

PHÂN LẬP VI KHUẨN OXY HÓA METHANE NHẪM NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG ĐỂ TẠO NGUỒN ĐẠM VI SINH

Nguyễn Thị Hiếu Thu, Đinh Thuý Hằng

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài: 30.11.2015

Ngày nhận đăng: 02.7.2016

TÓM TẮT

Đạm đơn bào (single cell protein, SCP) được tạo ra từ sinh khối của nhiều loài vi sinh vật có hàm lượng protein cao, trong đó có vi khuẩn oxy hóa methane (MOB). Ưu điểm của loại đạm này là có thành phần dinh dưỡng cao, được chủ động sản xuất trong các thiết bị lên men với cơ chất là nhiều dạng chất thải hữu cơ, hoàn toàn không phụ thuộc vào diện tích trồng trọt, chăn nuôi hay ảnh hưởng của khí hậu như các loại đạm động thực vật. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn oxy hóa methane BG3 được phân lập từ nước thải sau biogas qua bước làm giàu trong môi trường khoáng dịch thể với methane (30% pha khí trong bình nuôi) là nguồn năng lượng và cacbon duy nhất. Chủng BG3 gồm các tế bào hình oval, kích thước 0,8-1×16 -1,8 μm , hầu như không chuyển động. So sánh trình tự gần đủ của 16S rDNA từ chủng BG3 với các trình tự tại GenBank cho thấy BG3 thuộc chi *Methylomonas*, loài gần gũi nhất là *M. koyamae* (97%). Vị trí phân loại trong chi *Methylomonas* còn được khẳng định qua phân tích trình tự gen *pmoA* mã hóa cho tiểu đơn vị α của enzyme methane-monooxygenase ở chủng này. Ngoài methane, chủng BG3 có thể sử dụng methanol làm cơ chất để sinh trưởng. Chủng BG3 sử dụng methane để tạo sinh khối với hiệu suất $\sim 2,8 \text{ m}^3$ methane/kg sinh khối khô, chứa hàm lượng protein thô ở mức cao (68,69%). Với khả năng chuyển hóa methane, khí nhà kính đáng quan tâm thứ hai sau CO_2 , thành sinh khối làm nguồn đạm chất lượng cao cho chăn nuôi, chủng BG3 có tiềm năng lớn trong ứng dụng thực tế ở Việt Nam hiện nay. Trình tự 16S rDNA và gen *pmoA* của chủng *Methylomonas* sp. BG3 được lưu giữ tại GenBank với mã số tương ứng là KJ081955 và KJ081956.

Từ khóa: Khí sinh học (biogas), Oxy hóa methane, MOB, đạm vi sinh (Single Cell Protein – SCP), *Methylomonas* sp.

MỞ ĐẦU

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). 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). MOB có mặt ở nhiều dạng môi trường khác nhau, nơi có nguồn methane và oxy được duy trì, ví dụ như đất ngập nước, đất ruộng lúa nước hay các hệ thống xử lý nước thải có hàm lượng hữu cơ cao (Stein, 2003). Bên cạnh vai trò sinh thái là kiểm soát phát thải methane trong tự nhiên, MOB còn được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác như tạo methanol từ methane, tạo màng lọc sinh học để hạn chế phát thải methane từ các hệ thống phân hủy hữu cơ (như các bãi chôn lấp rác), xử lý một số chất ô nhiễm như TCE (đặc biệt trong các hệ thống nước ngầm), sản xuất protein đơn bào làm thức ăn chăn nuôi, v.v. (Fritz, Hermann, 1977; Jang *et al.*, 2010).

Protein đơn bào (single cell protein) được sử dụng trong chăn nuôi như nguồn thay thế protein truyền thống (từ thực vật và động vật), ngày càng được quan tâm nghiên cứu trước tình hình an ninh lương thực, ô nhiễm môi trường và biến đổi khí hậu (Overland *et al.*, 2010). Các vi sinh vật thường được sử dụng cho mục đích sản xuất SCP gồm nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Candida utilis*, *Geotrichum candidum*), nấm sợi (*Aspergillus oryzae*, *Fusarium venenatum*, *Sclerotium rolfsii*, *Polyporus*, *Trichoderma*), vi khuẩn (*Rhodospseudomonas capsulate*, *Methylococcus capsulatus*)... Để tạo lượng sinh khối lớn, các vi sinh vật này được nuôi trên các loại cơ chất khác nhau, đặc biệt nhiều loại chất thải và phụ phẩm hữu cơ có thể được tận dụng (Khan, Dahot, 2010).

