

TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN ƯA NHIỆT VÀ CHỊU AXIT CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP XENLULOZA CAO TỪ BÃ THẢI DỨA

TÀNG THỊ CHÍNH, TRẦN HÀ NINH

Viện Công nghệ môi trường

HOÀNG THỊ DUNG

Viện Đại học mở Hà Nội

Phần lớn các nhà máy chế biến dứa ở nước ta chưa quan tâm đến việc chế biến phụ phẩm và phế thải như vỏ dứa, lõi dứa và bã dứa cũng như xử lý nước thải. Theo thống kê của các công ty chế biến dứa, để sản xuất được 1 tấn dứa thành phẩm, phải cần tới 2 tấn quả dứa nguyên liệu [2]. Như vậy, ước tính với sản lượng dứa hiện nay của nước ta là 1,5 triệu tấn quả/năm, nếu được sử dụng để chế biến, thì mỗi năm chúng ta có khoảng 750 ngàn tấn phế liệu do các nhà máy chế biến dứa thải ra. Một nguồn phế thải khổng lồ, nếu không có biện pháp xử lý tốt sẽ là nguồn gây ô nhiễm môi trường. Bã thải dứa và nước thải của các nhà máy chế biến dứa thường có pH thấp (3,5-5). Phần lớn bã thải dứa ở nước ta đều được đem đi chôn lấp, trong khi đó đất trồng dứa lại không có phân hữu cơ để bón. Với lượng phế thải như trên, nếu sử dụng vi sinh vật để xử lý thành phân bón, sẽ vừa giải quyết được triệt để nguồn gây ô nhiễm môi trường, vừa tiết kiệm được diện tích đất để chôn lấp phế thải, vừa cung cấp được một lượng phân hữu cơ rất lớn để cải tạo đất, trả lại độ phì cho đất, đồng thời tăng thêm nguồn thu nhập cho các nhà máy. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn (XK) ưa nhiệt có khả năng sinh enzym phân huỷ mạnh xenluloza (thành phần chính khó phân huỷ của bã dứa) trong điều kiện môi trường axit để phục vụ cho việc nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý phế thải dứa thành phân bón hữu cơ.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Môi trường

Môi trường xenluloza có pH thấp (4-5) [1].

2. Phương pháp phân lập, tuyển chọn các chủng XK ưa nhiệt có khả năng sinh enzym thủy phân xenluloza

Cân 10 g mẫu đất (hoặc bã dứa ủ mục) được thu thập từ các khu vực của các nhà máy chế biến dứa; cho vào các bình nón có chứa sẵn 90 ml nước máy đã vô trùng, sau đó lắc trong 10 phút cho mẫu tan đều. Chuẩn bị các ống nghiệm chứa 9 ml nước máy đã vô trùng để pha loãng mẫu 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

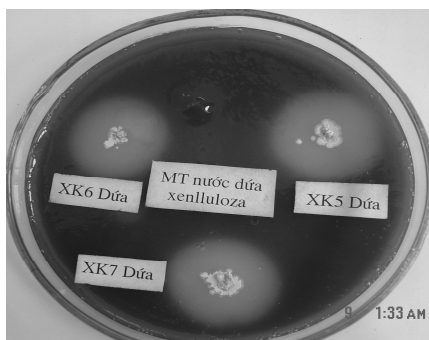
Dùng pipet hút 0,1 ml dịch pha loãng ở các nồng độ trên 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} nhỏ vào các đĩa thạch có chứa môi trường xenluloza có pH = 4. Dùng que gạt trang đều trên mặt thạch, sau đó nuôi trong tủ ấm ổn nhiệt ở nhiệt độ 45°C. Sau 4 ngày, lấy ra quan sát và tách các khuẩn lạc XK mọc riêng rẽ rồi cấy truyền chúng vào đĩa thạch có chứa môi trường xenluloza để chọn các khuẩn lạc có khả năng sinh enzym thủy phân xenluloza. Sau khi nuôi 4 ngày, lấy ra và dùng thuốc thử lugol để kiểm tra vòng phân giải xenluloza được tạo thành. Chủng XK nào có vòng phân giải lớn (vùng không màu xung quanh khuẩn lạc khi nhỏ dung dịch lugol) sẽ được giữ giống để tiếp tục nghiên cứu.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phân lập và tuyển chọn các chủng XK ưa nhiệt, chịu axit có khả năng sinh tổng hợp xenluloza

