

Phân lập và định danh sơ bộ các chủng vi sinh trong chế phẩm vi sinh sử dụng vệ sinh nhà nuôi yến

Isolation and preliminary identification of some microorganism strains in microbial products used to clean bird's nest houses

Huỳnh Thị Thúy Nga, Nguyễn Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Hồ Hữu Phước, Khấu Hoàng Kim Giao

Trường Đại học Bình Dương

Tác giả liên hệ: Khấu Hoàng Kim Giao. Email: khkgiao@gmail.com

Tóm tắt: Hiện nay việc sử dụng các chế phẩm vi sinh vật trong ngành công nghiệp chăn nuôi đã rất phổ biến, nhằm nhiều mục đích như tăng khả năng hấp thu và phòng bệnh trên vật nuôi hoặc giúp vệ sinh môi trường nuôi nhốt. Nghiên cứu này đã tiến hành phân lập, định danh và khảo sát một vài đặc tính sinh học của các chủng vi sinh vật dùng cho nhà nuôi chim yến. Kết quả tuyển chọn và phân lập được 7 chủng vi sinh có khả năng phân giải chất hữu cơ, gồm 5 chủng xạ khuẩn và 2 chủng vi khuẩn. Trong đó nhận thấy 2 chủng có khả năng di động, 7 chủng có khả năng sinh catalase, 3 chủng có khả năng phân hủy cellulose và 5 chủng có khả năng phân hủy protein. Sử dụng phương pháp Sanger đã định danh được các chủng là *Nocardioideus luteus*, *Streptomyces calvus*, *Mycolicibacterium mageritense*, *Streptomyces rochei*, *Microtholunatus soli*, *Bacillus thuringiensis* và *Bacillus subtilis*. Từ đó có thể ứng dụng để kết hợp tạo ra nhiều chế phẩm khác dùng cho nhà nuôi yến.

Từ khóa: chế phẩm vi sinh; định danh; nhà nuôi yến; phân giải chất hữu cơ; phân hủy cellulose; phân hủy protein; phân lập

Abstract: Today, the use of microbial products in the livestock industry is very popular, for many purposes such as increasing absorption capacity and preventing diseases in livestock or helping to clean the captive environment. This study isolated, identified and surveyed some biological characteristics of microbial strains used for bird's nest houses. The results of selecting and isolating 7 strains capable of degrading organic matter, including 5 strains of actinomycetes and 2 strains of bacteria. Among them, 2 strains were found to be mobile, 7 strains produce catalase, 3 strains decompose cellulose and 5 strains decompose protein. Using the Sanger method, the strains were identified as *Nocardioideus luteus*, *Streptomyces calvus*, *Mycolicibacterium mageritense*, *Streptomyces rochei*, *Microtholunatus soli*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis*. From there, it can be used to combine and create many other products for bird's nest house.

Keywords: bird's nest houses; decomposition; isolation; identification; microbial products; organic cellulose decomposition; protein decomposition

1. Đặt vấn đề

Tổ yến là món ăn bổ dưỡng được nhiều nước Đông Nam Á sử dụng từ thế kỷ 14 - 15 do hàm lượng dinh dưỡng cao [1,2]. Ở Việt Nam, chim yến cho tổ ăn được là loài *Aerodramus fuciphagus*, có 2 phân

loài là *A. f. germani* (sống ở các hang đảo tự nhiên) và *A. f. amechanus* (sống ở trong nhà nuôi nhân tạo). Nhu cầu sử dụng tổ yến ngày càng cao làm cho nguồn khai thác từ tự nhiên không đủ đáp ứng, từ đó nhiều nhà nuôi chim yến

được đầu tư xây dựng ở các nước như Malaysia, Indonesia, Thái Lan, Campuchia, Việt Nam,... Số lượng và mô hình nhà nuôi chim yến vẫn đang không ngừng phát triển. Theo thống kê của Cục Chăn nuôi (Bộ NN&PTNT), đến năm 2022, cả nước có 23.665 nhà yến. Các địa phương có số lượng nhà yến tăng nhanh nhất là Kiên Giang, Khánh Hòa và Lâm Đồng. Tỉnh có số lượng nhà yến lớn nhất là Kiên Giang với 2.995 nhà yến, tiếp đến là Bình Định (1.722), Đồng bằng sông Cửu Long (10.572), Nam Trung Bộ (5.965), Đông Nam Bộ (4.958), Tây Nguyên (1.969) [3].