Nghiên cứu sản xuất SCP từ MOB được tiến hành từ những năm 70 của thế kỷ trước với sản phẩm thương mại tiêu biểu là Bioprotein của công ty Norferm Danmark A/S (Đan Mạch). Trong nghiên cứu tạo SCP từ *Methylococcus capsulatus* (Bath), Skrede và đồng tác giả (1998) đã sử dụng khí tự nhiên

(91% methane, 5% ethane, 1,7% propane, 1% butane) làm cơ chất, theo đó sản phẩm sinh khối có hàm lượng protein thô, chất béo, tro tương ứng là 70%, 10% và 7% (Skrede *et al.*, 1998). Thành phần các amino acid thiết yếu của SCP từ MOB cũng tương tự như trong nguồn đạm bột cá và bột đậu tương (Hellwing, 2005). Chúng MOB khác là *Methylomonas* sp. DSM 580 đã được sử dụng để sản xuất SCP từ methanol, đạt hiệu suất 0,44 g trọng lượng khô/g methanol, hàm lượng protein thô lên tới 76% (Fritz, 1977). Công nghệ sản xuất SCP có khả năng góp phần giải quyết vấn đề thiếu hụt protein trên thế giới, đặc biệt trong lĩnh vực chăn nuôi. SCP từ MOB nuôi bằng methane không những tạo ra nguồn đạm chất lượng cao mà còn góp phần giảm tác động của khí nhà kính này lên sự ấm lên toàn cầu.

Ở Việt Nam, việc xử lý các nguồn thải hữu cơ bằng công nghệ lên men kỵ khí sinh methane hiện đang tạo ra một lượng khí methane lớn chưa được sử dụng một cách hiệu quả do thiếu các công nghệ phù hợp. Chuyển hóa khí methane trong thành phần biogas thành sinh khối MOB có hàm lượng protein cao cho mục đích chăn nuôi lần đầu tiên được đề cập trong nghiên cứu này như một giải pháp tiềm năng cho việc sử dụng hiệu quả biogas, hạn chế phát thải methane từ quá trình phân giải chất thải hữu cơ ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Làm giàu và phân lập MOB

Việc làm giàu vi khuẩn oxy hóa methane được thực hiện trong bình serum 150 ml chứa 50 ml môi trường khoáng dịch thể (NaCl 1 g, MgCl₂.6H₂O 0,4 g, CaCl₂.2H₂O 0,15 g, KCl 0,5 g, NH₄Cl 0,25 g, KH₂PO₄ 0,2 g, MgSO₄.7H₂O 0,25 g, NH₄NO₃ 0,1 g, KH₂PO₄ 0,01g, Fe-EDTA 0.25 mg, nước cất 1000 ml), 1 ml hỗn hợp vi lượng (Widdel, 1992) và 2,5 ml hỗn hợp vitamin (Fuse *et al.*, 1998), bổ sung methane theo tỷ lệ methane : không khí là 1 : 2. Bình nuôi được giữ trong tủ ấm 30°C, lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 7 ngày. Nồng độ khí methane ban đầu và sau 7 ngày được xác định bằng sắc ký khí.

Chúng MOB thuần khiết được tiến hành phân lập qua dây pha loãng trên đĩa 96 giếng sử dụng môi trường khoáng như trong thí nghiệm làm giàu. Các đĩa này sau đó được đặt trong buồng thủy tinh kín chứa hỗn hợp methane/không khí với tỷ lệ 1:2, giữ ở 30°C trong bóng tối 1 – 2 tuần. Sự phát triển của MOB được xác định thông qua độ đục của dịch nuôi

đo ở bước sóng 600 nm bằng thiết bị đọc đĩa (Benchmark Plus, Beckman coulter, Mỹ) kết hợp quan sát tế bào dưới kính hiển vi. Các giếng ở độ pha loãng cao nhất có sự phát triển của vi sinh vật được sử dụng cho lần pha loãng kế tiếp và lặp lại quá trình tinh sạch này vài lần cho đến khi thu được chủng thuần khiết.