Để phân lập được các chủng XK ưa nhiệt có thể phân giải được xenluloza từ bã thải dứa, chúng tôi đã tiến hành lấy mẫu đất và mẫu bã dứa đã lên men từ nhà máy chế biến dứa Đồng Giao. Các mẫu đất và bã dứa được pha loãng, rồi nhỏ 0,1 ml dịch pha loãng vào các hộp petri có chứa

môi trường xenluloza với pH = 4. Các khuẩn lạc XK mọc riêng rẽ trên môi trường xenluloza được tách ra và cấy chấm điểm vào đĩa petri khác có chứa môi trường xenluloza để xác định hoạt tính xenluloza. Sau khi nuôi 4 ngày trong tủ ấm 45°C, lấy ra để xác định vòng phân giải xenluloza bằng dung dịch lugol (hình 1).



Hình 1. Hoạt tính xenluloza của 3 chủng xạ khuẩn D5, D6 và D7 được tuyển chọn trên môi trường xenluloza với pH = 4,5

Từ kết quả thử hoạt tính xenluloza của các chủng xạ khuẩn phân lập được, chúng tôi đã tuyển chọn được 3 chủng xạ khuẩn có hoạt tính xenluloza mạnh nhất (đường kính của vòng phân giải xenluloza lớn hơn 20 mm) và được ký hiệu là D5, D6 và D7. Ba chủng XK này phát triển tốt ở nhiệt độ 45°C trong môi trường pH = 4; chúng được cấy chuyển vào các ống nghiệm chứa môi trường gause1, nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C; sau 4 đến 5 ngày, khi các chủng XK phát triển tốt thì được đưa vào tủ lạnh bảo quản để làm giống phục vụ cho các nghiên cứu tiếp.

2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh trưởng của các chủng XK D5, D6 và D7

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh trưởng phát triển của 3 chủng XK D5, D6 và D7, chúng tôi tiến hành nuôi cấy các chủng XK trên môi trường gause1 ở các thang nhiệt độ khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh trưởng và phát triển của các chủng XK D5, D6 và D7

Chủng XK	25°C	37°C	45°C	50°C	55°C	60°C
D5	+	++	+++	+++	+	±
D6	+	++	+++	+++	++	+
D7	+	++	+++	+++	++	+

Ghi chú: -. không phát triển; +. phát triển yếu; ++. phát triển bình thường; +++. phát triển mạnh; +++++. phát triển rất mạnh.

Kết quả nghiên cứu cho thấy chúng sinh trưởng tốt nhất trong dải nhiệt độ từ 45-50°C. Nếu nhiệt độ nuôi cấy ở dưới 37°C và trên 55°C, chúng phát triển rất yếu hoặc không phát triển. Từ đó, có thể khẳng định rằng các chủng XK này là các chủng ưa nhiệt.

3. Ảnh hưởng của độ pH lên sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp xenluloza của các chủng XK D5, D6 và D7

pH của môi trường có ý nghĩa quyết định đối với sự sinh trưởng của XK. Trong việc

tuyển chọn các chủng XK được sử dụng vào mục đích phân hủy bã thải dứa, vì pH của bã thải dứa thường từ 3,5 đến 4,5 sau khi chế biến, cho nên việc xác định pH thích hợp ban đầu và việc duy trì pH cần thiết trong thời gian sinh trưởng của các chủng XK là rất quan trọng. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường nuôi cấy lên sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp xenluloza của các chủng XK D5, D6 và D7 với giá trị thay đổi từ 4 đến 7. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2

Ảnh hưởng của pH lên sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp xenluloza của các chủng XK D5, D6 và D7

Chủng XK	Sinh khối của các chủng XK (mg/ml)				Đường kính của vòng phân giải xenluloza (D-d), mm			
	pH4	pH5	pH6	pH7	pH4	pH5	pH6	pH7
D5	3,515	5,06	3,115	1,315	12	24	14	6
D6	2,41	4,185	2,6	1,825	11	20	13	7
D7	2,345	6,535	2,515	1,155	13	28	15	8

Kết quả ở bảng 2 cho thấy ba chủng XK D5, D6 và D7 có thể sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza trong môi trường có pH ban đầu nằm trong khoảng từ 4-7. Chúng sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza tốt nhất trong môi trường có pH ban đầu là 5. Như vậy, các chủng XK này là các chủng chịu axit.

