

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT PHÂN HUỖ CELLULOSE, CHỊU NHIỆT ỨNG DỤNG XỬ LÝ BÃ THẢI MÙN CƯA SAU TRỒNG NẤM LÀM THỨC ĂN NUÔI TRùn QUẾ (*Perionyx excavatus*)

ISOLATION AND SCREENING OF CELLULOLYTIC AND THERMOPHILIC MICROORGANISMS FERMENTED SPENT MUSHROOM SAWDUST WASTES INTO FOOD FOR EARTHWORM (*Perionyx excavatus*)

Lê Lý Thuý Trâm*, Đặng Gia Hân

Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng¹

*Tác giả liên hệ: llttram@dut.udn.vn

(Nhận bài: 16/12/2021; Chấp nhận đăng: 15/01/2022)

Tóm tắt - Nghiên cứu này nhằm phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân huỷ cellulose cao và chịu nhiệt từ đồng ủ bã thải mùn cưa sau khi trồng nấm được lên men bằng phương pháp Takakura. Kết quả đã tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh enzyme cellulase cao và chịu nhiệt lên đến 60°C. Dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý và trình tự vùng gen mã hoá rARN16S đã định danh 2 chủng này là *Mycolicibacterium smegmatis* (BU01) và *Bacillus smithii* (BU06). Thử nghiệm phối trộn dịch sinh khối 2 chủng này với bã thải mùn cưa sau trồng nấm đã thúc đẩy quá trình lên men xử lý bã thải mùn cưa, nhiệt độ khối ủ duy trì trên 50°C từ 12 giờ đến 28 giờ của quá trình ủ, và cao nhất là 59,5°C lúc 20 giờ. Các kết quả bước đầu đã chứng minh nguyên liệu sau lên men bằng chế phẩm vi sinh này có thể dùng làm thức ăn nuôi trùn quế thay thế cho phân bò trộn với hiệu quả tương tự như xử lý bằng phương pháp Takakura.

Từ khóa - Vi sinh vật phân huỷ cellulose và chịu nhiệt; *Mycolicibacterium smegmatis*; *Bacillus smithii*; Takakura; bã thải mùn cưa sau trồng nấm.

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển cơ sở hạ tầng đô thị tại thành phố Đà Nẵng, đất nông nghiệp cũng ngày càng thu hẹp, nhiều hộ nông dân đã chuyển sang nuôi trồng các loại nấm ăn (nấm sò, nấm rơm...) và nấm dược liệu (nấm linh chi) để cải thiện kinh tế. Những mô hình nuôi trồng nấm trong nhà hiện nay sử dụng mùn cưa làm nguyên liệu, đã thải ra một lượng lớn bã thải sau trồng nấm nhưng chưa có biện pháp xử lý triệt để. Nguồn bã thải này vẫn còn một lượng lớn các chất hữu cơ [1] do nấm trồng chưa sử dụng hết nên có thể tận dụng để tiếp tục được chuyển hoá tạo các dạng sinh khối mới. Tuy nhiên, hiện nay nguồn bã thải này chủ yếu được đem đốt hoặc xử lý như rác thải thông thường, gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng.

Bên cạnh đó, trong nông nghiệp, trùn quế (*Perionyx excavatus*) được xem là loại thức ăn giàu đạm cao cấp, bổ dưỡng cho gia súc, gia cầm. Phân trùn quế cũng được đánh giá là một chế phẩm phân hữu cơ sinh học rất tốt cho nhiều loại cây trồng, sử dụng thay thế phân vô cơ, như là giải pháp để sản xuất các loại rau sạch, an toàn. Tuy nhiên, việc nuôi trùn quế hiện nay chủ yếu bằng phân tươi của động vật, gây nhiều trở ngại trong quá trình nuôi trùn quế với những vấn đề về vệ sinh và ô nhiễm môi trường.

Abstract - This study aimed to isolate and screen the cellulolytic and thermophilic microorganisms from spent mushroom sawdust wastes fermented by Takakura method. The results found 2 bacteria strains with high cellulase activity and heat tolerance up to 60°C. Based on the morphological, physiological characteristics and the sequence analysis of rARN16S, these strains were identified as *Mycolicibacterium smegmatis* (BU01) và *Bacillus smithii* (BU06). Using the mixture of these strain broths with spent mushroom sawdust wastes facilitated the fermentation of sawdust wastes, the incubation temperature was maintained more than 50°C from 12 hours to 28 hours during fermentation and reached the maximum of 59.5°C at 20 hours. Preliminary results have shown that spent mushroom sawdust wastes fermented by these strains can be used as food for earthworm, the alternative of fresh cow manure, with the similar effect as treated by Takakura method.

Key words - Cellulolytic and thermophilic microorganisms, *Mycolicibacterium smegmatis*; *Bacillus smithii*; Takakura; spent mushroom sawdust wastes.

