số lượng vi sinh vật nói chung và vi khuẩn nói riêng có khả năng phân huỷ PLA là không nhiều so với nấm mốc và đặc biệt là xạ khuẩn [10]. Chủng T2 là một trong số không nhiều các chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng PLA.

PHB, PCL cùng với PLA các polyme sinh học được sử dụng nhiều nhất trong việc sản xuất các nhựa phân huỷ sinh học. Chúng tôi cũng tiến hành đánh giá khả năng phân huỷ các polymer sinh học này của chủng T2 trong môi trường khoáng bổ sung 0,2 % (w/v) PHB hoặc PCL là nguồn cacbon duy nhất. Kết quả cho thấy khối lượng PHB, PCL trong các mẫu có bổ sung vi sinh vật đều giảm so với thời điểm ban đầu. Chủng T2 có khả năng sử dụng PLA tốt hơn so với PHB và PCL. Sau 20 ngày nuôi cấy chủng T2 đã phân huỷ được PHB và PCL lần lượt là 71,03 % và 39,94 % lượng polymer tương ứng trong môi trường (hình 5). So với kết quả một số nghiên cứu trong nước của Nguyễn Quang Huy và cộng sự cho thấy khả năng sử dụng đồng thời các polymer sinh học của chủng T2 không kém hơn so với các chủng nấm mốc và xạ khuẩn đã được phân lập [11].



Hình 4. Khả năng phân huỷ PLA sau 20 ngày nuôi cấy chủng T2 ở nhiệt độ 37 °C



Hình 5. Khả năng phân hủy một số polyme sinh học của chủng T2

Theo các nghiên cứu công bố của Teeraphatpornchai và cộng sự [3] số lượng các chủng vi sinh vật trong tự nhiên vừa có khả năng phân hủy PLA, vừa có khả năng phân hủy PHB và PCL tương tự như chủng T2 là không nhiều. Trong nghiên cứu của Jarerat và Tokiwa [6] khả năng phân hủy PLA cũng như một số các polymer sinh học khác của các chủng vi sinh vật có thể tăng lên nếu bổ sung thêm các chất cảm ứng như gelatin vào môi trường. Do đó chúng tôi đang tiếp tục nghiên cứu nhằm tối ưu cho sự phân hủy PLA, PHB và PCL đối với chủng T2.

4. KẾT LUẬN

Chủng T2 có khả năng phân hủy PLA tốt nhất trong số 12 chủng vi sinh vật được phân lập. Đã xác định một số đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hoá cũng như giải trình tự gen 16S rDNA của chủng T2. Trình tự gen 16S rDNA của chủng T2 tương đồng 99,9 % (1398/1400 bp) với đoạn 16S rDNA của *Klebsiella variicola*_AJ783916.

Chủng T2 phân hủy được 79,9 %, 71,03 % và 39,94 % khối lượng tương ứng PLA, PHB, PCL sau 20 ngày nuôi ở nhiệt độ 37 °C.

Lời cảm ơn. Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Quỹ Khoa học quốc tế IFS (International Foundation for Science, Thụy Điển) mã số F/4926-1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tokiwa Y., Calabia B. P., Ugwu C. U., and Aiba S. - Biodegradability of plastics, *Int. J. Mol. Science.* **10** (2009) 3722-3742.
2. Nishida H. and Tokiwa Y. - Distribution of poly (β -hydroxybutyrate) and poly (ϵ -caprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments, *J. Environ. Polym. Degrad.* **1** (1993) 227-233.
3. Teeraphatpornchai T., Nakajima K. T., Shigeno A. Y., Nakayama M., Nomura N., Nakahara T., and Uchiyama H. - Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics, *Biotechnol. Lett.* **25** (2003) 23-28.

4. Tokiwa Y. and Jarerat A. - Biodegradation of poly (L- lactide), *Biotechnol. Lett.* **26** (2004) 771-777.
5. Song C. J., Wang S. F., Ono S., Zhang B. H., Shimasaki C., and Inoue M. - The biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/V) and PHB/V degrading microorganisms in soil, *Polymer. Adv. Tech.* **14** (2003) 184-188.
6. Jarerat A. and Tokiwa Y. - Degradation of poly (L-lactide) by fungus, *Macromol. Biosci.* **1** (2002) 136-140.
7. Paramuda H., Tokiwa Y., and Tanaka H. - Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (1997) 1637-1640.
8. Torres A., Li S. M., Roussos S., and Vert M. - Screening of microorganisms for biodegradation of poly (lactic acid) and lactic acid-containing polymer, *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1996) 2393-2397.
9. Ikura Y. and Kudo T. - Isolation of microorganism capable of degrading poly (L-lactic acid), *J. Gen. Appl. Microbiol.* **45** (1999) 247-251.
10. Tomita K., Nakajima T., Kikuchi Y., and Miwa N. - Degradation of poly(L-lactic acid) by a newly isolated thermophile, *Polym. Degrad. Stab.* **84** (2004) 433-438.
11. Nguyễn Q. H., Đỗ H. D., Lê V. C. - Khả năng phân huỷ poly-L-lactide) của một số chủng xạ khuẩn phân lập tại Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **48** (3) (2010) 57-65.
12. Eloff J. N. - A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, *Planta Med.* **64** (1998) 711-713.

ABSTRACT

ISOLATION OF BACTERIA STRAINS CAPABLE TO DEGRADATE POLY (LACTIC ACID)

Recently, the products of synthetic polymers as plastics have been commonly utilized. However, the facts have shown that due to their extreme resistance to microbial attacks, these products are conducive to the enormous wastes, which lead to put environment in danger. Biopolymers, such as poly hydroxybutyrate (PHB), poly (lactic acid) (PLA), poly (ϵ -caprolactone) (PCL)..., are gradually replacing ordinary plastic in daily activities, which results from their capability to degrade rapidly themselves. PLA is now one of the focuses of world wide attention. In spite of an active interest in PLA as a biodegradable material, there have been only few studies on its biodegradation, especially on its microbial degradation.

Twelve PLA-degrading bacteria were isolated from wasted soil and water samples by enrichment method. One of them, strain T2 was selected to next research because of its rapid growth in the selective medium added PLA as carbon source and the ability of forming largest clear zone on plate. After 20 days of cultivation, strain T2 degraded more than 79.9 % PLA added in the culture at 37 °C. Biochemistry characterizations showed that strain T2 expressed protease, cellulose and catalase activity and used some kinds of sugar such as sucrose, fructose, glucose...The 16S rRNA gene sequence analysis, strain T2 was similar 99.9 % with 16S rARN of *Klebsiella variicola*_AJ783916. This strain also degraded more than 39.9 % PCL and 71 % PHB added in the culture after 20 days of cultivation at 37 °C.

Keywords. PLA- degrading bacteria, Poly (lactic acid), isolation, Klebsiella.