Trong các nhà nuôi chim yến, lượng lớn chất thải của chim tồn đọng ở sàn nhà. Ngoài tiếng kêu thì người nuôi chim thường dùng phân chim yến để tạo mùi bầy đàn dẫn dụ chim về làm tổ. Tuy nhiên, nhiều người không biết trong phân chim yến tồn tại nhiều vi khuẩn, vi nấm có thể gây bệnh. Ngoài ra, nhà nuôi yến thường được xây dựng kín, chỉ chừa lỗ thông hơi nhỏ, do đó mà độ ẩm và độ kín khí cao là môi trường tốt cho các vi sinh vật phát triển. Nếu nhà yến không được vệ sinh sạch sẽ thì rất dễ lây bệnh cho chim yến, đặc biệt là chim non và ảnh hưởng tới sức khỏe người nuôi chim cũng như chất lượng tổ yến.

Các phương pháp để xử lý chất thải trong chăn nuôi thường dùng là phương pháp vật lý (bao gồm phương pháp lắng cặn; sử dụng máy tách chất rắn; lọc), phương pháp hóa học (bơm và trộn các chất điện ly đơn giản hoặc các chất điện ly polyme cùng với hỗn hợp chất thải trước khi tách cơ học làm tăng 82% hiệu quả tách chất rắn) và phương pháp sinh học (sử dụng vi sinh vật để phân giải các

hợp chất hữu cơ trong phân trong điều kiện hiếu khí hay kỵ khí, giảm hàm lượng chất rắn tổng số, giảm mùi, tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh) [4].

Nhờ vào khả năng tiết các enzyme ngoại bào như protease, cellulase, lipase,... mà các chủng vi sinh vật được dùng trong chế phẩm phân hủy các thải chất hữu cơ trong chăn nuôi gia súc, gia cầm. Thường thấy là nấm mốc (chi *Tricoderma*), vi khuẩn (chi *Bacillus*, *Lactobacillus*) và xạ khuẩn (chi *Streptomyces*). Một số chế phẩm đang được sử dụng hiện nay tại Việt Nam như: GEM P (*Lactobacillus* sp, *Rhodopseudomonas* sp, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, ...), EMIC (chi *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*,...), SAGI BIO 1 (*Lactobacillus* và *Streptomyces* ư ả ả ả), EM ANI (*Bacillus* spp, vi khuẩn *Lactobacillus* spp, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter johrii*, *Sacharomyces* sp,...), BOKASHI (*Bacillus* spp., vi nấm, vi khuẩn quang dưỡng) EMZEO, Emuniv, EMC,...

Do đó, để xác định được các chủng vi sinh vật hữu ích, có khả năng tiết enzyme mạnh để phân hủy các chất hữu cơ còn tồn đọng trong phân chim, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu “Phân lập và định danh sơ bộ các chủng vi sinh trong chế phẩm vi sinh sử dụng vệ sinh nhà nuôi yến”.

2. Vật liệu – Phương pháp

2.1. Vật liệu

Chế phẩm vi sinh do Công ty Yến sào Asianet cung cấp, hiện đang được sử dụng để vệ sinh các nhà nuôi chim yến. Dạng bột mịn, màu trắng.

Môi trường NA (Nutrient Agar) để phân lập, làm thuần, giữ giống và khảo sát khả năng di động các chủng vi sinh vật: 5g peptone, 3g cao nấm men, 15g agar, 5g NaCl.