Tách DNA tổng số và phân tích trình tự 16S rDNA và gen *pmoA*

Chúng MOB thuần khiết được nuôi trên môi trường dịch thể, sau đó ly tâm 5000 v/p trong 10 phút để thu sinh khối. DNA tổng số được tách theo phương pháp của Marmur và đồng tác giả (1961). Đoạn 16S rDNA được khuếch đại với cặp mồi 27f (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) (Edwards *et al.*, 1989) và 1492r (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Weisburg *et al.*, 1991). Gen *pmoA* mã hóa cho tiểu đơn vị α của enzyme methane monooxygenase được khuếch đại với cặp mồi A189f (GGNGACTGGGACTTCTGG) và mb661r (CCGGMGCAACGTCYTTACC) (Fuse *et al.*, 1998).

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR-purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc), và sử dụng làm khuôn trong phản ứng giải trình tự với ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và đọc trên máy tự động 3110 Avant Applied Biosystems. Trình tự gen được phân tích, so sánh với trình tự các gen tương ứng của các loài có liên quan trên GenBank sử dụng Blast Search. Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining (Saitou, Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985).

Xác định hàm lượng protein trong sinh khối MOB

Nuôi MOB trong bình Duran Schott 1lit chứa 200 ml môi trường khoáng dịch thể bổ sung vi lượng và vitamin để thu sinh khối. Phần không khí phía trên môi trường trong bình nuôi là hỗn hợp methane (Messer Vietnam) : không khí = 1:2. Dịch nuôi được khuấy liên tục trên máy khuấy từ nhằm tăng mức hòa tan của pha khí vào pha lỏng. Bình nuôi được đặt tại 30°C, tránh ánh sáng trong thời gian 48 h (đạt OD₆₀₀ = 0,6). Sau 8 ngày, dịch tế bào được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút, thu sinh khối và sấy khô tại 80°C trong 24 h. Hàm lượng nitơ tổng trong sinh khối khô tế bào được xác định theo phương pháp Kjeldahl và hàm lượng protein thô được tính bằng cách lấy giá trị nitơ tổng số có trong 100 g tế bào khô nhân với hệ số 6,25 (theo TCVN 4328:2007).

Xác định hàm lượng methane bằng hệ thống sắc ký khí

Hàm lượng methane trong pha khí của các bình nuôi được phân tích bằng hệ thống sắc ký khí Agilent Technologies 7890A sử dụng đầu dò TCD (Temperature Conductive Detector). Chương trình phân tích cụ thể như sau: nhiệt độ đầu dò 250°C, nhiệt độ buồng tra mẫu 100°C, nhiệt độ lò 200°C, tốc độ dòng khí mang helium 3 ml/phút. Đường chuẩn methane được xây dựng từ kết quả phân tích dãy các nồng độ methane trong hỗn hợp với không khí (từ 0 – 50% thể tích) chứa trong các bình serum.

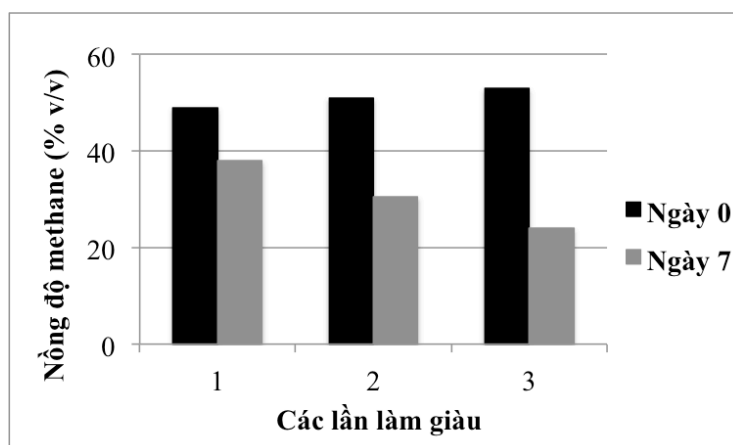
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Làm giàu MOB

Vi khuẩn oxy hóa methane được làm giàu trong các bình serum chứa ~ 30% methane trong pha khí. Nước thải sau biogas tại hệ thống xử

lý chất thải từ trang trại nuôi lợn thịt ở Vĩnh Phúc được sử dụng làm nguồn vi sinh ban đầu với tỷ lệ giống là 10% thể tích. Nước thải sau biogas hội tụ hai yếu tố cần thiết cho MOB sinh trưởng là khí methane và oxy hòa tan, do đó khả năng có mặt của MOB trong nguồn thải này là rất lớn. Các bình làm giàu được đặt tại 30°C trong điều kiện tránh ánh sáng, lắc 100 vòng/phút để đảm bảo vi sinh vật trong môi trường dịch thể được tiếp xúc với cơ chất dạng khí. Sinh trưởng của vi khuẩn trong các bình làm giàu được đánh giá thông qua quan sát sự thay đổi độ đục của dịch nuôi cùng với mức tiêu thụ methane trong bình (Hình 1).