4. Ảnh hưởng của các nguồn cacbon lên sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng XK D5, D6 và D7

Trong tự nhiên, các hợp chất cacbon có phân tử lớn như tinh bột, xenluloza, hemi-xenluloza chiếm một phần rất lớn. Nhưng, để hấp thụ được các chất cacbon này, thì XK phải tiết ra các enzym để thủy phân chúng thành những phân nhỏ hơn. Mỗi loại XK thường sinh

trưởng tốt trên một số nguồn cacbon nhất định. Ảnh hưởng của các nguồn cacbon lên sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng XK D5, D6 và D7 được trình bày ở bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy ba chủng XK D5, D6 và D7 đều có khả năng sinh trưởng trên các môi trường có các nguồn cacbon đã nghiên cứu. Chúng phát triển tốt nhất trong môi trường có nguồn cacbon là saccarozơ và tinh bột; còn trong môi trường có nguồn cacbon là CMC-Na và xenluloza, chúng phát triển yếu hơn, nhưng trong các môi trường này chúng lại sinh tổng hợp xenlulaza cao hơn. Cả ba chủng XK này đều không sinh tổng hợp xenlulaza trong môi trường có nguồn cacbon là saccarozơ. Điều này cho thấy xenlulaza của các chủng xạ khuẩn này là enzym cảm ứng.

Bảng 3

Ảnh hưởng của các nguồn cacbon lên sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng XK D5, D6 và D7

Chủng XK	Sinh khối của các chủng XK (mg/ml)				Đường kính của vòng phân giải xenluloza (D-d), mm			
	Saccarozơ	Tinh bột	CMC-Na	Xenluloza	Saccarozơ	Tinh bột	CMC-Na	Xenluloza
D5	3,18	2,84	1,12	1,544	0	15	18	22
D6	2,86	3,412	1,24	1,72	0	10	20	20
D7	3,204	2,716	1,36	1,568	0	8	18	20

5. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng XK D5, D6 và D7

Để phân giải polysaccarit khó phân giải như xenluloza, tế bào VSV phải tổng hợp một lượng lớn xenlulaza; có chủng cần sử dụng tới 60% tổng nhu cầu nitơ cho việc sản xuất enzym ngoại bào. Vì vậy, ngoài việc nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn cacbon lên khả năng sinh tổng

hợp xenlulaza của các chủng XK, việc nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng XK có ý nghĩa rất quan trọng. Chúng tôi đã sử dụng một số nguồn nitơ thông dụng như KNO₃, pepsin, cao thịt, urê, bột đậu tương và (NH₄)₂SO₄ với nồng độ bổ sung vào môi trường nuôi cấy gause1 là 0,25% và với pH ban đầu của môi trường là 5 để tiến hành nghiên cứu. Kết quả được trình bày ở bảng 4, bảng 5 và hình 2.

Bảng 4

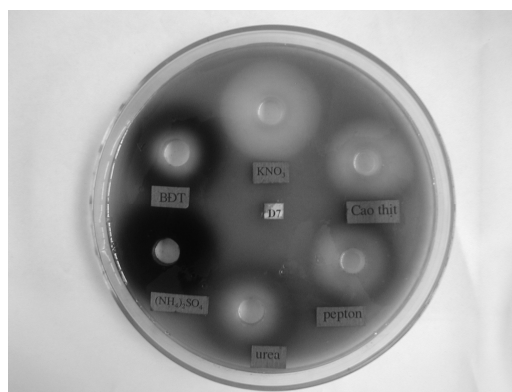
Ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên sự sinh trưởng của các chủng XK D5, D6 và D7

Chủng XK	Sinh khối khô (mg/ml) sau 72h nuôi lác ở 45°C					
	Pepsin	Cao thịt	Bột đậu tương	Urê	KNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄
D5	3,716	4,488	4,104	1,76	2,84	0,104
D6	4,616	4,208	4,348	1,248	3,412	0,208
D7	3,82	3,704	3,672	2,996	1,544	0,844

Kết quả ở bảng 4 cho thấy các chủng XK D5, D6 và D7 phát triển tốt nhất trong các môi trường có nguồn nitơ hữu cơ là cao thịt và péc-tôn. Trong các môi trường có nguồn nitơ vô cơ là KNO_3 và urê, chúng phát triển yếu hơn. Đặc biệt, trong môi trường có muối amôn, chúng hầu như không phát triển được. Như vậy, các nguồn nitơ hữu cơ là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của các chủng XK này.