Môi trường CMC (Carboxymethyl cellulose) dùng khảo sát khả năng tạo vòng phân giải cellulose hòa tan: 10g CMC, 1g (NH₄)₂SO₄, 1 g K₂HPO₄, 0.5g MgSO₄.H₂O, 0.001g NaCl, 15g agar.

Môi trường SMA (Skim Milk Agar) dùng khảo sát khả năng tạo vòng phân giải protein: 5g peptone, 3g cao nấm men, 100ml sữa không béo tiệt trùng, 20g agar.

2.2. Phương pháp phân lập và làm thuần

Tiến hành pha loãng thập phân mẫu bột chế phẩm. Sau đó cấy trang mẫu lên các đĩa petri chứa môi trường NA đã được hấp tiệt trùng (121°C, 20 phút). Nuôi cấy ở nhiệt độ phòng (30 - 32°C) trong vòng 3 - 7 ngày để thu các khuẩn lạc. Chọn những khuẩn lạc riêng lẻ và có đặc điểm khác biệt để tiếp tục làm thuần theo phương pháp cấy trang [5].

2.3. Phương pháp khảo sát khả năng di động [5]

Cấy 1 đường thẳng đứng (khoảng 4cm) chủng vi sinh cần khảo sát vào ống thạch đứng chứa môi trường NA, nuôi cấy ở nhiệt độ phòng (30 - 32°C) trong 48h. Kết quả thu được là dương tính (chủng vi sinh vật có khả năng di động) khi phần sinh khối vi sinh phát triển và lan rộng ra 2 bên đường cấy. Ngược lại, kết quả là âm tính khi chủng vi sinh vật chỉ phát triển theo đường cấy.

2.4. Phương pháp khảo sát khả năng sinh catalase [6]

Tạo vết bôi trên lame, nhỏ 3 - 5 giọt nước oxi già (H₂O₂ 3%). Kết quả thu được là dương tính (chủng vi sinh vật có khả năng sinh enzyme catalase) khi có hiện tượng sủi bọt khí và ngược lại.

2.5. Phương pháp khảo sát khả năng sinh cellulase [7]

Chuẩn bị đĩa môi trường CMC (đã được hấp khử trùng). Cấy chấm điểm chủng vi sinh vật vào đĩa (1 điểm/đĩa, lặp lại 3 đĩa). Nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Tiến hành nhuộm dung dịch thuốc thử Congo-red 1 % trong 30 phút rồi rửa lại bằng dung dịch NaCl 1M trong 30 phút. Quan sát và tính kết quả. Khả năng sinh cellulase được xác định theo công thức:

$$H \text{ (mm)} = D \text{ (mm)} - d \text{ (mm)}$$

Trong đó:

D: đường kính vòng phân giải (mm)

d: đường kính khuẩn lạc (mm)

2.6. Phương pháp khảo sát khả năng sinh protease [8]

Chuẩn bị đĩa môi trường SMA (đã được hấp khử trùng). Cấy chấm điểm chủng vi sinh vật vào đĩa (1 điểm/đĩa, lặp lại 3 đĩa). Nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong 5 ngày. Quan sát và tính kết quả. Khả năng sinh amylase được xác định theo công thức:

$$H \text{ (mm)} = D \text{ (mm)} - d \text{ (mm)}$$

Trong đó:

D: đường kính vòng phân giải (mm).

d: đường kính khuẩn lạc (mm).

2.7. Phương pháp định danh sơ bộ

Kết hợp giữa đặc điểm hình thái đại thể và vi thể (hình dạng, màu sắc khuẩn lạc, hình dạng tế bào dưới kính hiển vi) và giải trình tự DNA để định danh các chủng vi sinh vật.

Tiến hành gửi các ống giống thuần của các chủng vi sinh vật cho công ty TNHH DV&TM Nam Khoa để định danh bằng phương pháp Sanger [9]. Kết quả giải trình tự sẽ được so sánh với ngân hàng gene trên NCBI để định danh loài.

2.8. Phương pháp phân tích dữ liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 5 lần và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS.