Đã có một số nghiên cứu trên thế giới chứng minh giải pháp nuôi trùn quế sử dụng thức ăn là bã thải mùn cưa sau khi trồng nấm là hoàn toàn khả thi [2]. Yêu cầu đặt ra là cần xử lý bã thải này để tiếp tục phân huỷ các chất hữu cơ còn lại thành dạng dễ sử dụng, đồng thời loại bỏ các mầm bệnh trong nguyên liệu này. Phương pháp Takakura được xem là một giải pháp hiệu quả để lên men các chất thải hữu cơ thành compost [3]. Phương pháp này sử dụng hệ vi sinh vật (VSV) tự nhiên có khả năng phân huỷ chất hữu cơ từ việc ủ các loại bã thải trái cây, kết hợp các VSV hữu ích trong sữa chua để giảm mùi hôi trong quá trình lên men các chất hữu cơ. Vấn đề đặt ra là các VSV thực hiện quá trình lên men bằng phương pháp Takakura là nguồn tự phát trong đồng ủ, thành phần và chất lượng VSV không ổn định nên hiệu quả quá trình xử lý bã thải mùn cưa sau trồng nấm là khó kiểm soát khi ứng dụng trên qui mô lớn.

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành phân lập và tuyển chọn các chủng VSV có khả năng sinh enzyme cellulase cao và chịu nhiệt từ đồng ủ bã thải mùn cưa sau trồng nấm theo phương pháp Takakura. Các chủng được tuyển chọn sẽ thử nghiệm lên men bã thải mùn cưa sau trồng nấm và tạo thành thức ăn nuôi trùn quế. Nghiên cứu này tạo tiền đề để phát triển chế phẩm vi sinh, nhằm chủ

¹ The University of Danang - University of Science and Technology (Le Ly Thuý Trâm, Dang Gia Han)

động kiểm soát quá trình xử lý loại bã thải này thành nguồn thức ăn có thể dùng để nuôi trùn quế, nâng cao hiệu quả kinh tế cho nghề trồng nấm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn nguyên liệu mùn cưa thải được sử dụng trong nghiên cứu này là mùn cưa cao su sau khi trồng nấm bào ngư (nấm sò), được cung cấp từ hợp tác xã nấm Nhơn Phước, huyện Hoà Vang, Đà Nẵng. Nguyên liệu mùn cưa thải sau khi được đưa về, mang đi bóp vụn cho đồng đều. Tiến hành phơi từ 1-2 nắng để loại bớt thành phần VSV tồn tại trong bã thải mùn cưa. Sau đó tiến hành lên men nguyên liệu theo phương pháp Takakura để tạo nguồn VSV cho việc phân lập và tuyển chọn.



Hình 1. Bã thải mùn cưa sau trồng nấm được phơi khô

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Lên men bã thải nấm theo phương pháp Takakura

Chuẩn bị men muối (bã trái cây: muối: nước theo tỉ lệ 1kg:2g:1lit) và men đường (sữa chua: rỉ đường: men bánh mì theo tỉ lệ 10:1:1), tiến hành ủ ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày. Sau đó, cho men đường: men muối: bã thải nấm theo tỉ lệ 1:4:5, trộn đều, có thể thêm nước để tạo khối ủ có độ mềm và xốp. Tiến hành ủ trong thùng xốp có đậy nắp với mỗi đồng ủ là 5 kg, lên men ở nhiệt độ phòng. Theo dõi nhiệt độ ở vị trí trung tâm của đồng ủ và ghi nhận kết quả.

2.2.2. Phân lập và tuyển chọn VSV có khả năng phân huỷ cellulose cao và chịu nhiệt

Sử dụng phương pháp pha loãng thập phân để tách rời các VSV trong mẫu bã thải mùn cưa đã lên men bằng phương pháp Takakura. Sử dụng môi trường chọn lọc chỉ chứa một nguồn cacbon duy nhất là Carboxymethyl cellulose (CMC) để phân lập các chủng VSV sinh enzyme cellulase là môi trường CMC với thành phần gồm: CMC (10 g/L), NaNO_3 (1 g/L), MgSO_4 (1 g/L), K_2HPO_4 (0,3 g/L), NaCl (0,5 g/L). Mẫu pha loãng được trải đều trên bề mặt môi trường chứa trong các đĩa petri, sau đó nuôi ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48 giờ. Tuyển chọn các khuẩn lạc mọc riêng lẻ trên các đĩa cấy và tiến hành làm thuần bằng cách cấy chuyển qua đĩa petri cho đến khi thu được khuẩn lạc đồng nhất về hình thái gọi là chủng thuần khiết.

Đánh giá khả năng sinh enzyme cellulase của VSV bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Lên men các chủng VSV đã làm thuần trong môi trường CMC lỏng, nuôi ở 37°C trong vòng 24 giờ. Hút 50 μL canh trường cho vào các lỗ đã khoan sẵn trên môi trường thạch CMC. Nuôi 24 giờ ở 37°C, sau đó nhuộm màu với dung dịch Lugol 5%.

Hoạt tính enzyme cellulase do VSV tiết ra môi trường được đánh giá bằng đường kính vòng phân giải CMC xung quanh lỗ thạch, tức là $D - d$, với D : đường kính vòng phân giải và d là đường kính lỗ thạch. Chọn các chủng có hiệu số $D - d \geq 10\text{mm}$.