Vi sinh vật trong các bình làm giàu có mức sinh trưởng không cao, OD₆₀₀ của dịch nuôi đạt mức ~0,5 sau mỗi tuần và lượng methane tiêu thụ tại bước làm giàu thứ nhất chỉ đạt ~20%. Tuy nhiên mức tiêu thụ methane tăng lên rõ rệt sau mỗi lần cấy truyền, đạt ~40% và 55% tương ứng ở các lần cấy truyền thứ hai và ba (Hình 1), chứng tỏ có sự sinh trưởng của vi khuẩn oxy hóa methane.



Hình 1. Làm giàu MOB từ nước thải sau biogas: Mức tiêu thụ methane của tổ hợp vi sinh vật trong dịch làm giàu qua các lần cấy truyền.

Phân lập MOB từ các mẫu làm giàu

Việc phân lập MOB bằng kỹ thuật cấy gạt để tách khuẩn lạc trên môi trường thạch thường khó thành công do nhóm vi khuẩn này sinh trưởng kém trên môi trường rắn, không thể cạnh tranh được với các loài vi khuẩn dị dưỡng cũng có mặt trong dịch làm giàu (Fuse *et al.*, 1998). Bên cạnh đó, MOB thường tạo các hợp chất đa phân tử ngoại bào, là cơ chất cho các nhóm vi khuẩn cơ hội (Bowman, 2006).

Để khắc phục những lý do trên, chúng tôi tiến hành phân lập MOB thông qua phương pháp dây pha loãng trong môi trường khoáng dịch thể, thực hiện trên đĩa 96 giếng vô trùng, sau đó đặt đĩa trong bình thủy tinh kín với bầu không khí có methane (30%) là nguồn năng lượng và cacbon duy nhất.

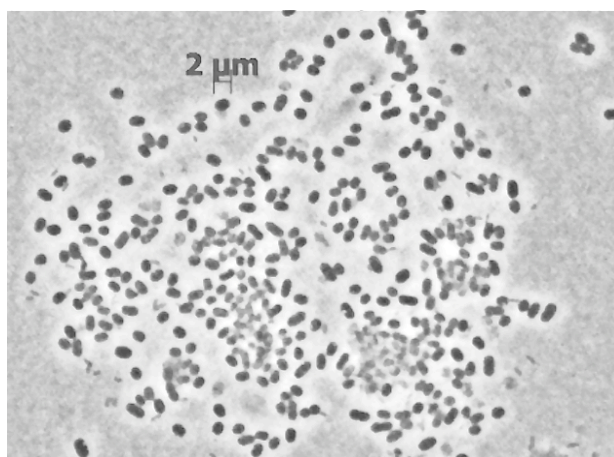
Dịch làm giàu lần thứ 3 được sử dụng để phân lập MOB trong nghiên cứu này. Dịch nuôi sau 7 ngày đạt OD₆₀₀ ~ 0,5 được pha loãng tới hạn trong

môi trường dịch thể rồi đưa lên đĩa 96 giếng sao cho xác suất duy nhất một tế bào MOB có mặt trong một giếng là cao nhất. Sau 1 – 2 tuần, dịch nuôi trong các giếng chuyển đục chứng tỏ có sự phát triển của vi sinh vật. Lặp lại nhiều lần quy trình trên, chủng BG3 thuần khiết đã được tinh sạch. Chủng này gồm các tế bào hình oval, kích thước 0.8-1×16-1.8 μm , hầu hết không chuyển động (Hình 2). Tại thời điểm cuối của pha sinh trưởng, chủng BG3 tạo lớp sinh khối dạng màng mỏng màu trắng hoặc hồng nhạt nằm dưới đáy bình nuôi.

