

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE TỪ RUỘT GIUN ĐẤT

Trần Kim Thoa, Nguyễn Thị Thu Nguyên, Lương Hải Trân, Lê Hoàng Khiêm, Trương Văn Xạ\*

Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

\*Tác giả liên hệ: xatv@vlute.edu.vn

Ngày nhận bài: 25.03.2024

Ngày chấp nhận đăng: 07.08.2024

### TÓM TẮT

Vi khuẩn phân giải cellulose có vai trò quan trọng trong hệ sinh thái nhờ hoạt tính enzyme ngoại bào, được ứng dụng trong xử lý chất thải thực vật. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm phân lập và xác định được loài vi khuẩn trong ruột giun đất có khả năng phân hủy cellulose từ đó có thể ứng dụng vi khuẩn để phân hủy phụ phẩm trong nông nghiệp. 30 chủng vi khuẩn phân lập từ ruột giun đất với hình thái khuẩn lạc chủ yếu là màu trắng, hình tròn, tế bào hình que, Gram dương và có khả năng di động. Hoạt tính phân giải cellulose của vi khuẩn được định tính bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch. Kết quả có 53,33% số chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CMC (carboxymethyl cellulose), đường kính vòng phân giải trong khoảng 2,67-24,67mm, chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CMC mạnh nhất là NT20 (24,67 ± 1,15mm). Hoạt tính cellulase được xác định bằng phương pháp DNS. Kết quả cho thấy vi khuẩn NT20 sinh ra hàm lượng đường khử cao nhất (50,70 ± 1,01 µg/ml) so với các chủng vi khuẩn còn lại sau 48 giờ nuôi cấy. Vi khuẩn NT20 có khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải xanh đạt cao nhất ở thời điểm 10 ngày là 51,33%. Vi khuẩn NT20 có trình tự gen 16S rRNA tương đồng 100% với vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* strain HT-22-B1.

Từ khóa: cellulase, *Bacillus amyloliquefaciens*, CMCCase.

### Isolation and Selection of Bacteria Capable of Cellulose Decomposition from Earthworm Gut

#### ABSTRACT

Cellulose-degrading bacteria play an increasingly important role in the ecosystem based on their extracellular enzyme activity, which is used for treatment of plant waste. This study aimed to identify the bacteria species in the gut of earthworms that are capable of decomposing cellulose, so that bacteria can be applied to decompose agricultural by-products. 30 bacterial strains were isolated from the gut of earthworms with colony morphology mainly white, round, rod shaped cells, gram positive and had the ability to move. Cellulolytic activity was qualified by agar well diffusion method. The results showed that 53,33% of bacterial strains were capable of degrading CMC (carboxymethyl cellulose) with the degrading ring diameter in the range of 2,67-24,67mm, bacterial strain with the strongest ability to degrade CMC was NT20 (24,67 ± 1,15mm). Bacterial cellulase activity was determined by DNS method. The result showed that bacterial strain NT20 had the ability to produce the highest reducing sugar content (50,70 ± 1,01 µg/ml) compared to the remaining bacterial strains after 48 hours of culture. NT20 bacteria had the ability to decompose 51,33% of green vegetable by-products within 10 days. The 16S rRNA gene sequence of bacterial strain NT20 was 100% similar to *Bacillus amyloliquefaciens* strain HT-22-B1.

Keywords: Cellulase, *Bacillus amyloliquefaciens*, CMCCase.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nông nghiệp là ngành kinh tế quan trọng của Việt Nam. Bên cạnh sản lượng rau màu tăng, chất thải từ rau màu cũng tăng lên như cành, lá, thân... hầu hết bị thải bỏ hoặc xử lý

bằng cách đốt gây lãng phí và ảnh hưởng nghiêm trọng tới môi trường. Theo Huang & cs. (2013) chất thải rau màu là một trong những loại chất thải nông nghiệp có thể bị phân hủy tạo ra mùi hôi và gây ra nhiều vấn đề môi trường khác nhau. Cellulose là một trong

những thành phần chủ yếu có trong chất thải rau màu. Tuy cấu trúc cellulose bền vững nhưng lại bị thủy phân dễ dàng bởi enzyme cellulase do vi sinh vật tiết ra (Juturu & Wu, 2014). Sử dụng vi khuẩn có khả năng sinh ra enzyme ngoại bào để xử lý chất thải hữu cơ chứa cellulose là biện pháp mang lại nhiều lợi ích về kinh tế và môi trường (Võ Văn Phước Quê & Cao Ngọc Diệp, 2011).