Nuôi cấy các chủng cho khả năng sinh cellulase cao đã được chọn vào môi trường CMC, nuôi ở các mức nhiệt độ khác nhau 50°C, 55°C và 60°C để thăm dò khả năng ưa nhiệt của các chủng VSV sinh cellulase đã có.

Tiến hành giữ giống trên ống nghiệm thạch nghiêng chứa môi trường CMC và bảo quản 4°C để sử dụng trong quá trình nghiên cứu.

2.2.3. Định danh chủng VSV được tuyển chọn

Quan sát và mô tả đặc điểm hình thái của khuẩn lạc bằng mắt thường; nhuộm Gram và quan sát hình thái của tế bào VSV dưới kính hiển vi ở vật kính $\times 100$ [4]. Xác định khả năng di động của VSV bằng phương pháp ống nghiệm thạch mềm [4]. Xác định mức độ ưa thích oxy của VSV bằng phương pháp đồ đĩa [4]. Kết hợp phương pháp định danh phân tử bằng RNA16S để định danh VSV được tuyển chọn.

2.2.4. Khảo sát động học tăng trưởng của VSV

Từ dịch canh trường ban đầu có độ đục $\text{OD}_{600} \sim 0,5$; hút 5 mL sinh khối VSV cho vào các bình tam giác giống nhau chứa 100 mL môi trường CMC lỏng ở 37°C. Theo dõi quá trình sinh trưởng của từng chủng VSV trong 72 giờ, ở mỗi thời điểm khảo sát, lấy từng bình môi trường nuôi cấy ra khỏi tủ ấm, xác định mật độ tế bào trong canh trường gián tiếp thông qua đo độ đục OD_{600} . Xây dựng đường cong tăng trưởng của từng chủng VSV trên môi trường CMC.

2.2.5. Đánh giá khả năng lên men bã thải mùn cưa sau trồng nấm với dịch canh trường của 2 chủng VSV được tuyển chọn

Dịch canh trường VSV chủng BU01 và BU06 có mật độ 10^8 CFU/mL được phối trộn với bã thải mùn cưa theo tỉ lệ 5%, trộn đều và có thể bổ sung thêm nước cho khối ủ xốp và mềm. Mẫu đối chứng chỉ có bã thải mùn cưa, không bổ sung thêm VSV. Theo dõi nhiệt độ ở vị trí trung tâm của khối ủ để đánh giá quá trình lên men.

2.2.6. Đánh giá khả năng sử dụng bã thải đã xử lý để nuôi trùn quế

Sử dụng 2 mẫu bã thải mùn cưa: 01 mẫu lên men bằng chế phẩm vi sinh (Phần 2.2.5) và 01 mẫu được ủ theo phương pháp Takakura truyền thống (Phần 2.2.1)

Hai loại nguyên liệu này, được trộn với phân bò theo tỉ lệ 1:1 dùng làm thức ăn để nuôi trùn quế.

Chuẩn bị các thùng xốp nhỏ có kích thước 31cm x 21,5cm x 24,5cm, có nắp. Cho vào mỗi thùng 500g thức ăn bổ sung nước đến độ ẩm 70 – 80%. Các nghiệm thức được lặp lại 6 lần. Trong mỗi thùng cho lượng trùn quế trung bình là 15g. Sau 2 tuần, lấy ra rửa sạch với nước cất, thấm khô bằng vải rồi cân và ghi lại trọng lượng của trùn quế.

2.2.7. Xử lý số liệu

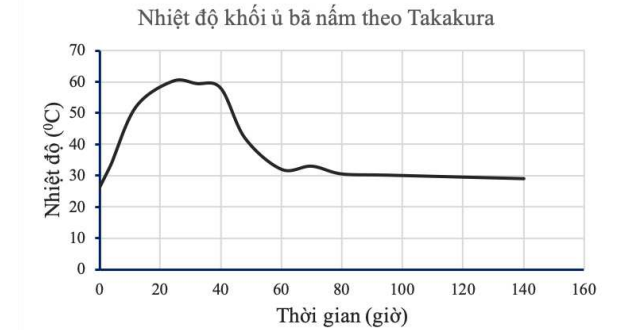
Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại ít nhất 3 lần. Các số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Lên men bã thải nấm bằng phương pháp Takakura

Phương pháp ủ men Takakura đã được ghi nhận rất hiệu quả trong việc xử lý chất thải hữu cơ [3]. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp là sự không ổn định của hệ VSV trong quá trình tạo men đường và men muối (phụ thuộc vào nguyên liệu bã trái cây) dẫn đến khó kiểm soát chất lượng của các mẻ lên men ủ bã thải nấm. Chính vì thế, nhóm tác giả mong muốn phân lập các VSV tự nhiên này, chọn lựa những chủng có hoạt tính cao để tạo chế phẩm vi sinh dùng chủ động trong quá trình xử lý bã thải nấm.

