

PHÂN LẬP, NHẬN DIỆN VI KHUẨN PHÂN HỦY CELLULOSE TỪ SÙNG (*Holotrichia parallela*) VÀ TRÙN ĐẤT (*Lubricus terrestris*)

Mai Thi, Nguyễn Hữu Hiệp và Dương Ngọc Thúy

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/10/2016

Ngày nhận bài sửa: 24/02/2017

Ngày duyệt đăng: 26/06/2017

Title:

Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from *Holotrichia parallela* and *Lubricus terrestris*

Từ khóa:

Bacillus cereus, *Bacillus flexus*, *Bacillus subtilis*, enzyme cellulase, kỹ thuật PCR, sùng, trùn đất

Keywords:

Bacillus cereus, *Bacillus flexus*, *Bacillus subtilis*, cellulase enzyme, *Holotrichia parallela*, *Lubricus terrestris*, Polymerase Chain Reaction

ABSTRACT

Organic waste, mainly containing cellulose, is an important source causing environmental pollution if it is not treated. Therefore, isolation and selection of indigenous bacteria which can degrade organic waste is necessary. Fifty-one cellulose degrading bacterial isolates were isolated from the intestine of *Holotrichia parallela* and *Lubricus terrestris*, including fifteen isolates from Hau Giang province and thirty-six isolates from Soc Trang province. Most of them have rod shape, motility, forming milky-white with colony, entire margin and convex. Cellulose degrading ability of the bacteria was carried out. The results showed that 25 isolates had cellulase enzyme activity. Specially, two isolates named CS2 and CH8 isolated from *Holotrichia parallela* and TS3 isolated from *Lubricus terrestris* with the high enzyme activity were identified as *Bacillus cereus* strain L5, *Bacillus flexus* strain KJ1-5-910 and *Bacillus subtilis* strain 168, respectively.

TÓM TẮT

Cellulose trong rác thải hữu cơ và phế phẩm nông nghiệp là tác nhân chính gây ô nhiễm môi trường đất, nước và không khí. Vì vậy, phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy cellulose là việc làm rất cần thiết. Năm mươi một dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose đã được phân lập từ ruột của sùng (*Holotrichia parallela*) và trùn đất (*Lubricus terrestris*), bao gồm 15 dòng phân lập từ tỉnh Hậu Giang và 36 dòng phân lập từ tỉnh Sóc Trăng. Đa số các dòng vi khuẩn phân lập có dạng hình que, có khả năng chuyển động, khuẩn lạc có màu trắng đục, dạng bìa nguyên và độ nổi mô. Khảo sát khả năng phân hủy cellulose của vi khuẩn cho thấy có 25 dòng vi khuẩn phân lập hoạt tính enzyme cellulase. Đặc biệt, 3 dòng vi khuẩn CS2, CH8 và TS3 có hoạt tính enzyme cellulase mạnh được nhận diện theo thứ tự là *Bacillus cereus* strain L5, *Bacillus flexus* strain KJ1-5-910 và *Bacillus subtilis* strain 168.

Trích dẫn: Mai Thi, Nguyễn Hữu Hiệp và Dương Ngọc Thúy, 2017. Phân lập, nhận diện vi khuẩn phân hủy cellulose từ sùng (*Holotrichia parallela*) và trùn đất (*Lubricus terrestris*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 50b: 81-90.

1 GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là vùng sản xuất lương thực trọng điểm của cả nước. Sản lượng lúa hàng năm toàn vùng chiếm hơn 51,5%

tổng sản lượng lúa và đóng góp 90% sản lượng gạo xuất khẩu của cả nước. Tương ứng với diện tích canh tác thì lượng rom thải bỏ hoặc đốt hàng năm ở ĐBSCL là rất lớn (Bộ Tài nguyên và Môi trường, 2010). Theo Trần Sỹ Nam và ctv. (2014), ở

ĐBSCL có 6 hình thức quản lý và xử lý rơm rạ thải sau thu hoạch là đốt rơm, vùi rơm, trồng nấm, chăn nuôi và bán cho người khác, trong đó đốt rơm là hình thức phổ biến nhất chiếm từ 89,7% ở vụ Hè Thu đến 98,2% ở vụ Đông Xuân, kể đến là vùi rơm vào đất. Việc đốt rơm rạ cũng như vùi rơm vào trong đất là sự lãng phí nguồn năng lượng các-bon hữu cơ rất lớn đồng thời gây ô nhiễm môi trường, tiêu diệt các vi sinh vật có lợi trong đất, làm giảm dưỡng chất của đất, gây ngộ độc hữu cơ cho đất. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy nhiều loài nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn được tìm thấy nhiều trong đất, nước, hệ tiêu hóa một số động vật... Đặc biệt là đối với một số côn trùng ăn thực vật thì hệ vi khuẩn đường ruột như *Bacillus*, *Paenibacillus*... có khả năng phân hủy cellulose rất tốt (Schwarz, 2001). Rút ngắn thời gian phân hủy rơm rạ, cải thiện độ phì nhiêu của đất và bảo vệ môi trường trong canh tác nông nghiệp theo hướng bền vững là những yêu cầu thiết yếu hiện tại. Với những lý do trên nghiên cứu “Phân lập, nhận diện vi khuẩn phân hủy cellulose từ ruột sùng (*Holotrichia parallela*) và

trùn đất (*Lubricus terrestris*)” được thực hiện nhằm phân lập tuyển chọn được các dòng vi khuẩn có hoạt tính phân hủy cellulose mạnh, ứng dụng xử lý phế phẩm nông nghiệp góp phần bảo vệ môi trường.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu thí nghiệm