Giun đất thuộc nhóm động vật quan trọng trong hệ sinh thái đất, nguồn thức ăn quan trọng của giun đất chủ yếu là thực vật (Brown & cs., 2004). Ruột giun đất chứa hệ vi khuẩn phong phú mang lại nhiều lợi ích trong quá trình tiêu hóa cellulose. Một số vi khuẩn trong ruột giun đất như *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. có khả năng sinh ra enzyme cellulase với hoạt tính cao và có vai trò làm tăng khả năng tiêu hóa cellulose của giun đất (Fujii & cs., 2012, Jyotsna & cs., 2010; Mai Thi & cs., 2017; Dey & cs., 2018). Vi khuẩn *Bacillus pumilus* từ ruột giun đất có vai trò quan trọng giúp phân hủy chất thải hữu cơ (Shankar & cs., 2021). Bên cạnh đó, vi khuẩn trong ruột giun đất có tiềm năng ứng dụng làm phân bón sinh học hiệu quả, vừa mang lại lợi ích cho cây trồng vừa làm giảm ô nhiễm môi trường do chất hữu cơ thực vật gây ra (Banerjee & cs., 2019). Nghiên cứu của Yang & cs. (2023) cho thấy rằng trong đường ruột giun đất chứa hệ vi sinh vật phong phú có vai trò chủ yếu trong việc phân giải cellulose, sự hiện diện của chúng trong ruột giun đất bản địa giúp sự phân hủy cellulose nhanh hơn. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm tìm ra các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ ruột giun đất là cần thiết, từ đó có thể ứng dụng chủng vi khuẩn có tiềm năng phân hủy cellulose

mạnh để xử lý nguồn chất thải từ rau màu góp phần xây dựng nền nông nghiệp xanh bền vững.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu, thời gian và địa điểm

Mẫu 10 con giun đất thuộc nhóm Endogeic thu được ở tầng đất mặt, nơi tập trung các phụ phẩm từ rau màu sau thu hoạch ở xã Ngãi Tứ và Long Phú thuộc huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long.

Nghiên cứu được thực hiện trong khoảng thời gian từ tháng 6/2023 đến tháng 2/2024 tại khoa Khoa học Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Giải phẫu giun đất và phân lập vi khuẩn trong ruột giun đất

Những mẫu giun đất sống thu được dưới lớp chất thải rau màu có kích thước đồng đều (85-120mm), trọng lượng từ 0,75-2,0g (Hình 1). Các mẫu giun đất sau khi thu, được mang về phòng thí nghiệm và thực hiện giải phẫu thu đường ruột theo Hijam & cs. (2020). Sau khi đã trộn mẫu đường ruột của 10 con giun thu được tại mỗi địa điểm, lấy 1g mẫu đường ruột pha loãng với 9ml dung dịch NaCl khử trùng (0,85%). Trộn đều hỗn hợp bằng máy trộn Vortex trong 5 phút. Sau đó, trải đều 30 $\mu$ l mẫu dung dịch được pha loãng ở nồng độ thích hợp trên đĩa thạch chứa môi trường CMC 1% để sàng lọc các chủng có khả năng tổng hợp enzyme cellulase ngoại bào. Các đĩa được ủ ở 28  $\pm$  2 $^{\circ}$ C trong 48 giờ (Banerjee & cs., 2019). Các khuẩn lạc đơn phát triển trên môi trường CMC được chọn để cấy rìa cho đến khi thu được khuẩn lạc thuần và lưu trữ vi khuẩn thuần trên thạch nghiêng CMC vô trùng ở 4 $^{\circ}$ C.