Một tiêu chí có thể giúp đánh giá quá trình ủ theo phương pháp Takakura có thành công hay không đó là có sự gia tăng nhiệt độ của đồng ủ trong thời gian lên men. Kết quả Hình 2 cho thấy, nhiệt độ đồng ủ bắt đầu tăng sau 12 giờ và đạt tối đa 60°C sau 24 giờ ủ, duy trì ở khoảng 58-60°C đến 40 giờ; Sau đó, thì nhiệt độ giảm dần. Điều này có thể được giải thích là do trong giai đoạn đầu các VSV có trong men đường và men muối bắt đầu thích nghi với nguyên liệu là bã thải nấm (chủ yếu là cellulose) và bắt đầu tiết ra enzyme cellulase để phân huỷ cellulose để tăng sinh khối. Hoạt động này có sinh ra nhiệt và làm đồng ủ nóng dần lên. Tuy nhiên, nhiệt độ đồng ủ chỉ lên đến tối đa là 60°C, chứng tỏ hệ VSV tự nhiên trong quá trình lên men không thể chịu được nhiệt độ cao hơn, ngừng phát triển do đó đã làm nhiệt độ đồng ủ giảm dần. Tuy nhiên, kết quả này cho thấy quá trình lên men đã xảy ra, có sự hoạt động của VSV phân huỷ cơ chất cellulose để tăng trưởng, do đó có thể sử dụng nguồn bã thải mùn cưa sau quá trình ủ này để làm nguồn phân lập VSV phân huỷ cellulose và có thể ưa nhiệt đến 60°C.



Hình 2. Sự thay đổi nhiệt độ của đồng ủ bã thải mùn cưa khi lên men bằng phương pháp Takakura

3.2. Phân lập và tuyển chọn giống VSV phân huỷ cellulose cao và chịu nhiệt

Trên môi trường CMC với nguồn C duy nhất là cellulose, những VSV có thể phát triển trên môi trường này thuộc vào 2 nhóm: VSV tự dưỡng (không cần sử dụng C hữu cơ trong môi trường cho sự phát triển của nó) và VSV dị dưỡng (bắt buộc phải phân huỷ cellulose trong môi trường CMC để phát triển). Với mục tiêu muốn phân lập các VSV có khả năng phân huỷ cellulose, nên nhóm tác giả chỉ lựa chọn những khuẩn lạc nào có tạo vòng phân giải CMC xung quanh khuẩn lạc. Kết quả có 3 chủng được lựa chọn như mô tả Bảng 1. Trong 3 chủng này, có thể nhận thấy chủng BU01 có đường kính vòng phân giải lớn nhất (23 mm) có thể có hoạt tính cellulase mạnh nhất. Chủng

BU06 có đường kính phân giải nhỏ hơn chủng BU01 (17 mm) và BU09 có đường kính vòng phân giải nhỏ nhất trong 3 chủng (10 mm).

Bảng 1. Khả năng chịu nhiệt và khả năng phân giải cellulose của các chủng VSV được phân lập

Chủng vi sinh vật	Đường kính vòng phân giải D-d (mm)	Hình ảnh khuẩn lạc	Khả năng chịu nhiệt
BU01	23 ± 1,6		60°C
BU06	17 ± 2,2		60°C
BU09	10 ± 2,1		Dưới 50°C

Nhiệt độ là một trong những yếu tố đánh giá hiệu quả của quá trình ủ bã thải vì nếu nhiệt độ đồng ủ càng cao chứng tỏ sự hoạt động tốt của các VSV, quá trình phân huỷ diễn ra mạnh, phân huỷ hiệu quả cellulose trong nguyên liệu thành dạng đơn giản hơn dùng làm thức ăn cho trùn quế đồng thời góp phần loại bỏ các VSV không cần thiết, có hại trong đồng ủ. Vì vậy, để sản xuất ra một chế phẩm vi sinh phân huỷ bã thải mùn cưa tốt, cần chọn lựa những chủng VSV ưa nhiệt có thể hoạt động tốt trong điều kiện nhiệt độ cao.

Vì mẫu ủ bã thải mùn cưa thử nghiệm với men ủ Takakura đạt được nhiệt độ cao nhất là 60°C nên nhóm tác giả kỳ vọng sẽ chọn ra được các chủng VSV có sinh enzyme cellulase cao và có khả năng ưa nhiệt đến cao nhất là 60°C.

Ba chủng VSV có sinh enzyme cellulase đã chọn ở trên được nuôi cấy các mức nhiệt độ 50°C, 55°C và 60°C trên môi trường chỉ có một nguồn cacbon duy nhất là CMC, để thăm dò khả năng ưa nhiệt của các chủng này. Kết quả Bảng 1 cho thấy, trong 3 chủng BU01, BU06, BU09 chỉ có 2 chủng BU01 và BU06 có thể tạo thành khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ lên đến 60°C. Trong khi đó, chủng BU09 không thể phát triển được. Với tiêu chí đã đặt ra, nhóm tác giả chỉ lựa chọn 2 chủng BU01 và BU06 để tiếp tục nghiên cứu.

3.3. Định danh VSV

3.3.1. Định danh BU01

Thực hiện giải trình tự đoạn gen mã hoá cho rARN 16S, sau đó phân tích và so sánh với các trình tự tương đồng trên GenBank, dựa trên độ tương đồng cao với chủng tham chiếu cho phép định danh VSV đến mức độ loài.