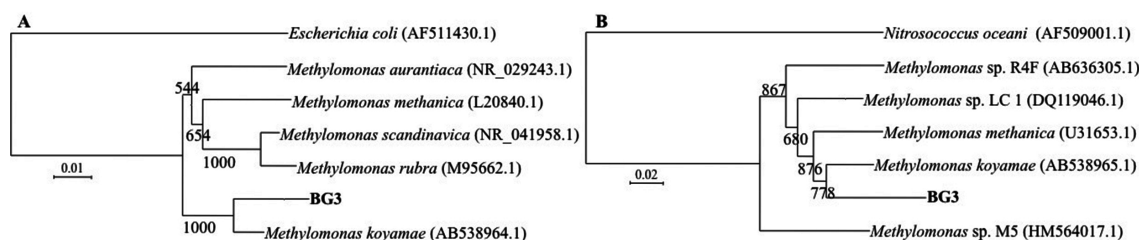
So sánh độ tương đồng của trình tự gần đủ gen 16S rDNA của chủng BG3 với các chủng MOB đã biết cho thấy, chủng này được xếp vào chi

Methylomonas, loài gần gũi nhất là *Methylomonas koyamae* với 97% độ tương đồng (Hình 3A). Do vậy, chủng BG3 được định danh là *Methylomonas* sp. BG3 và trình tự 16S rDNA của chủng này được đăng ký tại GenBank với mã số KJ081955.

Vị trí phân loại của chủng BG3 dựa trên kết quả so sánh trình tự 16S rDNA còn được khẳng định thông qua so sánh trình tự gen *pmoA* mã hóa cho enzyme methane monooxygenase dạng hạt (là phân tử chỉ thị của các loài MOB) (Hình 3B), theo đó chủng BG3 nằm ở vị trí sâu giữa các loài thuộc chi *Methylomonas*, loài gần gũi nhất là *Methylomonas koyamae* (tỷ lệ tương đồng 96%).



Hình 2. Phân lập vi khuẩn MOB chủng BG3 từ mẫu làm giàu. Hình thái tế bào của chủng BG3 dưới kính hiển vi phân pha độ phóng đại 1000 lần.



Hình 3. Vị trí phân loại của chủng BG3 dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA (A) và gen *pmoA* mã hóa cho enzyme methane-monooxygenase dạng hạt (B) của các chủng gần gũi có trong GenBank.

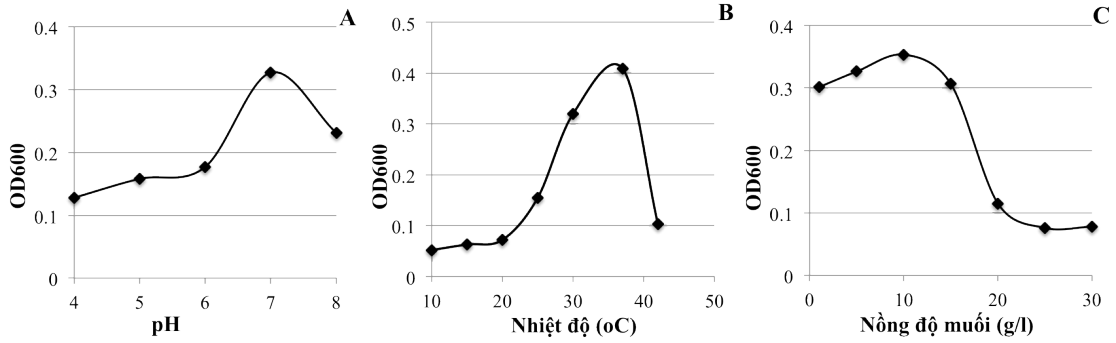
Nghiên cứu khả năng ứng dụng chủng BG3 để tạo SCP