Mẫu 12 con sùng trọng lượng từ 2,5 - 15 g (Hình 1) và mẫu 12 con trùn đất nặng từ 3 - 11 g (Hình 2) được thu thập từ đồng rơm ở tỉnh Hậu Giang và Sóc Trăng.

Để thực hiện nghiên cứu môi trường phân lập vi khuẩn phân hủy cellulose (Shengwei *et al.*, 2012), môi trường thử hoạt tính enzyme cellulase (Hedrick *et al.*, 1995), môi trường thử khả năng phân hủy bột giấy, môi trường LB (Sikorski *et al.*, 2002), môi trường glucose-phosphate (peptone 5g/L, glucose 5 g/L, K₂HPO₄ 5 g/L), hóa chất định lượng CMCase, thuốc thử Somogyi, thuốc thử Nelson được sử dụng.



Hình 1: Con sùng sử dụng trong nghiên cứu



Hình 2: Con trùn đất sử dụng trong nghiên cứu

2.2 Phương pháp

2.2.1 Phân lập vi khuẩn

Con sùng và trùn thu về rửa sạch bằng nước cất, khử trùng bằng cồn 70° trong 5 phút sau đó bằng oxy già 3% trong 5 phút, mô lấy ruột trái vào đĩa petri có chứa môi trường nuôi cấy (Shengwei *et al.*, 2012) ở 30°C trong 24 giờ ở điều kiện hiếu khí. Khi khuẩn lạc phát triển trên đĩa petri, chọn một khuẩn lạc rời cấy chuyển cho đến khi vi khuẩn rỗng.

2.2.2 Quan sát đặc tính của vi khuẩn

Đo kích thước khuẩn lạc, đo kích thước tế bào, quan sát khả năng chuyển động và nhuộm gram vi khuẩn được phân lập theo mô tả của Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp (2002).

2.2.3 Khảo sát định tính khả năng phân hủy CMC của các dòng vi khuẩn

Mục đích: chọn lọc được một số dòng vi khuẩn phân hủy CMC mạnh dựa trên đường kính phân hủy của các dòng vi khuẩn trên môi trường kiểm tra hoạt tính cellulase.

Cách tiến hành: Nuôi vi khuẩn trong môi trường LB trong 24 giờ, sau đó hút 5 µL dung dịch vi khuẩn nhỏ lên đĩa môi trường CMC đã khử trùng, ủ 48 - 96 giờ. Xác định đường kính vòng tròn phân hủy bằng cách đổ ngập dung dịch Lugol vào đĩa trong 15 phút, sau đó rửa lại với dung dịch NaCl 1M.

Kết quả: Có vòng sáng halo thì vi khuẩn có khả năng phân hủy CMC, không có vòng sáng không màu vi khuẩn không phân hủy CMC.

Công thức tính khả năng phân hủy CMC (Nguyễn Đức Lượng, 2004) như sau:

$$\frac{\text{Đường kính phân hủy} - \text{đường kính khuẩn lạc}}{\text{đường kính phân hủy}} \times 100$$

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi dòng vi khuẩn.

2.2.4 Khảo sát khả năng phân hủy bột giấy của các dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp enzyme cellulase

Hoạt tính của CMCase (Endoglucanase) được xác định khi ủ enzyme cellulase với CMC 0,5% trong đệm Sodium phosphate pH 5, thời gian 60 phút. Tương tự, hoạt tính của Avicelase (Exoglucanase) được xác định khi ủ enzyme cellulase với bột cellulose 1% trong đệm Sodium phosphate pH 5, thời gian 60 phút.

Tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp enzyme cellulase trên môi trường CMC và tiến hành khảo sát khả năng phân hủy bột giấy.

Các bước thực hiện tương tự như khảo sát hoạt tính enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn trên môi trường CMC, tuy nhiên cơ chất CMC được thay bằng bột giấy.

2.2.5 Xác định hoạt tính enzyme cellulase

a. Khảo sát enzyme endoglucanase của các dòng vi khuẩn đã chọn

Mục đích: Chọn lọc các dòng vi khuẩn tạo CMCase và phân hủy CMC mạnh.