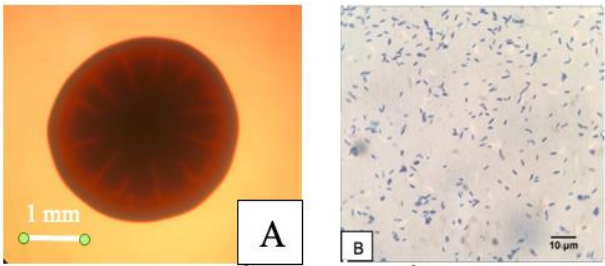
Kết quả Bảng 2 cho thấy, trình tự đoạn gen 16S rARN (1264 bps) của chủng BU01 có độ tương đồng > 99,6% với loài *Mycolicibacterium smegmatis*.

Phương pháp sinh học phân tử là một cơ sở cho việc định danh sinh vật. Bên cạnh đó, cần tiến hành các khảo sát về đặc điểm hình thái và sinh lý học của chủng phân lập để có khẳng định chắc chắn hơn. Khi quan sát bằng mắt thường, nhận thấy khuẩn lạc của BU01 có màu trắng đục, có các đường vân mọc toả ra từ trung tâm (Hình 3A);

Khuẩn lạc tròn bóng (dạng S). Khi quan sát tế bào dưới kính hiển vi, nhận thấy tế bào có dạng hình que, kích thước nhỏ, chỉ có thể nhìn rõ từ vật kính x100 (phóng đại 1000 lần) (Hình 3B). Từ những đặc điểm này có thể nhận thấy, BU01 là vi khuẩn. Tiến hành nhuộm Gram xác định là Gram dương; không di động. Trong quá trình phân lập, nhận thấy chủng BU01 luôn tạo khuẩn lạc trên bề mặt môi trường thạch, tiến hành nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí thì BU01 chỉ có thể tăng trưởng trong điều kiện hiếu khí. BU01 có khả năng phân huỷ cellulose.

Các kết quả xác định hình thái và sinh lý này tương thích với các đặc điểm của *Mycolicibacterium smegmatis* như trong nghiên cứu của Yang và cộng sự [5]. Chủng *M.smegmatis* là một loài vi khuẩn thuộc cùng họ với vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*. Tuy nhiên, *M.smegmatis* không

có tính chất gây bệnh, được sử dụng nhiều làm mô hình nghiên cứu về sự tạo thành biofilm [6]. Cho đến nay, nhóm tác giả vẫn chưa tìm thấy nghiên cứu nào ghi nhận về khả năng phân huỷ cellulose từ chủng vi khuẩn này. Đây là một phát hiện mới từ nghiên cứu của nhóm tác giả.



Hình 3. Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào của chủng BU01 (B)

Bảng 2. Kết quả so sánh độ tương đồng của đoạn gen mã hoá 16S rARN (1264 bps) của chủng BU01 với các đoạn gen tham chiếu từ cơ sở dữ liệu Genbank

Số TT	Tên khoa học	Số vị trí nucleotide khác biệt	Số lượng khoảng trống trong kết quả giống cột	Tỉ lệ % của chiều dài đoạn gen BU01 được sử dụng để so sánh với gen tham chiếu	Tỉ lệ tương đồng giữa BU01 và gen tham chiếu (%)	Chiều dài đầy đủ của đoạn gen tham chiếu	Mã số đoạn gen tham chiếu trên GenBank
1	<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>	0	0	100	100	1368	NR_118612.1
2	<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>	0	0	100	100	1368	NR_115233.1
3	<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>	3	0	100	99,76	1461	NR_114895.1
4	<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>	5	0	100	99,6	1487	NR_025311.1
5	<i>Mycolicibacterium barrassiae</i>	10	0	100	99,21	1489	NR_115330.1
6	<i>Mycolicibacterium goodii</i>	4	0	98	99,68	1404	NR_029341.1
7	<i>Mycolicibacterium anyangense</i>	9	2	100	99,13	1420	NR_136492.1
8	<i>Mycolicibacterium moriokaense</i>	14	0	100	98,89	1493	NR_025526.1
9	<i>Mycolicibacterium moriokaense</i>	14	0	100	98,89	1489	NR_115331.1
10	<i>Mycolicibacterium madagascariense</i>	13	2	100	98,81	1470	NR_104690.1

Bảng 3. Kết quả so sánh độ tương đồng của đoạn gen mã hoá 16S rARN (1272 bps) của chủng BU06 với các đoạn gen tham chiếu từ cơ sở dữ liệu Genbank