3. Kết quả

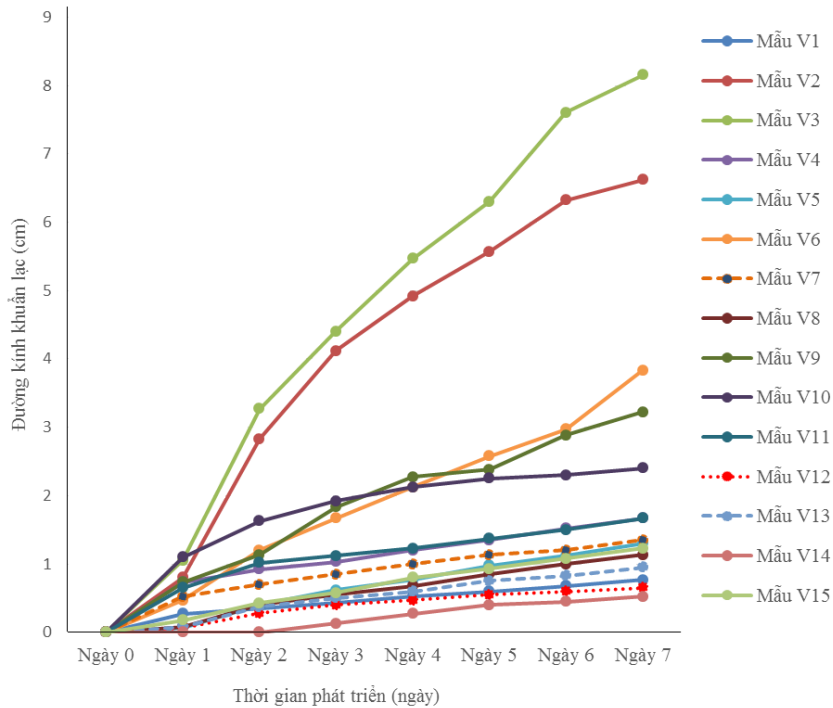
3.1. Phân lập và làm thuần

Kết quả phân lập mẫu chế phẩm thu được 15 chủng vi sinh vật (ký hiệu lần lượt là V1 đến V15). Tiến hành quan sát, ghi nhận đặc điểm đại thể (bảng 1) và tốc độ phát triển (Hình 1) của 15 chủng.

Bảng 1. Đặc điểm đại thể của 15 chủng vi sinh vật phân lập được

Mẫu	Đặc điểm khuẩn lạc	Màu sắc
V1	Khuẩn lạc tròn, trơn bóng, bề mặt phẳng, dạng sợi, rìa khuẩn lạc tròn	Trắng
V2	Khuẩn lạc phân nhánh, bề mặt phẳng, rìa răng cưa	Vàng nhạt

V3	Khuẩn lạc phân nhánh, nhẵn, rìa răng cưa	Trắng đục
V4	Khuẩn lạc tròn, trơn bóng, rìa răng cưa	Trắng đục
V5	Khuẩn lạc tròn, nhẵn, nổi rõ trên mặt thạch, rìa tròn	Trắng đục
V6	Khuẩn lạc tròn, trơn bóng, rìa tròn	Trắng
V7	Khuẩn lạc dài, nhẵn, ăn sâu xuống thạch và hóa nâu nhạt	Vàng nhạt
V8	Khuẩn lạc tròn, trơn bóng, nổi gân ở tâm, rìa răng cưa	Trắng
V9	Khuẩn lạc dài, trơn bóng, rìa răng cưa	Trắng đục
V10	Khuẩn lạc phân nhánh, trơn bóng, rìa răng cưa	Trắng
V11	Khuẩn lạc tròn, trơn bóng, rìa tròn	Vàng nhạt
V12	Khuẩn lạc tròn, trơn bóng, rìa tròn	Trắng
V13	Khuẩn lạc tròn, nhẵn, nổi rõ trên mặt thạch, rìa tròn	Trắng
V14	Khuẩn lạc tròn, trơn bóng, nổi rõ trên mặt thạch, rìa tròn	Trắng
V15	Khuẩn lạc tròn, trơn bóng, rìa tròn	Trắng