Ảnh hưởng của các yếu tố lý hóa trong môi

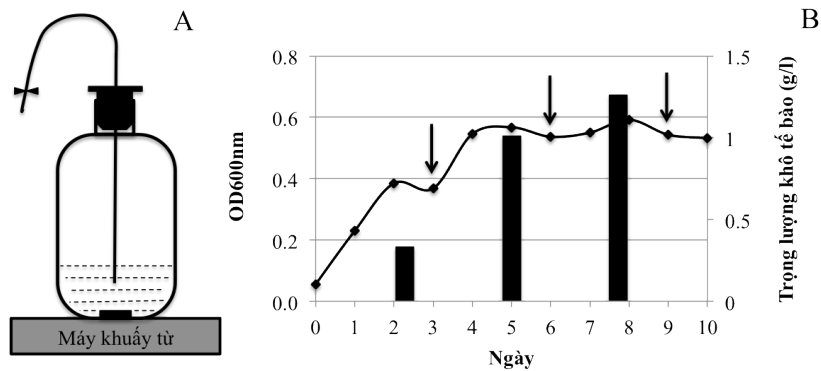
trường nuôi cấy như pH, nhiệt độ và độ mặn đối với sinh trưởng của chủng BG3 được nghiên cứu để xác định điều kiện sinh trưởng tối ưu cho chủng này (Hình 4). Có thể thấy rằng chủng BG3 sinh trưởng

tốt nhất ở pH 7, nhiệt độ 35°C, nồng độ NaCl 10 g/l với cơ chất là hỗn hợp methane/không khí = 1/2 (tính theo thể tích).

Để thu sinh khối cho nghiên cứu về khả năng ứng dụng trong sản xuất đạm vi sinh, chủng BG3 được nuôi cấy trong điều kiện như đã mô tả ở trên (Hình 5A).



Hình 4. Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường tới mức sinh trưởng của chủng BG3 trong môi trường khoáng dịch thể với methane là nguồn carbon và năng lượng duy nhất.



Hình 5. Nuôi tăng sinh chủng BG3 trong điều kiện phòng thí nghiệm. A- Bình nuôi chủng BG3 với methane; B- Sinh trưởng của chủng BG3 trên môi trường khoáng có methane là nguồn carbon và năng lượng duy nhất.

Trong quá trình nuôi, toàn bộ thể tích khí trong bình được làm mới theo chu kỳ 3 ngày một lần nhằm đảm bảo đủ methane và oxy cho sự phát triển của vi khuẩn (tại các thời điểm có mũi tên chỉ trên hình 5B). Bằng cách này, pha sinh trưởng của chủng BG3 đã được kéo dài, OD₆₀₀ của dịch nuôi tăng lên đáng kể (từ 0,385 lên 0,592) (Hình 5B). Rõ ràng rằng sinh trưởng của chủng BG3 phụ thuộc chặt chẽ vào hàm lượng cơ chất methane có trong bình nuôi, giá trị OD₆₀₀ cũng như trọng lượng khô tế bào đều tăng sau mỗi lần nạp hỗn hợp khí methane/không khí mới vào bình nuôi. Hàm lượng protein thô trong sinh khối của chủng BG3 và một số chủng thường được sử

dụng trong nghiên cứu sản xuất đạm vi sinh được trình bày trong bảng 1.

Hàm lượng protein thô trong sinh khối khô của chủng BG3 cao tương đương với nhiều chủng vi sinh vật khác cũng được sử dụng trong các nghiên cứu tạo protein vi sinh vật như *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* hay *Saccharomyces cerevisiae* (Singh *et al.*, 1991; Khan, Dahot, 2010; Mondal *et al.*, 2012). So với các chủng MOB khác như *Methylomonas sp.* và *Methylococcus capsulatus* đã được công bố trong các nghiên cứu tương tự, chủng BG3 có sinh khối với hàm lượng protein thô ở mức gần tương đương (Fritz, Hermann, 1977; Skrede *et al.*, 1998) (Bảng 1). Kết quả thu được bước đầu cho thấy chủng BG3 có

tiềm năng được sử dụng để tạo nguồn đạm bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Lượng methane sử dụng để tạo ra 1 kg sinh khối khô là ~2,8 m³, cao hơn so với nghiên cứu đã công bố trước đây đối với chủng *Methylomonas capsulatus*, sử dụng 2 m³ methane để tạo ra 1 kg sinh khối khô (Bothe *et al.*, 2002). Tuy nhiên cần lưu ý rằng trong nghiên cứu này có một lượng methane đáng kể bị thất thoát khi thể tích khí trong bình nuôi được thay bằng hỗn hợp khí có 30% methane theo chu kỳ 3 ngày một lần. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy đạm từ MOB, trong đó có các loài thuộc chi *Methylomonas*, hoàn toàn có thể thay thế một phần hay toàn bộ đạm khô cá hay đậu tương trong thành phần thức ăn trộn cho lợn, gà, cá, tôm (Overland *et al.*, 2010). *Methylomonas* sp. BG3 là chủng vi khuẩn oxy hóa methane đầu tiên được

phân lập ở Việt Nam, đồng thời có hàm lượng protein chiếm tỷ lệ rất cao trong sinh khối. Việc nghiên cứu ứng dụng chủng vi khuẩn này để chuyển methane trong biogas thành nguồn đạm cho chăn nuôi sẽ là hướng công nghệ mới nhằm tận thu nguồn năng lượng từ chất thải hữu cơ, đồng thời giảm phát thải methane vào khí quyển.