Nguyên tắc: Cơ chất CMC bị enzyme endoglucanase phân cắt thành đường đơn. Hàm lượng đường khử tạo thành được xác định bằng cách dùng chất thử acid 3,5-dinitrosalicylic (DNS) và máy đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm. DNS có màu vàng trong dung dịch kiềm sẽ bị khử thành acid 3-amino-5-nitrosalicylic màu đỏ cam.

Nguyên tắc đo lượng đường khử dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử acid dinitrosalicylic (DNS), phản ứng này xảy ra trong môi trường kiềm và có gia nhiệt. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ đường khử trong một phạm vi nhất định. Dựa theo đồ thị đường chuẩn của glucose với thuốc thử acid dinitrosalicylic sẽ tính được hàm lượng đường khử trong mẫu.

Các bước thực hiện: Ly trích enzyme các dòng vi khuẩn được chọn ở thí nghiệm trên được chũm vào 20 mL môi trường CMC lỏng, nuôi ở nhiệt độ 30°C trong 60 giờ. Hút 10 mL dịch vi khuẩn ly tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút, loại bỏ sinh khối, lấy phần dịch sử dụng như dung dịch enzyme thô. Thực hiện phản ứng khử lấy 1 mL dịch enzyme thô cho vào ống nghiệm 16 × 100 mm, cho vào 1 mL CMC (1%), cho phản ứng xảy ở nhiệt độ 30°C, pH 6 trong 60 phút.

Lập đường chuẩn DNS theo bảng và dựng đường chuẩn (Tasun *et al.*, 1970): đun cách thủy các ống nghiệm 5 phút sau đó làm nguội các ống nghiệm ở nhiệt độ phòng, đem đo độ đục môi trường nuôi (OD_{540nm}). Xây dựng đường chuẩn glucose $y = f(x)$ với trục tung (y) là mật độ quang, trục hoành (x) là hàm lượng đường glucose (% w/v).

Đo lượng đường khử: Hút 1 mL mẫu cần đo cho vào ống nghiệm, cho tiếp 3 mL thuốc thử DNS. Đun cách thủy các ống nghiệm trong 5 phút. Làm nguội ở nhiệt độ phòng, sau đó đem đo OD (540 nm). Dựa vào đường chuẩn, tính nồng độ glucose.

b. Khảo sát enzyme exoglucanase của các dòng vi khuẩn đã chọn

Phương pháp Nelson-Somogyi xác định hoạt tính enzyme dựa vào lượng đường khử sinh ra thông qua phản ứng trung gian với thuốc thử Nelson-Somogyi. Theo Nelson (1944) lượng đường khử tác dụng với thuốc thử đồng, khi đun nóng cho màu đỏ gạch và khi tác dụng với thuốc thử Aseno-moblybdate sẽ làm chuyển sang màu xanh da trời, hấp thụ ở bước sóng 520 nm.

Ly trích enzyme các dòng vi khuẩn có hoạt tính enzyme cellulase cao được chọn ra từ thí nghiệm bột giấy được nuôi tăng sinh trong 20 mL môi trường gồm các thành phần CMC 1%, glucose 0,1%, pepton 5%, cao nấm 2,5% trong bình tam giác đã khử trùng trên máy lắc ở 30°C, 150 vòng/phút.

Sau 48 giờ, tiến hành trộn mẫu bằng máy vortex đối với dòng vi khuẩn hiếu khí và lắc đều mẫu vi hiếu khí bằng tay. Chuyển 2 mL dịch nuôi vi khuẩn vào tube 2,2 mL. Mỗi mẫu chuyển vào 2 tube. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và thu phần dịch bên trên.

Khảo sát hoạt tính enzyme cellulase bằng phương pháp Nelson: Pha dung dịch đường chuẩn cho vào 6 ống nghiệm, mỗi ống nghiệm gồm thành phần các chất theo thứ tự và dựng đường chuẩn và đo xác định lượng đường khử của mẫu thí nghiệm. Ủ trong tối 20 phút. Ly tâm nếu có cặn, đo quang phổ bước sóng 520 nm. Lượng đường khử trong dịch trích thô được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn glucose.

Đơn vị hoạt tính enzyme trong 1 mL enzyme được tính theo công thức:

$$U = \left(\frac{X}{T \times V_E} \right) \times k$$

trong đó:

U: hoạt tính enzyme (U/mL)

X: hàm lượng glucose trong dung dịch đo

T: thời gian phản ứng (phút)

V_E: thể tích enzyme (mL)

k: hệ số pha loãng

2.2.6 Định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

a. Nhận diện vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR

Sau khi trích ADN từ các dòng vi khuẩn đã phân lập, tiến hành phản ứng PCR bằng máy PCR Perkin Elmer PE 9700 (Hoa Kỳ) với cặp mồi 27f (Jeremy *et al.*, 2007)

27f-CM 5 -AGAGTTTGTGATCMTGGCTCAG;

27f-YM 5 -AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG

Thể tích cho 1 phản ứng là 20 µL.