Hình 1. Tốc độ phát triển của 15 chủng vi sinh vật phân lập được

Khi làm tiêu bản quan sát dưới kính hiển vi, các chủng có dạng tế bào dạng que hoặc những sợi dài. Vì vậy tổng hợp các đặc điểm đại thể và vi thể, có thể dự đoán đây là những chủng vi khuẩn, vi nấm hoặc xạ khuẩn. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây khi chế phẩm vi sinh thường có các chủng trực khuẩn *Lactobacillus*, *Bacillus*, xạ khuẩn *Streptomyces* và vi nấm *Trichoderma*.

Có thể thấy, tốc độ phát triển của 15 chủng không đều nhau, chia làm 2 nhóm:

- Nhóm phát triển nhanh, đạt được kích thước khuẩn lạc lớn: V2, V3, V6, V9, V10.
- Nhóm phát triển chậm hơn, kích thước khuẩn lạc nhỏ: Mẫu V1, V4, V5, V7, V8, V11, V12, V13, V14, V15.

Do môi trường NA là môi trường cơ bản cho các loài vi sinh vật phát triển,

do đó có thể chưa tối ưu cho một vài chủng. Vì vậy, chúng tôi quyết định chọn 7/15 gồm V1, V3, V5, V6, V12, V13, V14 để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Xác định các đặc điểm sinh học

Kết quả ghi nhận về khả năng di động và khả năng sinh enzyme catalase của 7 chủng vi sinh vật được trình bày ở bảng 2.

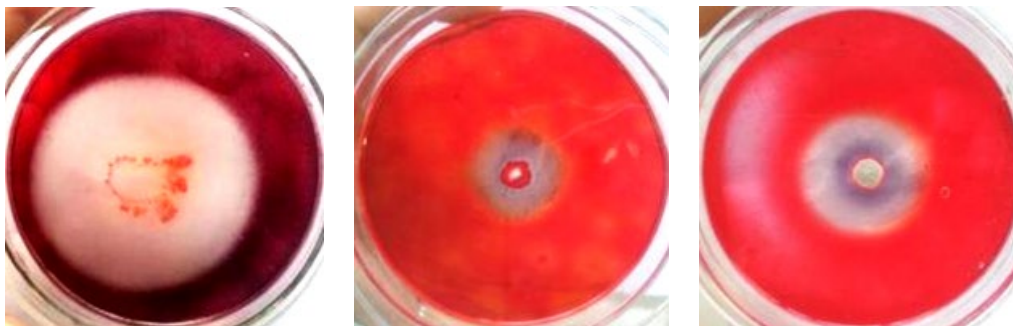
Bảng 2. Khảo sát đặc điểm sinh học

Mẫu	Khả năng di động	Sinh enzyme catalase
V1	-	+
V3	+	+
V5	-	+
V6	+	+
V12	-	+
V13	-	+
V14	-	+

3.3. Khả năng sinh Cellulase

Kết quả cho thấy 3/7 chủng có xuất hiện vòng phân giải. Trong đó chủng V3 có đường kính trung bình vòng phân giải lớn nhất ($3,81a \pm 0,74\text{cm}$), kế đến là chủng V13 ($2,84b \pm 0,23\text{cm}$) và sau cùng là chủng V5 ($0,74c \pm 0,12\text{cm}$). Tương tự, nhóm tác giả Nguyễn Thị Minh [10] và Đặng Quang Hải [11] cũng phân lập và tuyển chọn được đa số

các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose để xử lý chất thải hữu cơ, chất thải chăn nuôi từ 2,20 - 3,70cm và 1,92 - 2,21cm. Từ đó tiềm năng ứng dụng chủng V3 và V13 phối hợp các chủng khác để tạo thành các chế phẩm vi sinh dùng trong xử lý chất thải chăn nuôi là hoàn toàn khả thi.