Đứng trên phương diện môi trường, nguồn đạm MOB được tạo ra từ methane là khí nhà kính quan trọng có tiềm năng làm ấm toàn cầu gấp 23 lần so với carbon dioxide (IPCC, 2007). Việc tận dụng khí methane từ thành phần khí sinh học tạo ra trong các quá trình xử lý các nguồn thải hữu cơ ở điều kiện kỵ khí để sản xuất đạm vi sinh nhờ MOB là khả thi và có ý nghĩa lớn, góp phần kiểm soát phát thải methane và làm giảm biến đổi khí hậu toàn cầu.

Bảng 1. Hàm lượng protein thô trong sinh khối một số chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu sản xuất SCP.

Chủng	Cơ chất	Protein thô (g/100 g CDW)	Tài liệu tham khảo
<i>Aspergillus niger</i>	Lõi ngô đã xử lý kiềm	30.4	Singh <i>et al.</i> , 1991
<i>Penicillium expansum</i>	Vỏ trấu thủy phân + 1% sucrose	30.1	Khan, Dahot, 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dịch chiết vỏ dừa chuột + 0.2% glucose	60.31	Mondal <i>et al.</i> , 2012
<i>Trichoderma harzianum</i>	Whey	34.21	Şişman <i>et al.</i> , 2013
<i>Methylomonas</i> sp. DM580	Metanol	76	Fritz, Hermann, 1977
<i>Methylococcus capsulatus</i> *	Khí tự nhiên	70	Skrede <i>et al.</i> , 1998
<i>Methylomonas</i> sp. BG3	Methane	68.69	Nghiên cứu này

* Sử dụng kết hợp với *Ralstonia* sp., *Brevibacillus agri* và *Aneurunibacillus* sp.

KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn BG3 được phân lập từ nước thải sau biogas của trang trại nuôi heo thịt thông qua quá trình làm giàu và phân lập trong môi trường có methane làm nguồn carbon và năng lượng duy nhất. Dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA và trình tự đoạn gen mã hóa cho tiểu đơn vị α của enzyme methane-monooxygenase, chủng BG3 được xếp vào chi *Methylomonas*, loài gần gũi nhất là *Methylomonas koyamae* (97% tương đồng về trình tự 16S rDNA), có tên khoa học là *Methylomonas* sp. BG3. Trình tự 16S rDNA của chủng BG3 được đăng ký tại GenBank với mã số KJ081955 và gen pmoA với mã số KJ081956. Khi sinh trưởng với methane và oxy, chủng này tạo sinh khối có hàm lượng protein thô cao (68,69%) với

hiệu suất chuyển hóa methane là 2.805 m³/kg sinh khối khô. Chủng này có tiềm năng được sử dụng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tạo protein vi sinh vật từ các nguồn methane khác nhau ở Việt Nam như khí sinh học, khí tự nhiên để tăng hiệu quả sử dụng các nguồn khí này, đồng thời giảm thiểu ảnh hưởng tới môi trường do chúng gây ra.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội đề tài cơ sở năm 2016.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TCVN 4328:2007 (2007) *Tiêu chuẩn Việt Nam: Thức ăn*

chăn nuôi - xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protein thô. Bộ KH&CN

Bothe H, Jensen KM, Mergel A, Larsen J, Jørgensen C, Bothe H, Jørgensen L (2002) Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59:33–39

Bowman J (2006) The methanotrophs - the families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*. *The Prokaryotes*. Edited by Dworkin M, Springer, New York.

Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl Acids Res* 17: 7843-7853.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Fritz W, Hermann S (1977) Process for producing single-cell protein from methanol using methylomonas sp. DSM 580. *Patents* US 4048013 A.

Fuse H, Ohta M, Takimura O, Murakami K, Inoue H, Yamaoka Y, Oclarit JM, Omori T (1998) Oxidation of trichloroethylene and dimethyl sulfide by a marine *Methylomicrobium* strain containing soluble methane monooxygenase. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:1925–1931.