Số TT	Tên khoa học	Số vị trí nucleotide khác biệt	Số lượng khoảng trống trong kết quả giống cột	Tỉ lệ % của chiều dài đoạn gen BU06 được sử dụng để so sánh với gen tham chiếu	Tỉ lệ tương đồng giữa BU06 và gen tham chiếu (%)	Chiều dài đầy đủ của đoạn gen tham chiếu	Mã số đoạn gen tham chiếu trên GenBank
1	<i>Bacillus smithii</i>	6	1	100	99,45	1480	NR_112634.1
2	<i>Bacillus smithii</i>	8	2	100	99,21	1524	NR_036987.1
3	<i>Bacillus smithii</i>	33	7	100	96,78	1429	NR_118971.1
4	<i>Bacillus smithii</i>	42	4	99	96,38	1437	NR_115583.1
5	<i>Bacillus manuisensis</i>	41	1	100	96,7	1426	NR_159907.1
6	<i>Bacillus kexueae</i>	48	1	100	96,15	1406	NR_159906.1
7	<i>Bacillus aeolius</i>	45	2	100	96,15	1403	NR_025557.1
8	<i>Bacillus camelliae</i>	53	1	100	95,75	1549	NR_159341.1
9	<i>Bacillus shackletonii</i>	52	3	100	95,68	1503	NR_025373.1
10	<i>Bacillus xiapuensis</i>	53	3	100	95,52	1396	NR_171460.1

3.3.2. Định danh BU06

Kết quả Bảng 3 cho thấy, trình tự đoạn gen 16S rARN (1272 bps) của chủng BU06 có độ tương đồng > 96,38 % với loài *Bacillus smithii*.

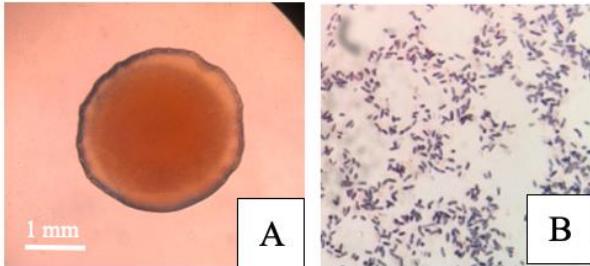
Đồng thời với định danh bằng phương pháp sinh học phân tử, nhóm tác giả đã tiến hành quan sát hình thái của VSV. Khi quan sát bằng mắt thường, nhận thấy, khuẩn lạc

của BU06 có màu nâu nhạt, nhẵn có màu đậm hơn vùng ngoài; tròn và lồi không bóng, dạng R (Hình 4A). Khi quan sát tế bào dưới kính hiển vi, nhận thấy tế bào có dạng hình que, kích thước nhỏ, chỉ có thể nhìn rõ từ vật kính x100 (phóng đại 1000 lần) (Hình 4B). Từ những đặc điểm này có thể nhận thấy, BU06 là vi khuẩn. Tiến hành nhuộm Gram xác định là Gram dương, không di động. Trong quá trình

phân lập, nhận thấy khuẩn lạc BU06 mọc ở lớp giữa môi trường thạch agar. Tiến hành nuôi chủng BU06 trong điều kiện kỵ khí và hiếu khí, nhận thấy chúng đều có khả năng tăng trưởng trong cả 2 trường hợp, tuy nhiên trong điều kiện kỵ khí chúng phát triển tốt hơn. Do đó, có thể ghi nhận chủng BU06 là kỵ khí tùy nghi, có thể phân hủy cellulose.

Các kết quả xác định hình thái và sinh lý này tương thích với các đặc điểm của *Bacillus smithii* như trong nghiên cứu của Bosma và cộng sự [7].

Các nghiên cứu trước đây đã ghi nhận *Bacillus smithii* là một vi khuẩn kỵ khí tùy nghi, ưa nhiệt, thường được tìm thấy trong các đồng ủ nguyên liệu giàu lignocellulose [8]. Điều này cũng tương thích với những đặc điểm của chủng BU06 mà nhóm tác giả đã phân lập được.

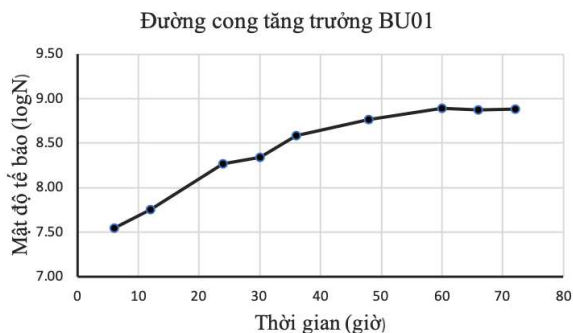


Hình 4. Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào của chủng BU01 (B)

3.4. Khảo sát động học tăng trưởng của 2 chủng VSV được chọn trên môi trường CMC

Việc khảo sát đường cong tăng trưởng của từng chủng VSV trong mỗi điều kiện nuôi cấy cụ thể cho phép theo dõi sự phát triển của quần thể VSV ở các thời điểm khác nhau trong quá trình nuôi cấy. Dựa trên cơ sở này giúp nhóm tác giả xác định thời điểm có thể thu được sinh khối VSV đang trong giai đoạn sinh trưởng tốt nhất là cuối pha logarit để bổ sung vào bã thải nấm, nhằm đạt hiệu quả lên men tốt nhất.