Hình 1. Mẫu giun đất được sử dụng trong thí nghiệm

### 2.2.2. Quan sát đặc điểm của vi khuẩn

Các đặc tính về hình thái khuẩn lạc (màu sắc, kích thước, độ nổi, dạng bìa, bề mặt), các đặc tính về tế bào (hình dạng, kích thước, nhuộm Gram và tính di động) của vi khuẩn được thực hiện theo phương pháp của Cao Ngọc Diệp & Nguyễn Hữu Hiệp (2002).

### 2.2.3. Xác định khả năng phân giải carboxymethyl cellulose của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn phân lập được khảo sát khả năng phân giải CMC bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch. Dựa theo phương pháp của Hijam & cs. (2020) trong nghiên cứu này có điều chỉnh, cụ thể như sau: từ 1 khuẩn lạc của mỗi chủng vi khuẩn được nuôi trong 5ml môi trường LB, sau 24 giờ nuôi cấy, huyền phù vi khuẩn được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút để thu phần dung dịch. Sau đó, chuyển 10 $\mu$ l dung dịch sau ly tâm của mỗi chủng vi khuẩn vào các giếng (đường kính 7mm) trên môi trường thạch CMC 1% (w/v) và ủ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Xác định đường kính vòng phân giải CMC bằng cách cho ngập dung dịch lugol (1%) vào đĩa petri trong 15 phút, sau đó rửa lại với dung dịch NaCl 1M. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi chủng vi khuẩn. Hoạt tính cellulase của các chủng vi khuẩn được thể hiện thông qua khả năng tạo vòng phân giải xung quanh giếng thạch được xác định bởi công thức  $A = D - d$  (Nguyễn Ngọc Ân & cs., 2019), trong đó: A: Khả năng phân giải (mm), D: đường kính vòng phân giải (mm); d: đường kính giếng thạch (mm)). Phân loại hoạt tính enzyme theo chỉ tiêu của Nguyễn Thị Thúy Nga & cs. (2015):

$A < 10\text{mm}$ : Khả năng phân hủy cellulose yếu

$15\text{mm} > A > 10\text{mm}$ : Khả năng phân hủy cellulose trung bình

$20\text{mm} > A \geq 15\text{mm}$ : Khả năng phân hủy cellulose khá

$A \geq 20\text{mm}$ : Khả năng phân hủy cellulose mạnh.

### 2.2.4. Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS (Acid dinitrosalicylic)

Nguyên tắc: chất thử axit 3,5-dinitrosalicylic (DNS) có màu vàng khi cho phản ứng với sản

phẩm thủy phân CMC (đường khử) sẽ tạo ra hỗn hợp màu cam hấp thụ cực đại ở bước sóng 540nm và có cường độ tỉ lệ thuận với lượng đường khử được tạo ra.

Vi khuẩn được chọn ở mục 2.2.3 được nuôi trong 20ml môi trường lỏng CMC 1%, lắc ở tốc độ 125 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Quy trình được thực hiện tương tự với nghiệm thức đối chứng âm nhưng không chủng vi khuẩn. Ở các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ nuôi cấy, mẫu được thu để xác định hàm lượng đường khử. Môi trường nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Thu dịch nổi và sử dụng như enzyme thô để xác định hoạt tính cellulase. 1ml dịch enzyme được chuyển vào ống nghiệm chứa 3ml thuốc thử DNS. Đun sôi cách thủy các ống nghiệm trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp được để nguội ở nhiệt độ phòng trong thời gian 5 phút. Lượng đường khử được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 540nm (Bernfeld, 1955). Glucose với nồng độ từ 0 đến 1 mg/ml được sử dụng để dựng đường chuẩn. Từ phương trình đồ thị đường chuẩn  $y = 0,9922x + 0,0107$  ( $R^2 = 0,992$ ) ta tính được lượng đường khử trong 1ml dịch enzyme thô.