Hanson RS, Hanson TE (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* 60: 439-471.

Hellwing ALF (2005) Bacterial protein meal as protein source for monogastric animals – comparative studies on protein and energy metabolism. *PhD dissertation*. The Royal Veterinary and Agricultural University Copenhagen, Denmark.

IPCC (2007). Climate change 2007: the physical science basis: contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change; technical summary.

Jiang H, Chenb Y, Jianga P, Zhanga C, Smithc TJ, Murrellb JC, Xinga X (2010). Review Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochem Engineer* 49: 277–288.

Khan MY, Dahot MU (2010) Effect of various agriculture wastes and pure sugars on the production of single cell protein by *Penicillium expansum*. *World Appl Sci* (Special issue of biotechnology & genetic engineering) 8: 80-84.

Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3: 208-218.

Mondal AK, Sengupta S, Bhowal J, Bhattacharya DK (2012) Utilization of fruit wastes in producing single cell protein. *Int J Sci, Environ Technol* 1:430 – 438.

Øverland M, Tauson AH, Shearer K, Skrede K (2010) Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals. *Arch Anim Nutr* 64: 171–189.

Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Singh A, Abidi AB, Agrawal AK, Darmwal NS (1991) Single cell protein production by *Aspergillus niger* and its evaluation. *Zentralbl Mikrobiol* 146:181-184.

Şişman T, Gür Ö, Doğan N, Özdal, Algur ÖF, Ergon T (2013) Single-cell protein as an alternative food for zebrafish, *Danio rerio*: a toxicological assessment. *Toxicol Ind Health* 29:792-799.

Skrede A, Berge GM, Storebakken T, Herstad O, Aarstad KG, Sundstøl F (1998) Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon. *Anim Feed Sci Technol* 76:103– 116.

Stein LY (2003). The Role of methane- and ammonia-oxidizing bacteria in the emission of greenhouse gases from agricultural soils. Soil Carbon and California's Terrestrial Ecosystems, 2001-2006 Mission (The Kearney Foundation of Soil Science).

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.

Widdel F, Bak F (1992) *Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria*. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH eds. *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg New York: 3352-3378.

ISOLATION OF A METHANE-OXYDIZING BACTERIUM FOR THE STUDY ON SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION FROM METHANE

Nguyen Thi Hieu Thu, Dinh Thuy Hang[✉]

Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University Hanoi

SUMMARY

Single cell protein (SCP) can be produced from biomass of different types of microorganisms that have high protein content such as yeast, filamentous fungi, algae and bacteria. In comparison to animal and plant protein sources, this kind of protein has several advantages, namely high protein and nutrient contents, being produced in fermenters with the use of variety of organic wastes, independence in agriculture land or climate conditions. Methane oxidizing bacteria (MOB) are considered as good candidates for SCP production and have been intensively studied recently. In the present study, a MOB strain BG3 was isolated from wastewater of an anaerobic digester via enrichment and isolation procedures using methane as the only carbon and energy sources. Strain BG3 comprised of oval-shaped cells of $0,8-1 \times 1,6-1,8 \mu\text{m}$ in size, almost nonmotile. Based on comparative analyses of the 16S rDNA partial sequences, strain BG3 was identified as a member of the *Methylomonas* genus, the most closely related species was *Methylomonas koyamae* (97% homology). This was also confirmed by analyses of sequence of the *pmoA* gene, encoding for α -subunit in the methane-monooxygenase in the strain. Besides methane, strain BG3 also utilized methanol for the growth. It has been shown that methane-fed culture of strain BG3 could produce 68.69 g crude protein per 100 g CDW and the according methane to biomass conversion efficiency was $2,8 \text{ m}^3 \text{ methane} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ dry biomass}$. Owing the capability of utilization of methane, the second important greenhouse gas, for the production of protein source for animal feed, strain BG3 would have a great application potential in Vietnam. Strain BG3 was designated as *Methylomonas* sp. BG3 and its 16S rDNA and *pmoA* gene sequences were deposited at the GenBank with accession numbers of KJ081955 and KJ081956, respectively.

Keywords: *Biogas, Methane oxidation, Methane-oxidizing bacteria (MOB), Single Cell Protein (SCP), Methylomonas sp.*

[✉] *Authors for correspondence:* E-mail: dthang@vnu.edu.vn