Chu kỳ luân nhiệt của phản ứng PCR: 94°C - 5 phút, 5 chu kỳ, 94°C - 30 giây, 60°C - 30 giây, 72°C - 2 phút, 5 chu kỳ, 94°C - 30 giây, 55°C - 30 giây, 72°C - 2 phút, 25 chu kỳ 94°C - 30 giây, 50°C - 30 giây, 72°C - 2 phút, 72°C - 10 phút.

b. Phương pháp điện di agarose sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR (20 µL) sau khi khuếch đại được điện di trên gel 1 - 2% agarose trong dung dịch đệm TAE 1X (gồm 10 mM Tris; 5 mM acetate và 0,1 mM EDTA). Điện di sản phẩm PCR và chụp hình gel bằng máy BioRad UV 2000 (Trần Nhân Dũng, 2011).

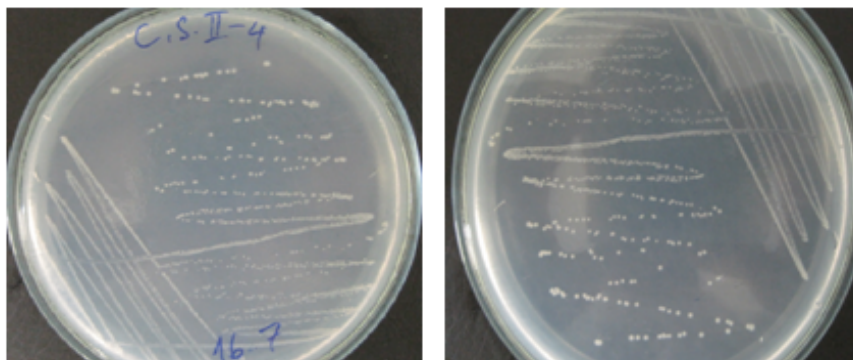
c. Phương pháp giải trình tự sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được tinh sạch, kiểm tra nồng độ DNA sau khi tinh sạch, thực hiện phản ứng PCR gắn huỳnh quang với thuốc nhuộm Big. Dye Terminator v3.1. Giải trình tự bằng máy giải trình tự ABI PRISM 3130. Kết quả giải trình tự các dòng vi khuẩn được so sánh độ tương đồng với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng chương trình BLASTN, kết hợp với kết quả khảo sát các đặc điểm sinh lý, sinh hóa để định danh vi khuẩn (Trần Nhân Dũng, 2011).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập vi khuẩn

Năm mươi một dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose đã được phân lập từ ruột của con sùng và trùn đất. Trong đó, có 15 dòng phân lập ở tỉnh Hậu Giang và 36 dòng phân lập ở Sóc Trăng.



Hình 3: Khuẩn lạc các dòng vi khuẩn phát triển sau 24 giờ

3.2 Đặc tính các dòng vi khuẩn phân lập

Đa số các dòng vi khuẩn phân lập được có khuẩn lạc hình tròn, độ nổi mô hoặc lồi, bìa nguyên hoặc răng cưa, khuẩn lạc có màu trắng trong hoặc trắng đục, đường kính khuẩn lạc từ 1 - 3 mm.

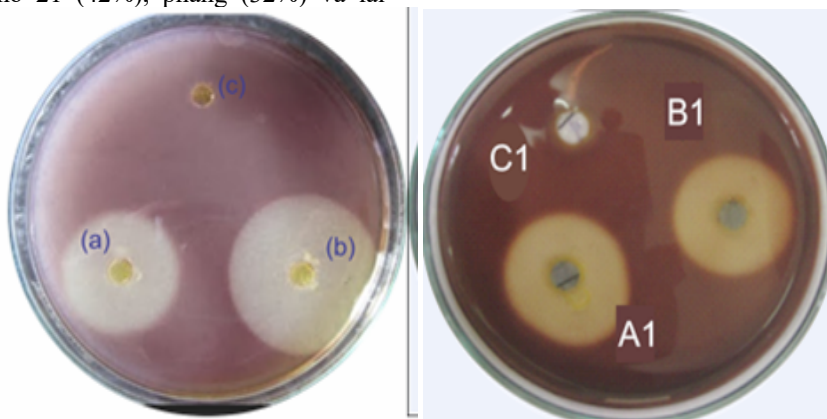
3.3 Đặc điểm hình thái và sinh hóa các dòng vi khuẩn được phân lập

Hình dạng khuẩn lạc: Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều có dạng tròn (100%). Độ nổi đa số là độ nổi mô 21 (42%), phẳng (32%) và lồi

(26%). Dạng bìa: đa số là bìa nguyên 45 dòng (90%), bìa răng cưa 5 dòng (10%). Màu sắc khuẩn lạc gồm có trắng trong (32%), trắng sữa (56%) và vàng nhạt (12%). Đường kính khuẩn lạc dao động từ 0,5 - 3 mm (Bảng 1).