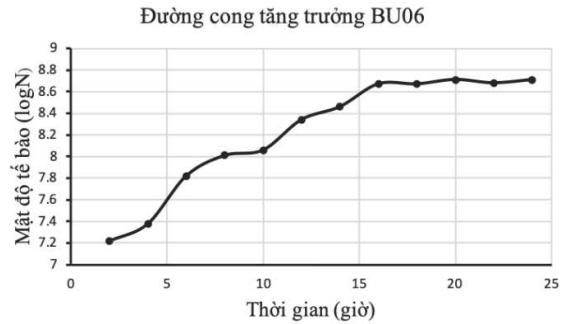
Kết quả cho thấy, chủng BU01 có thời gian tăng trưởng dài hơn, pha logarit kéo dài đến 60h và đạt mật độ tế bào cực đại ở 60 giờ ($7,82 \pm 0,53 \times 10^8$ CFU/ml); Sau đó, quần thể VSV đi vào pha ổn định với mật độ tế bào không thay đổi nhiều so với thời điểm 60 giờ (Hình 5). Do đó, có thể thu sinh khối tế bào BU01 sau 60 giờ nuôi cấy trên môi trường CMC.



Hình 5. Đường cong tăng trưởng của chủng BU01

Trong khi đó, chủng BU06 có thời gian tăng trưởng ngắn hơn so với chủng BU01 (Hình 6). Quần thể VSV bắt đầu vào pha logarit từ thời điểm 4h và đạt mật độ tối đa vào thời điểm 16 giờ ($4,67 \pm 0,74 \times 10^8$ CFU/ml). Sau 16 giờ,

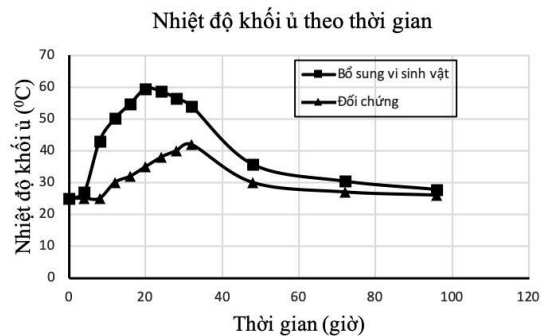
mật độ tế bào sống trong quần thể duy trì ổn định như lúc 16 giờ (pha ổn định). Do đó, có thể thu sinh khối tế bào BU01 sau 16 giờ nuôi cấy trên môi trường CMC.



Hình 6. Đường cong tăng trưởng của chủng BU06

3.5. Đánh giá khả năng lên men bã thải mùn cưa sau trồng nấm với dịch canh trường của 2 chủng VSV được tuyển chọn

Dịch canh trường của 2 chủng vi khuẩn BU01 và BU06 có mật độ tế bào là 10^8 CFU/ml được thêm vào bã thải mùn cưa sau trồng nấm theo tỉ lệ 5%, trộn đều, có thể thêm nước để khối ủ không quá khô. Nhóm tác giả ghi nhận sự thay đổi nhiệt độ trong khối ủ theo thời gian như Hình 7.



Hình 7. Sự thay đổi nhiệt độ khối ủ bã thải nấm khi thêm chế phẩm vi sinh

Có thể nhận thấy, việc bổ sung dịch canh trường chủng BU01 và BU06 đã thúc đẩy quá trình lên men bã thải nấm so với mẫu đối chứng (không bổ sung VSV) thông qua hiện tượng gia tăng nhiệt độ của khối ủ. Mặc dù, ở mẫu đối chứng vẫn có sự gia tăng dần nhiệt độ của đồng ủ, cho thấy vẫn có hoạt động của VSV có sẵn trong bã thải nấm, nhưng quá trình lên men này diễn ra chậm hơn so với mẫu có bổ sung thêm chế phẩm vi sinh. Ngoài ra, nhiệt độ cao nhất của khối ủ chỉ đạt 42°C ở thời điểm 32 giờ, sau đó thì nhiệt độ giảm dần theo thời gian. Trong khi đó, ở mẫu có bổ sung dịch canh trường chủng BU01 và BU06, nhiệt độ khối ủ bắt đầu tăng sau 8 giờ, duy trì ở khoảng 50-59,5°C từ 12 - 32 giờ, và đạt tối đa 59,5°C sau 20 giờ ủ (Hình 7).

Trong quá trình lên men xử lý các chất thải hữu cơ, hoạt động của VSV giúp phân hủy các chất hữu cơ phức tạp thành những chất đơn giản hơn, quá trình này sẽ sinh ra năng lượng làm khối ủ sẽ nóng dần lên. Nhiệt độ khối ủ càng cao chứng tỏ VSV hoạt động càng mạnh, quá trình trao đổi chất mạnh mẽ, do đó bã thải nấm sẽ càng hoại mục hơn. Ngoài ra, nhiệt độ cao trên 50°C sẽ giúp tiêu diệt các mầm bệnh còn sót lại trong bã thải sau quá trình nuôi trồng

nấm, giúp làm sạch nguyên liệu trước khi tái sử dụng nuôi trùn quế. Do đó, kết quả thu được khi bổ sung dịch canh trường của 2 chủng BU01 và BU06 cho thấy, có thể sử dụng chế phẩm vi sinh này để thúc đẩy quá trình lên men xử lý nguyên liệu bã thải mùn cưa sau trồng nấm.