### 2.2.5. Khảo sát khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải xanh (Brassica juncea)

Xác định khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải xanh của vi khuẩn dựa trên khả năng làm giảm khối lượng phụ phẩm sau khi ủ với vi khuẩn. Phụ phẩm rau cải xanh được cắt thành những đoạn dài 3cm sau khi sấy khô đến khối lượng không đổi và bổ sung 1% w/v vào trong bình tam giác có chứa 49ml nước cất đã khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Bổ sung 1ml dịch huyền phù vi khuẩn mật số  $10^9$  CFU/ml. Nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn là đối chứng âm. Sau khi ủ trong 5 ngày và 10 ngày tiến hành thu khối lượng phụ phẩm còn lại sau thí nghiệm bằng cách lọc toàn bộ hỗn hợp qua giấy lọc và tiến hành sấy khô đến khối lượng không đổi và so sánh với lượng cơ chất ban đầu theo công thức:  $M = m_1 - m_2$ . Trong đó: M (g) là khối lượng phụ phẩm bị phân giải;  $m_1$  (g) là khối lượng phụ phẩm ban đầu sau khi đã sấy khô;  $m_2$  (g) là khối lượng phụ phẩm sau khi sấy khô (Trần Hoàng Dũng & cs., 2018).

### 2.2.6. Phương pháp định danh vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA

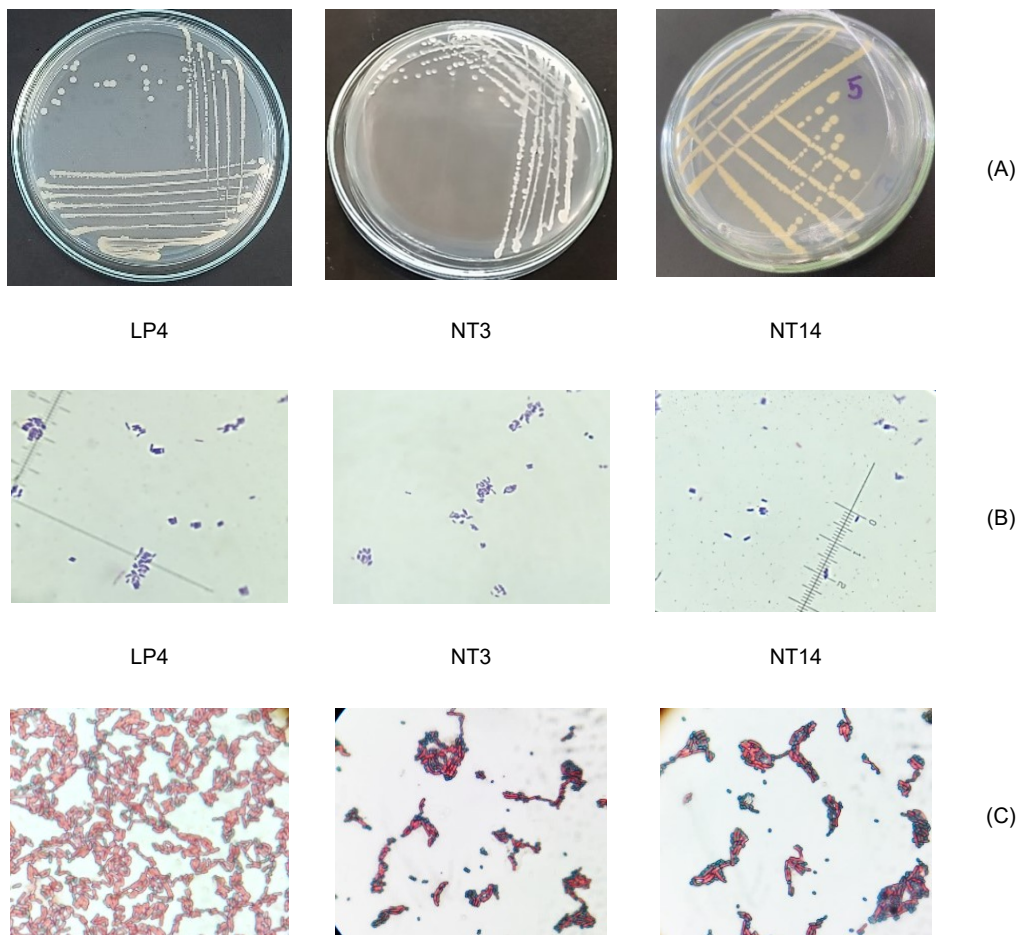
Chủng vi khuẩn có hoạt tính enzyme cellulase mạnh nhất được chọn để tách chiết DNA và khuếch đại vùng gen 16S rRNA với cặp mồi có trình tự như sau 27F: 5'-AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3' và 1492R: 5'-GGTTACCTG TTACGACTT-3' (Barker & cs., 2003).