3.4 Khả năng phân hủy CMC

Sau khi nhỏ dịch vi khuẩn đã tăng sinh vào giềng thạch ủ ở nhiệt độ phòng (30°C) trong 48 giờ, chỉ có 25 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy CMC (Bảng 2, Hình 4).



Hình 4: Hình vòng sáng halo của các dòng vi khuẩn được phân lập

(c) - Đối chứng, (b) - dòng CS2, (a) - dòng CH8,

(C1) - Đối chứng, (B1) - dòng TS3, (A1) - dòng TH5

Dòng vi khuẩn có đường kính vòng tròn thủy phân dao động từ 0 - 23,8 mm. Trong đó, có 2 dòng có hoạt tính thủy phân CMC cao nhất và không có sự khác biệt về mặt thống kê ở mức 5% là CS2 (23,8 mm) và CH8 (22,6 mm). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Cao Mỹ Phượng (2014) khi khảo sát khả năng phân hủy CMC của các dòng vi khuẩn phân lập từ ruột con

sùng với đường kính vòng tròn thủy phân là 26 mm.

Từ 25 dòng có khả năng tổng hợp enzyme cellulase trên cơ chất CMC cao và có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các dòng vi khuẩn khác, 10 dòng vi khuẩn được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo là CS2, CH8, TS3, TH5, CH5, CH7, CH1, CH5, CH9, CS1 (Bảng 3).

Bảng 1: Đặc điểm tế bào của các dòng vi khuẩn phân lập được trên môi trường CMC

STT	Dòng vi khuẩn	Chuyển động	Gram	Hình dạng	Kích thước vi khuẩn (μm)	
					Chiều dài	Chiều rộng
1	CH1	+	+	Cầu	0,52	0,52
2	CH2	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
3	CH3	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
4	CH4	+	+	Que ngắn	0,87	0,52
5	CH5	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
6	CH6	+	-	Cầu	0,87	0,87
7	CH7	+	+	Que ngắn	1,39	0,69
8	CH8	+	+	Que ngắn	2,1	0,90
9	CH9	+	-	Que ngắn	1,04	0,52
10	CH10	+	+	Que ngắn	0,87	0,52
11	CS1	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
12	CS2	+	+	Que ngắn	2,09	0,87
13	CS3	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
14	CS4	+	-	Cầu	0,87	0,87
15	CS5	+	+	Cầu	0,52	0,52
16	CS6	+	+	Cầu	0,52	0,52
17	CS7	+	-	Cầu	0,87	0,87
18	CS8	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
19	CS9	+	+	Que ngắn	1,74	1,22
20	CS10	+	-	Que ngắn	2,09	1,39
21	CS11	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
22	CS12	+	+	Que ngắn	1,39	0,69
23	CS13	+	+	Que ngắn	1,22	0,7
24	CS14	+	-	Cầu	0,52	0,52
25	CS15	+	-	Que ngắn	1,39	0,87
26	TH1	+	-	Cầu	0,87	0,87
27	TH2	+	+	Que ngắn	1,74	1,22
28	TH3	+	-	Que ngắn	1,39	0,87
29	TH4	+	+	Que ngắn	0,87	0,52
30	TH5	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
31	TH6	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
32	TH7	+	+	Que ngắn	0,87	0,52
33	TH8	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
34	TH9	+	+	Que ngắn	1,39	0,87
35	TH10	+	+	Que ngắn	0,87	0,52
36	TH11	+	+	Que ngắn	2,39	1,87
37	TH12	+	-	Que ngắn	1,74	1,22
38	TS1	+	-	Que ngắn	1,74	1,22
39	TS2	+	-	Cầu	0,52	0,52
40	TS3	+	+	Que ngắn	2,61	0,74
41	TS4	+	-	Que ngắn	2,01	1,22
42	TS5	+	+	Que dài	3,22	1,52
43	TS6	+	-	Cầu	0,87	0,87
44	TS7	+	-	Cầu	0,52	0,52
45	TS8	+	-	Que ngắn	1,39	0,87
46	TS9	+	-	Que ngắn	1,39	0,87
47	TS10	+	-	Que ngắn	1,39	0,87
48	TS11	+	-	Que ngắn	0,87	0,52
49	TS12	+	+	Cầu	0,52	0,52
50	TS13	+	-	Que ngắn	0,87	0,52
51	TS14	+	-	Que ngắn	0,85	0,50

Bảng 2: Hoạt tính enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn thể hiện qua đường kính thủy phân cellulose trên môi trường CMC