Kết quả ở bảng 5 và hình 2 cho thấy ba chủng XK D5, D6 và D7 sinh tổng hợp xenlulaza mạnh nhất trong môi trường có nguồn nitơ là muối KNO_3 , còn trong môi trường có các nguồn nitơ là cao thịt và péc-tôn, chúng cũng sinh tổng hợp xenlulaza khá mạnh. Nhưng trong môi trường có muối sunphat amôn, chúng không sinh tổng hợp xenlulaza, vì trong môi trường này, chúng hầu như không phát triển được. Như

vậy, muối sunphat amôn không thích hợp cho sự sinh trưởng và sự sinh tổng hợp xenlulaza của ba chủng XK D5, D6 và D7.



Hình 2. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên khả năng sinh tổng hợp xenlulaza của chủng XK D7

Bảng 5

Ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên khả năng sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng XK D5, D6 và D7

Chủng XK	Đường kính của vòng phân giải xenluloza (D-d), mm					
	Cao thịt	Péc-tôn	Urê	KNO_3	Bột đậu tương	$(NH_4)_2SO_4$
D5	25	18	15	33	7	0
D6	25	25	14	29	11	0
D7	28	24	14	33	15	0

III. KẾT LUẬN

1. Từ các mẫu đất và bã dứa đã mục của các nhà máy chế biến dứa, chúng tôi đã phân lập và tuyển chọn được 3 chủng XK ưa nhiệt có khả năng sinh tổng hợp xenlulaza mạnh, được ký hiệu là D5, D6 và D7. Chúng sinh trưởng được trong dải nhiệt độ từ 25-60°C; nhiệt độ tốt nhất cho sự sinh trưởng của chúng là từ 45-55°C. Chúng có thể sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza trong môi trường có pH ban đầu từ 4-7, nhưng mạnh nhất trong môi trường có pH ban đầu là 5; đây là những chủng XK chịu axit.

2. Ba chủng XK D5, D6 và D7 sinh trưởng tốt nhất trong môi trường có các nguồn cacbon là saccarozơ và tinh bột. Nhưng chúng lại sinh tổng hợp xenlulaza cao nhất trong môi trường có nguồn cacbon là xenluloza hoặc CMC-Na.

3. Ba chủng XK D5, D6 và D7 sinh trưởng tốt trong môi trường có bổ sung các nguồn nitơ hữu cơ như cao thịt và péc-tôn. Nhưng chúng lại sinh tổng hợp xenlulaza cao nhất trong môi

trường có chứa muối KNO_3 . Muối sunphat amôn không thích hợp cho sự sinh trưởng và sự sinh tổng hợp xenlulaza của cả 3 chủng XK này.

Như vậy, ba chủng XK D5, D6 và D7 phát triển được trong môi trường có pH thấp (4-5) và là những chủng XK ưa nhiệt có khả năng sinh tổng hợp xenlulaza cao. Chúng có thể được sử dụng để sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ cho việc xử lý nhanh bã thải dứa thành phân hữu cơ phục vụ nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng và cs., 1976: Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập II, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Nguyễn Thế Truyền, 2004: Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu thiết kế, chế tạo dây chuyền thiết bị ép sấy bã dứa làm thức ăn gia súc. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

ISOLATION OF SOME THERMOPHYLIC AND ACID-RESISTANT *ACTINOMYCES* STRAINS BIOSYNTHESIZING CELLULASE FROM PINEAPPLE WASTE

TANG THI CHINH, TRAN HA NINH, HOANG THI DUNG

SUMMARY

Nowadays, in Vietnam, the pineapple cultivation surface reached 32,000 ha with 1.5 millions of pineapple fruit tones per year. In Vietnam, had been built 9 pineapple canneries and 6 pineapple juice factories, but most of them hadn't got technology for the solid waste and wastewater treatments, so their wastes always polluted the environmental areas.

Three thermophylic *Actinomyces* strains D5, D6 and D7 having high capacity to produce cellulase in the medium with pH = 4 were isolated from the pineapple waste. They could grow and synthesize cellulase with the incubation temperature from 25°C to 60°C and the optimum temperatures for their growth and their cellulase production were from 45°C to 50°C whith the pH = 5.

They grown well in the media containing saccharose and starch as carbon sources and organic nitrogen sources such as meat extract and peptone. But their highest cellulase production was in the media containing cellulose or CMC-Na as carbon sources and potassium nitrate as nitrogen source. They could not grow and produce cellulase in the media containing ammonium sulfate as nitrogen source.

So, these three *Actinomyces* strains could grow in the media whith pH = 4 and at high temperature. They will be used to make micro-organic product to treat the pineapple solid waste.

Ngày nhận bài: 4-10-2006