Kết quả giải trình tự vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn được so sánh với các trình tự gen của vi khuẩn đã công bố trên ngân hàng gen National Center for Biotechnology Information bằng công cụ BLAST-N (<https://ncbi.nlm.nih.gov>). Tỷ lệ tương đồng với các trình tự trên cơ sở dữ liệu là cơ sở để định danh vi khuẩn. Trình tự gen 16S

rRNA của vi khuẩn được chọn định danh và trình tự gen từ ngân hàng gen của các vi khuẩn có mức độ tương đồng cao nhất trong kết quả tìm kiếm bằng công cụ BLAST được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài theo phương pháp Neighbor joining với độ lặp lại 1.000 lần trên phần mềm MEGA 11 (Kumar & cs., 2004).

### 2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức theo phương pháp phân tích ANOVA một nhân tố với phép thử Duncan bằng phần mềm thống kê SPSS 26.0 ở mức ý nghĩa 5%.



Ghi chú: Các hình ở hàng A: Khuẩn lạc vi khuẩn; Các hình ở hàng B: Tế bào vi khuẩn gram dương bắt màu tím của crystal violet; Các hình ở hàng C: bào tử vi khuẩn bắt màu xanh lá cây của malachite green, tế bào dinh dưỡng bắt màu hồng của safranine, ở độ phóng đại 1.000 lần).

**Hình 2. Đặc điểm về khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn phân lập**

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập vi khuẩn trong ruột giun đất

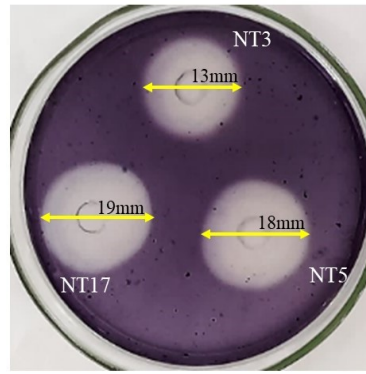
Kết quả có tổng cộng 30 chủng vi khuẩn được phân lập từ ruột giun đất thu ở hai địa

điểm Long Phú và Ngải Tứ. Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn phân lập được đều có hình tròn, đường kính khuẩn lạc từ 0,5-2,5mm. Các đặc điểm khác về hình thái khuẩn lạc như màu sắc, độ nổi, dạng bìa, bề mặt của khuẩn lạc và một số đặc tính của tế bào được mô tả ở bảng 1, hình 2.

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và đặc điểm tế bào của 30 chủng vi khuẩn phân lập được**