STT	Dòng vi khuẩn	Đường kính thủy phân (mm)	STT	Dòng vi khuẩn	Đường kính thủy phân (mm)
1	CH1	15,7 ^c	27	TH2	9,3 ^g
2	CH2	5,0 ⁱ	28	TH3	0,0 ^l
3	CH3	0,0 ^l	29	TH4	0,0 ^l
4	CH4	0,0 ^l	30	TH5	17,9 ^{cd}
5	CH5	17,6 ^d	31	TH6	0,0 ^l
6	CH6	0,0 ^l	32	TH7	4,0 ^j
7	CH7	15,3 ^c	33	TH8	0,0 ^l
8	CH8	22,6 ^b	34	TH9	4,0 ^j
9	CH9	10,0 ^{fg}	35	TH10	0,0 ^l
10	CH10	0,0 ^l	36	TH11	10,3 ^f
11	CS1	9,3 ^g	37	TH12	0,0 ^l
12	CS2	23,8 ^a	38	TS1	6,3 ^h
13	CS3	6,0 ^h	39	TS2	0,0 ^l
14	CS4	0,0 ^l	40	TS3	18,7 ^c
15	CS5	4,7 ^{ij}	41	TS4	0,0 ^l
16	CS6	4,3 ^{ij}	42	TS5	4,3 ^{ij}
17	CS7	0,0 ^l	43	TS6	0,0 ^l
18	CS8	4,3 ^{ij}	44	TS7	3,0 ^k
19	CS9	0,0 ^l	45	TS8	0,0 ^l
20	CS10	0,0 ^l	46	TS9	0,0 ^l
21	CS11	0,0 ^l	47	TS10	3,7 ^{jk}
22	CS12	0,0 ^l	48	TS11	0,0 ^l
23	CS13	3,0 ^k	49	TS12	3,0 ^k
24	CS14	0,0 ^l	50	TS13	0,0 ^l
25	CS15	3,0 ^k	51	TS14	0,0 ^l
26	TH1	0,0 ^l			
CV (%)		6,29			

Ghi chú: Các giá trị trung bình theo sau có các ký tự a, b, c... giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Bảng 3: Hàm lượng đường khử sinh ra khi thủy phân CMC của 10 dòng vi khuẩn có hoạt tính mạnh

STT	Dòng vi khuẩn	Hàm lượng đường khử (µg/mL)
1	CS2	63,1 ^a
2	CH8	60,3 ^a
3	TS3	59,6 ^a
4	TH5	39,9 ^b
5	CH5	37,1 ^b
6	CH7	34,9 ^{bc}
7	CH1	29,3 ^c
8	CH9	23,0 ^d
9	TH2	21,6 ^{de}
10	CS1	18,1 ^{de}
CV (%)		5,88

Ghi chú: Các giá trị trung bình theo sau có các ký tự a, b, c... giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Kết quả cho thấy cả 10 dòng vi khuẩn sau khi đã trích dịch enzyme thô cho phân hủy dung dịch CMC đều tạo ra lượng đường khử. Như vậy, cả 10 dòng đều có enzyme CMCase (Bảng 3). Trong đó, 3 dòng vi khuẩn CS2, CH8, TS3 có lượng đường khử cao lần lượt 63,1 µg/mL, 60,3 µg/mL, 59,6 µg/mL và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng vi khuẩn còn lại ở mức 5%.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Xia *et al.* (2014) khi ông nghiên cứu các vi khuẩn phân lập từ ruột côn trùng ăn thực vật có khả năng phân hủy cellulose.

3.4.1 Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme cellulase trên môi trường bột giấy

Tất cả 10 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose với cơ chất CMC đều có khả năng tổng hợp enzyme để thủy phân cellulose ở dạng cơ chất bột giấy. Trong đó, dòng vi khuẩn có đường kính vòng thủy phân cao là CS2 (24,3 mm), CH8 (23 mm) và TS3 (18,3 mm) (Bảng 4).

Bảng 4: Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn trên môi trường cơ chất là bột giấy

STT	Dòng vi khuẩn	Đường kính thủy phân (mm)
1	CS2	24,3 ^a
2	CH8	23,0 ^{ab}
3	TS3	18,3 ^{bc}
4	TH5	15,3 ^{cd}
5	CH5	14,0 ^{cd}
6	CH7	10,3 ^{de}
7	CH1	8,0 ^{ef}
8	CH5	7,7 ^{ef}
9	CH9	6,7 ^{ef}
10	CS1	4,0 ^f
CV (%)		16,34

Ghi chú: Các giá trị trung bình theo sau có các ký tự a, b, c... giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.5 Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme CMCase (Endoglucanase) và Avicelase (Exoglucanase) của 10 dòng vi khuẩn bằng phương pháp Nelson-Somogyi

Hoạt tính enzyme endoglucanase có sự khác biệt giữa các dòng vi khuẩn. Dòng vi khuẩn có hoạt tính enzyme endoglucanase cao là dòng vi khuẩn CS2 (0,043 U/mL), kế đến là dòng CH8 (0,037 U/mL) và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% so với các dòng vi khuẩn còn lại (Bảng 4). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Dantur *et al.* (2015) khi phân lập vi khuẩn phân hủy cellulose từ ruột sâu đục thân cây mía *Diatraea saccharalis*, kết quả phân lập được dòng vi khuẩn *Bacillus pumilus* kd109 có hoạt tính enzyme endoglucanase là 0,23 U/mL. Kết quả nghiên cứu của Ray *et al.* (2007) cho thấy hai dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CY5 và *Bacillus circulans* TP3 phân lập từ ruột cá trắm cỏ *Cyprinus carpio* L và *Mozambique tilapia* khi lên men rắn 120 giờ có hoạt tính cellulase theo

thứ tự là 26 U/mL và 20,2 U/mL.