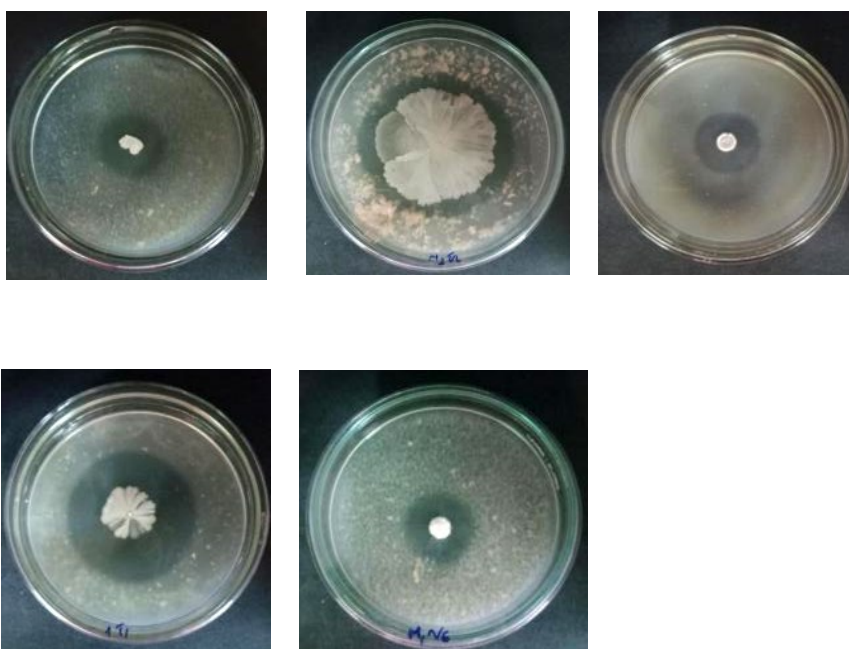


Hình 2. Vòng phân giải của enzyme cellulase của chủng V3, V5, V13

3.4. Khả năng sinh Protease

Nhận thấy có 5/7 chủng có xuất hiện vòng phân giải. Trong đó chủng V5 và V6 có đường kính trung bình vòng phân giải lớn nhất ($2,97 \pm 0,10$ và $2,28a \pm 0,14\text{cm}$), kế đến là chủng V3 ($2,12b \pm$

$0,10\text{cm}$), chủng V1 ($1,83c \pm 0,91\text{cm}$) và sau cùng là chủng V13 ($1,45d \pm 0,13\text{cm}$). Kết quả này tương tự khi các chủng vi sinh vật dùng xử lý chất thải chăn nuôi cũng có đường kính vòng phân giải từ 2,10 - 3,15cm [10] và 1,93 - 2,38cm [11].



Hình 3. Vòng phân giải của enzyme protease của chủng V1, V3, V5, V6, V13

3.5. Kết quả định danh sơ bộ

Kết quả giải trình tự gen bằng kỹ thuật Sanger (gen 16S rRNA) và so sánh trên ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy có 5 mẫu xạ khuẩn (V1, V5, V12, V13, V14)

với độ tương đồng từ 99,01 - 100% và 2 mẫu trực khuẩn (V3, V6) với độ tương đồng 100% (bảng 3). Mức độ tương đồng giữa mẫu thử và mẫu đối chứng trên NCBI được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả định danh

Mẫu	Tên loài	Phân loại	Độ tương đồng (%)	Mã truy cập
V1	<i>Nocardioides luteus</i>	Xạ khuẩn	1412/1414 bp (99%)	JQ659527.1
V5	<i>Streptomyces calvus</i>	Xạ khuẩn	1385/1385 bp (100%)	CP022310.1
V12	<i>Mycolicibacterium mageritense</i>	Xạ khuẩn	1405/1418 bp (99%)	NR_115232.1
V13	<i>Streptomyces rochei</i>	Xạ khuẩn	1216/1216 bp (100%)	MT225666.1
V14	<i>Microthricus soli</i>	Xạ khuẩn	1419/1419 bp (100%)	LT629772.1
V3	<i>Bacillus subtilis</i>	Trực khuẩn	1114/1114 bp (100%)	OR243842.1
V6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Trực khuẩn	829/829 bp (100%)	OR114675.1