Chủng	Đặc điểm khuẩn lạc				Đặc điểm tế bào	
	Màu sắc	Độ nổi	Dạng bìa	Bề mặt	Hình dạng	Kích thước ( $\mu\text{m}$ )
LP1	Trắng sữa	Phẳng	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	1,25 × 2,75
LP2	Trắng sữa	Nổi	Răng cưa	Ướt nhẵn	Que	0,62 × 2,50
LP3	Trắng sữa	Phẳng	Nguyên	Khô nhẵn	Que	1,87 × 2,75
LP4	Trắng đục	Phẳng	Nguyên	Khô trơn	Que	0,65 × 2,09
LP5	Trắng đục	Nổi	Răng cưa	Ướt nhẵn	Cầu	0,80 × 0,80
LP6	Trắng sữa	Phẳng	Nguyên	Ướt trơn	Cầu	0,55 × 0,55
LP7	Trắng sữa	Nổi	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	0,85 × 1,25
LP8	Trắng đục	Nổi	Gợn sóng	Ướt trơn	Que	1,10 × 2,50
LP9	Trắng sữa	Lõm	Răng cưa	Ướt trơn	Que	1,87 × 2,75
NT1	Trắng đục	Nổi	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	1,00 × 3,20
NT2	Trắng đục	Nhô cao	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	0,72 × 0,96
NT3	Trắng sữa	Nổi	Nguyên	Ướt trơn	Que	0,80 × 2,15
NT4	Trắng đục	Nổi	Nguyên	Ướt trơn	Cầu	0,63 × 0,63
NT5	Trắng đục	Phẳng	Nguyên	Khô nhẵn	Que	1,25 × 2,75
NT6	Trắng đục	Lõm	Nguyên	Ướt trơn	Que	1,10 × 3,20
NT7	Trắng đục	Phẳng	Răng cưa	Khô nhẵn	Cầu	0,55 × 0,55
NT8	Trắng ngà	Nổi	Nguyên	Khô trơn	Que	0,93 × 2,18
NT9	Hồng nhạt	Nổi	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	0,85 × 1,25
NT10	Trắng trong	Nổi	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	0,85 × 2,23
NT11	Trắng trong	Phẳng	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	1,15 × 2,50
NT12	Trắng ngà	Nổi	Nguyên	Ướt trơn	Que	1,25 × 3,25
NT13	Vàng nhạt	Phẳng	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	1,35 × 3,30
NT14	Vàng nhạt	Nổi	Nguyên	Ướt trơn	Que	0,78 × 2,25
NT15	Trắng ngà	Phẳng	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	1,20 × 2,50
NT16	Hồng	Nổi	Nguyên	Ướt trơn	Que	0,50 × 1,27
NT17	Hồng	Nổi	Nguyên	Khô nhẵn	Que	0,75 × 1,35
NT18	Hồng	Phẳng	Răng cưa	Ướt trơn	Que	1,87 × 2,85
NT19	Trắng ngà	Nổi	Răng cưa	Ướt nhẵn	Que	0,70 × 2,50
NT20	Trắng đục	Nổi	Răng cưa	Khô nhẵn	Que	0,93 × 2,18
NT21	Trắng ngà	Nổi	Nguyên	Ướt nhẵn	Que	1,25 × 3,25

Ghi chú: NT: Ngải Tứ, LP: Long Phú.



**Hình 3. Đường kính vòng phân giải CMC của các chủng vi khuẩn**

**Bảng 2. Hoạt tính enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn thể hiện qua đường kính vòng phân giải CMC**

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng phân giải CMC (mm)
LP3	2,67 <sup>g</sup> ± 1,53
NT2	3,67 <sup>fg</sup> ± 2,08
NT11	4,67 <sup>efg</sup> ± 2,08
NT7	5,00 <sup>efg</sup> ± 2,00
LP9	5,33 <sup>efg</sup> ± 1,53
NT15	6,00 <sup>efg</sup> ± 1,73
NT18	7,33 <sup>def</sup> ± 1,53
NT13	8,33 <sup>cde</sup> ± 2,08
NT14	9,00 <sup>cde</sup> ± 2,00
NT1	11,33 <sup>cd</sup> ± 2,52
NT3	12,33 <sup>c</sup> ± 3,51
NT5	17,67 <sup>b</sup> ± 3,51
NT17	18,67 <sup>b</sup> ± 3,51
NT21	19,17 <sup>b</sup> ± 2,84
NT9	20,33 <sup>b</sup> ± 1,15
NT20	24,67 <sup>a</sup> ± 1,15

*Ghi chú: Các giá trị trung bình theo sau có các ký tự chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.*

Khuẩn lạc màu trắng chiếm 80% gồm có trắng đục, trắng trong, trắng sữa và trắng ngà, khuẩn lạc màu vàng nhạt chiếm 6,67%, màu hồng chiếm 13,33%, bìa khuẩn lạc có dạng bìa nguyên chiếm 76,67%. Tất cả vi khuẩn phân lập được đều là Gram dương, có khả năng di động, các tế bào vi khuẩn nằm riêng lẻ. Tế bào hình que chiếm 86,67%, còn lại là hình cầu. Kích thước tế bào dao động trong khoảng 0,5-1,87µm × 0,55-3,25µm. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Mai Thi & cs. (2017) cho thấy vi

khuẩn phân lập được từ ruột trùn đất đều có khuẩn lạc dạng hình tròn, màu trắng chiếm 88%, khuẩn lạc có dạng bìa nguyên chiếm 90%.