Hoạt tính enzyme exoglucanase ở các dòng vi khuẩn có sự khác nhau. Dòng CS2 có hoạt tính enzyme exoglucanase cao là 0,041 U/mL và kế đến là dòng CH8 (0,036 U/mL khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại ở mức 5% (Bảng 5). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Jacob *et al.* (2014) khi phát hiện vi khuẩn từ ruột trùn đất của hai dòng vi khuẩn A và B có hoạt tính enzyme Exoglucanase lần lượt là 0,213 FPU/mL và 0,138 FPU/mL.

Bảng 5: Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme Endoglucanase và Exoglucanase của 10 dòng vi khuẩn

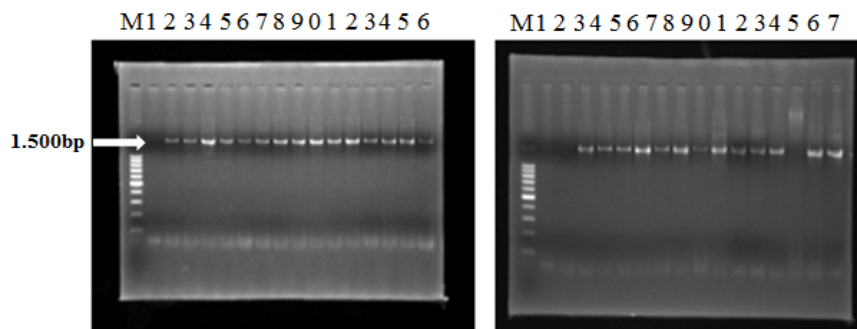
STT	Ký hiệu dòng	Hoạt tính enzyme Endoglucanase (U/mL)	Hoạt tính enzyme Exoglucanase (U/mL)
1	CS2	0,043 ^a	0,041 ^a
2	CH8	0,037 ^{ab}	0,036 ^b
3	TS3	0,029 ^{bc}	0,028 ^c
4	TH5	0,023 ^{cd}	0,025 ^d
5	CH5	0,019 ^d	0,019 ^e
6	CH7	0,019 ^d	0,017 ^{ef}
7	CH1	0,017 ^{de}	0,016 ^f
8	CH5	0,016 ^{de}	0,015 ^f
9	CH9	0,015 ^{de}	0,015 ^f
10	CS1	0,009 ^e	0,009 ^g
CV (%)			5,04
			5,02

Ghi chú: Các giá trị trung bình theo sau có các ký tự a, b, c... giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.6 Nhận diện các dòng vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

3.6.1 Kết quả điện di agarose sản phẩm PCR

Kết quả điện di agarose sản phẩm PCR cho thấy 22 dòng xuất hiện band 1.500 bp (Hình 5).



Hình 5: Kết quả điện di các dòng vi khuẩn

Chú thích:

Giếng 2: Dòng CS2 Giếng 3: Dòng TS3 Giếng 9: Dòng CH8

3.6.2 Kết quả giải trình tự DNA sản phẩm PCR

Ba dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp enzyme cellulase cao và khả năng phân hủy cellulose tốt chọn lựa nhận diện bằng phương pháp sinh học phân tử là CS2, CH8 và TS3. Kết quả giải

trình tự các dòng vi khuẩn được so sánh độ tương đồng với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy dòng vi khuẩn CS2, CH8 và TS3 được nhận diện theo thứ tự là *Bacillus cereus* strain L5, *Bacillus flexus* strain KJ1-5-910 và *Bacillus subtilis* strain 168 với độ đồng hình cao (Bảng 6).

Bảng 6: Kết quả giải trình tự gen vi khuẩn phân lập

STT	Ký hiệu	Kết quả so sánh độ tương đồng trên Ngân hàng dữ liệu NCBI	Đoạn gen giải trình tự	Mức độ đồng hình (%)	Accession number
1	CS2	<i>Bacillus cereus</i> strain FORC 024	1251	95	CP012691.1
2	CH8	<i>Bacillus flexus</i> strain NB4-9	1653	98	KR999917.1
3	TS3	<i>Bacillus subtilis</i> strain OSS5	1300	95	EU124556.1

Kết quả giải trình tự định danh các dòng vi khuẩn phân lập cho thấy cả 3 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose mạnh thuộc giống *Bacillus*. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Robson *et al.* (1984) khi phân lập được vi khuẩn *Bacillus* strain DLG có hoạt tính enzyme exoglucanase là 1,17 U/mL và enzyme exoglucanase là 0,05U/mL có khả năng phân hủy cellulose tốt. Theo Kim *et al.* (2012) dòng *Bacillus subtilis* KACC10111 phân lập từ môi trường đất nông nghiệp có khả năng phân hủy cellulose với hoạt tính enzyme endoglucanase là 0,16 U/mL.