3.6. Thử nghiệm sử dụng bã thải mùn cưa đã xử lý làm thức ăn nuôi trùn quế

Sử dụng bã thải mùn cưa đã được xử lý lên men với dịch canh trường 2 chủng BU01 và BU06, đem phối trộn với phân bò theo tỉ lệ 1:1 dùng làm thức ăn nuôi trùn quế theo thí nghiệm đã được mô tả. Mẫu đối chứng sử dụng bã thải mùn cưa được lên men bằng phương pháp Takakura truyền thống. Sau 2 tuần nuôi trùn quế, nhóm tác giả nhận thấy, có sự tương đương ở cả hai mẫu thức ăn. Trùn quế vẫn ăn tốt thức ăn được xử lý với chế phẩm vi sinh và sinh khối trùn quế đo được sau 2 tuần nuôi tăng khoảng 30% so với sinh khối ban đầu (Bảng 4). Điều này cho thấy có thể sử dụng chế phẩm vi sinh từ 2 chủng BU01 và BU06 với tác dụng tương tự như khi ủ bằng phương pháp Takakura truyền thống. Kết quả nghiên cứu cũng mở ra khả năng sử dụng bã mùn cưa sau trồng nấm làm thức ăn nuôi trùn quế, thay thế dần phân bò tươi, góp phần hạn chế ô nhiễm môi trường.

Bảng 4. Sinh khối trùn quế khi nuôi với các nguồn thức ăn khác nhau

Nghiệm thức	Khối lượng trùn ban đầu (g)	Khối lượng trùn sau 2 tuần (g)
Bã mùn cưa ủ bằng Takakura: phân bò (1:1)	15 ± 0,1	19,8 ± 0,2
Bã mùn cưa ủ bằng chế phẩm vi sinh: phân bò (1:1)	15 ± 0,1	20,1 ± 0,3

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme cellulase cao và chịu nhiệt đến 60°C là *Mycolicibacterium smegmatis* (BU01) và *Bacillus smithii* (BU06). Kết quả nghiên cứu đã chứng minh, 2 chủng vi khuẩn này có khả năng thúc đẩy quá trình lên men xử lý bã thải mùn cưa sau trồng nấm tương tự như khi sử dụng phương pháp Takakura. Đồng

thời, có thể sử dụng nguyên liệu này làm thức ăn nuôi trùn quế thay thế cho phân bò tươi. Kết quả ban đầu này là cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo, tối ưu hoá các thông số kỹ thuật cho quá trình sản xuất chế phẩm vi sinh từ 2 chủng BU01 và BU06, sử dụng thay thế cho phương pháp Takakura truyền thống, nhằm kiểm soát tốt hơn quá trình lên men xử lý bã thải mùn cưa sau trồng nấm làm thức ăn nuôi trùn quế.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng với đề tài có mã số T2020-02-43.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Wu C.Y., Liang C.H., Liang Z.C., “Evaluation of Using Spent Mushroom Sawdust Wastes for Cultivation of *Auricularia polytricha*”, *Agronomy*, 10(12), 2020, 1892 – 1902.

[2] Tajbakhsh J., Abdoli M. A., Goltapeh E. M., Alahdadi I., Malakouti M. J., “Recycling of spent mushroom compost using earthworms *Eisenia foetida* and *Eisenia Andrei*”, *The Environmentalist*, 28(4), 2008, 476-482.

[3] Jiménez-Antillón, Joaquín, Carlos Calleja-Amador, and Luis G. Romero-Esquivel, “Food Waste Recovery with Takakura Portable Compost Boxes in Offices and Working Places”, *Resources*, 7(4), 2018, 84 -90.

[4] Nguyễn Lâm Dũng (chủ biên), Phạm Thị Trân Châu, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật tập 1,2,3*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 1978.

[5] Yamada, H., Yamaguchi, M., Igarashi, Y., Chikamatsu, K., Aono, A., Murase, Y., Morishige, Y., Takaki, A., Chibana, H., Mitarai, S., “*Mycolicibacterium smegmatis*, basonym *Mycobacterium smegmatis*, expresses morphological phenotypes much more similar to *Escherichia coli* than *Mycobacterium tuberculosis* in quantitative structure analysis and CryoTEM examination”, *Front. Microbiol.*, 9, 2018, 1992.

[6] Ojha, A.K., Jacobs, W.R., Jr., and Hatfull, G.F., “Genetic dissection of mycobacterial biofilms”, *Methods Mol Biol*, 1285, 2015, 215-226.

[7] Bosma EF, van de Weijer AHP, Daas MJA, van der Oost J, de Vos WM, van Kranenburg R., “Isolation and screening of thermophilic bacilli from compost for electrotransformation and fermentation: Characterization of *Bacillus smithii* ET 138 as a new biocatalyst”. *Applied Environ Microbiol*, 2015, 81, 1874–83.

[8] Bosma, E.F., Koehorst, J.J., van Hijum, S.A.F.T. et al., “Complete genome sequence of thermophilic *Bacillus smithii* types strain DSM 4216T”, *Stand in Genomic Sci.*, 2016, 11, 52.