### 3.2. Kết quả khảo sát khả năng phân giải carboxymethyl cellulose của vi khuẩn

Khả năng phân hủy CMC của 30 chủng vi khuẩn được đánh giá bằng phương pháp giếng thạch. Sau khi ủ các đĩa chứa dịch vi khuẩn ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ cho thấy 16 chủng

vi khuẩn có khả năng phân giải CMC chiếm 53,33% trong tổng số 30 vi khuẩn phân lập được, đường kính vòng phân giải từ 2,67-22,83mm (Hình 3, Bảng 2). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Mai Thi & cs. (2017), khi khảo sát khả năng phân hủy CMC của vi khuẩn phân lập từ ruột trùn đất thu thập ở đồng rơm ở Hậu Giang và Sóc Trăng với đường kính vòng phân giải từ 3,00mm đến 23,80mm.

Trong số 16 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CMC, có 9 chủng vi khuẩn tạo vòng phân giải CMC ở mức yếu (LP3, NT7, NT2, NT11, LP9, NT15, NT13, NT18, NT14) chiếm 56,25%, 3 chủng vi khuẩn tạo vòng phân giải CMC ở mức trung bình (NT1, NT3) chiếm 12,5%, 3 vi khuẩn tạo vòng phân giải CMC ở mức khá (NT5, NT17, NT21) chiếm 18,75%, hai chủng vi khuẩn tạo vòng phân giải CMC ở mức mạnh (NT20, NT9) chiếm 12,5%. Trong đó, chủng vi khuẩn NT20 tạo ra vòng phân giải CMC lớn nhất là 24,67mm. So với một số kết quả nghiên cứu về vi khuẩn phân giải cellulose thì vi khuẩn NT20 có khả năng tạo vòng phân giải CMC cao hơn vi khuẩn *Bacillus pumilus* EWBCM1, vi khuẩn 6NH14 (20,5mm) và vi khuẩn PV<sub>41</sub> (24,5mm) (Shankar & cs., 2011, Nguyễn Thị Thu Thủy & cs., 2018; Nguyễn Ngọc Trúc Ngân & Phạm Thị Ngọc Lan, 2014). Theo kết quả phân tích thống kê, 5 chủng có khả năng phân giải CMC từ mức khá trở lên (NT5, NT17, NT21, NT20, NT9) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các vi khuẩn còn lại nên được chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3. Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS

Lượng đường khử được tạo ra thông qua quá trình cơ chất CMC được phân cắt bởi enzyme CMCase có trong dịch enzyme thô của các chủng vi khuẩn nuôi cấy ở 3 thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Kết quả xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS được thể hiện ở bảng 3. Hàm lượng đường khử ở các nghiệm thức của các chủng vi khuẩn NT5, NT21, NT9 và NT20 đạt cao nhất ở thời điểm 48 giờ. Có thể do sự sinh

trưởng của vi khuẩn ở 48 giờ đạt cực đại nên lượng enzyme sinh ra nhiều. Đến thời điểm 72 giờ, ở các nghiệm thức đều có hàm lượng đường khử giảm, có thể do dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy giảm nên làm giảm sự sản sinh enzyme của vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu về enzyme cellulase của vi khuẩn *B. subtilis* TH-VK24 sinh ra cho thấy hoạt tính đạt cao nhất ở thời điểm 48 giờ nuôi ủ với cơ chất CMC và ở thời điểm 60 giờ nuôi ủ thì hoạt tính enzyme giảm mạnh (Nguyễn Ngọc Ấn & cs., 2019).