Các nghiên cứu của Yan *et al.* (2011) cho thấy nuôi cấy *Bacillus cereus* trên cơ chất bột mì có bổ sung nitrogen enzyme cellulase đạt 16,94 IU/mL và nuôi cấy trên cơ chất bột giấy Whatman, hoạt tính enzyme cellulase là 0,13 IU/mL. Kết quả nghiên cứu của Tengku Norsalwani Tuan Lah *et al.* (2012) cho thấy khi ứng dụng *Bacillus cereus* phân hủy bã Cọ bằng phương pháp lên men rắn, hoạt tính enzyme cellulase là 3,693 FPU/mL.

4 KẾT LUẬN

Năm mươi một dòng vi khuẩn đã được phân lập từ ruột của con sùng và con trùn ở tỉnh Hậu Giang và Sóc Trăng. Trong đó, 25 dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp enzyme cellulase với hoạt tính cao.

Cả 3 dòng CS2, CH8, TS3 đều có khả năng phân hủy CMC trên bột giấy.

Đặc biệt chọn được 3 dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp được cả hai hoạt tính endoglucanase và exoglucanase cao là CS2, CH8 và TS3 được nhận diện theo thứ tự là *Bacillus cereus* strain L5, *Bacillus flexus* strain KJ1-5-910, *Bacillus subtilis* strain 168.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Tài nguyên và Môi trường, 2010. Báo cáo Môi trường Quốc gia năm 2010 - Tổng quan Môi trường Việt Nam.

- Cao Ngọc Diệp, Nguyễn Hữu Hiệp, 2002. Giáo trình vi sinh vật chuyên sâu. Trường Đại học Cần Thơ.
- Dantur K. I., Enrique R., Welin B., Castagnaro A. P., 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express*, 5: 15.
- Hedricks C. W., Doyle J. D., Hugley B., 1995. A new solid medium for enumerating cellulose utilizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Micrology*, 61: 2016-2019.
- Jacob K. M., George A., Sathivelu M. M., Sathivelu A., 2014. Isolation and screening of cellulose degrading microorganisms from the gut of composting earthworms and its industrial applications. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(3): 501 - 507.
- Jeremy A. F., Reich C. I., Weisbaum J. S., Wilson B. A., Olsen G. J., 2007. Bacterial 16S rRNA genes commonly used for amplification of critical evaluation of two primers. *Appl. Environ. Microbiol*, 74(8): 2461-2469.
- Kim Y. K., Yu S. C., Lee Y. Y., Cho H. J. Oh, Ko Y. H., 2012. Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. *International Scholarly Research Network ISRN Microbiology*, 2012: 1-9.
- Nelson N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem*, 153: 375-80.
- Nguyễn Đức Lượng, 2004. Công nghệ enzyme. NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
- Ray A. K., Bairagi A., Ghosh S. K., Sen S. K., 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyol. Piscat*. 37(1): 47-53.
- Robson L. M., Chambliss G. H., 1984. Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5): 1039-1046.
- Schwarz W. H., 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 56: 634 - 649.

- Shengwei H., Sheng P., Zhang H., 2012. Isolation and Identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 2563-2577.
- Sikorski J., Mohle M., Wackernagel W., 2002. Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local *Pseudomonas stutzeri* populations from marine sediment and soils. *Environment Microbiol*, 4: 465-476.
- Tasun K., Ghose P., Ghen K., 1970. Sugar determination of DNS method. *Biotechnology and Bioengineering*, 12: 921.
- Tengku Norsalwani Tuan Lah, Nik Norulaini Nik, Ab. Rahman, Moftah Massaud Ben Nama, 2012. Cellulase activity and glucose production by *Bacillus cereus* mono-culture and co-culture utilizing Palm Kernel Cake (PKC) under solid state fermentation. *International Conference on Environment, Energy and Biotechnology*, 33: 551-552.
- Trần Nhân Dũng, 2011. Sổ tay thực hành sinh học phân tử. Đại học Cần Thơ.
- Trần Sỹ Nam, Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Hữu Chiêm, Nguyễn Võ Châu Ngân, Lê Hoàng Việt, Kjeld Ingvorsen, 2014. Ước tính lượng và một số biện pháp xử lý rơm rạ ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 32a: 87-93.
- Xia H., Yu J., Wang C., Chen H., 2014. Cellulolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus armandi* larvae (Coleoptera: Curculionidae Scolytinae). *Forests*, 5: 455-465.
- Yan H., Dai Y., Zhang Y., Yan L., Liu D., 2011. Purification and characterization of an endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus cereus*. *African Journal of Biotechnology*, 10(72): 16277-16285.