4. Kết luận

Đã phân lập và định danh sơ bộ được 7 chủng vi sinh vật trong chế phẩm vi sinh, gồm 5 chủng xạ khuẩn (*Mycolicibacterium mageritense*, *Microthricus soli*, *Nocardioides luteus*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces calvus*) và 2 chủng trực khuẩn (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*). Trong đó 3 chủng có khả năng sinh cellulase (*B. subtilis*, *Streptomyces calvus*, *Streptomyces rochei*), 5 chủng sinh protease (*Nocardioides luteus*, *B. subtilis*, *Streptomyces calvus*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces rochei*).

5. Lời cảm ơn

Cảm ơn Công ty TNHH Yến sào Asiannet đã cung cấp mẫu chế phẩm và

tài trợ một phần kinh phí để chúng tôi hoàn thành đề tài này.

Tài liệu tham khảo

- [1] T. T. M. Linh, H. L. Son and H. M. M. Ai, "Nutritional content of Vietnamese edible bird's nest from selected regions", *European journal of nutrition & food safety*, 9(1): 66-71, 2019.
- [2] Yu-Qin, Y., Liang, ... and Bu-Sen, L., "Determination of edible bird's nest & its products by gas chromatography", *Journal of Chromatographic Science*, 38(1), 27-32, 2000.
- [3] Đỗ Hương, Phát triển ngành nuôi yến hiệu quả: 3 cần, 3 đủ, 16/02/2023 [Trực tuyến]. Địa chỉ <https://baochinhphu.vn/phat-trien-nganh-nuoi-yen-hieu-qua-3-can-3-du-102230216180440247.htm> [Truy cập 27/09/2023].
- [4] P.B. Hiên, "Nghiên cứu vi sinh vật để xử lý chất thải chăn nuôi dạng rắn", Luận

- án tiến sĩ sinh học, Trường đại học KHTN - ĐHQG Hà Nội, 2012.
- [5] Đ. S. Mai, T. N. Nam, B. H. Quân, L. H. Thía, Đ. H. Hà, “Thực tập vi sinh vật học”. Nơi xuất bản: NXB Đại học công nghiệp TpHCM, 2011.
- [6] Karen R., “Catalase test protocol”, ASM Microbelibrary, 2010.
- [7] V. V. P. Quê, C. N. Điệp, “Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose”, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 18a 177-184, 2011.
- [8] L. T. N. Hân, V. T. N. Điệp, T. T. T. Hoa, N. V. Thành, “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp protease từ các sản phẩm đậu nành lên men”, Tạp chí Khoa học kỹ thuật và công nghệ, 2021.
- [9] Gentis, “Giải trình tự bằng phương pháp Sanger”, 2019, [Trực tuyến]. Địa chỉ <https://gentis.com.vn/dao-tao-c17/giai-trinh-tu-bang-phuong-phap-sanger-d39> [Truy cập 01/7/2023]. [10] Đ.T. Minh, D. T. L. Đan và P. V. Cường, “Tuyển chọn giống vi sinh vật để sản xuất chế phẩm vi sinh mới (VINUA-MiosV) dùng xử lý chất thải chăn nuôi”, Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn, Kỳ 1, 102-109, 2021.
- [11] Đ. Q. Hải và T.T.T. Thủy, “phân lập, tuyển chọn và định danh một số chủng vi sinh vật có lợi và bước đầu ứng dụng trong xử lý chất thải rắn hữu cơ làm phân bón hữu cơ sinh học”, Tạp chí khoa học và công nghệ - Đại học Đà Nẵng, Vol. 20, No. 5, 2022.

Ngày nhận bài: 17/7/2023

Ngày hoàn thành sửa bài: 25/9/2023

Ngày chấp nhận đăng: 26/9/2023