Hàm lượng đường khử cao nhất được tạo ra bởi vi khuẩn NT20 ở 48 giờ là 50,70 µg/ml. Kết quả này thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Mai Thi & cs. (2017) về khả năng phân giải cellulose của vi khuẩn từ giun đất thu ở đồng rơm, với hàm lượng đường khử đạt cao nhất là 63,1 µg/ml ở thời điểm 48 giờ. Có thể do chủng vi khuẩn khác nhau nên khả năng sinh ra enzyme cũng khác nhau. Trong phạm vi của nghiên cứu này thì vi khuẩn NT20 đã có khả năng tạo ra lượng đường khử cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các chủng vi khuẩn còn lại. Tuy nhiên, vi sinh vật có khả năng phân hủy CMC mạnh không có nghĩa là chúng có khả năng phân hủy mạnh phụ phẩm nông nghiệp (Nguyễn Ngọc Quỳnh & cs., 2022). Vì vậy, 5 chủng vi khuẩn tiếp tục được khảo sát khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải xanh.

### 3.4. Khảo sát khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải xanh (*Brassica juncea*)

Các chủng vi khuẩn NT5, NT21, NT17, NT9 và NT20 có khả năng phân hủy CMC được tiến hành khảo sát khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải xanh. Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải xanh ở các mức khác nhau và cao hơn đối chứng (Bảng 4).

Bảng 4 cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn giúp quá trình làm giảm khối lượng phụ phẩm nhanh hơn so với khi không có chủng vi khuẩn. Cụ thể, ở hai thời điểm 5 ngày và 10 ngày sau khi ủ với vi khuẩn thì nghiệm thức ở chủng vi khuẩn NT20 có khả năng phân hủy cao nhất lần lượt là



41,20% và 51,33% khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Trong đó, chúng tôi thấy rằng trong 5 chủng vi khuẩn ở Bảng 4 thì chủng vi khuẩn NT20 là chủng ổn

định nhất với khả năng phân hủy CMC, hàm lượng đường khử và khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải xanh đều cao nhất. Do đó, chủng vi khuẩn NT20 được chọn để định danh loài.

**Bảng 3. Hàm lượng đường khử được sinh ra bởi 5 chủng vi khuẩn nuôi ở thời điểm 24, 48 và 72 giờ**

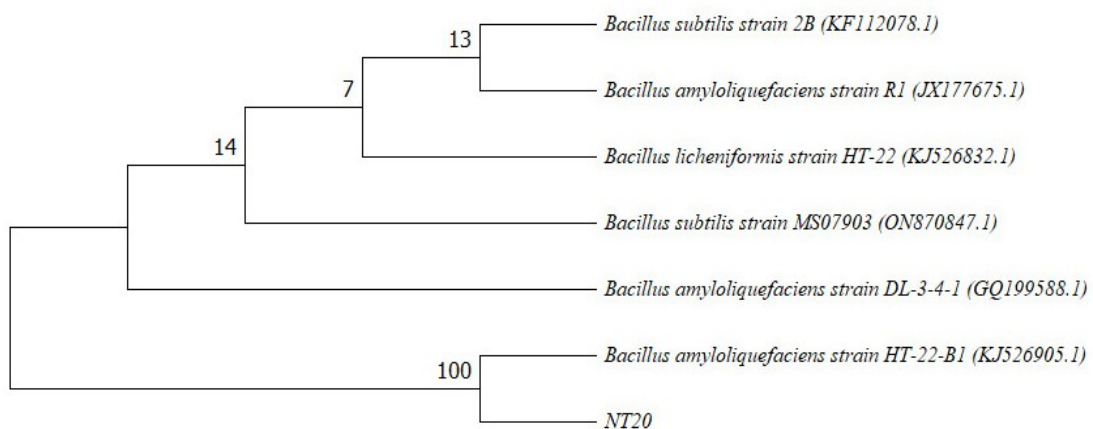
Chủng vi khuẩn	Hàm lượng đường khử (µg/ml)		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
NT5	29,86 <sup>d</sup> ± 2,33	34,57 <sup>d</sup> ± 2,02	15,76 <sup>c</sup> ± 1,16
NT21	36,59 <sup>bc</sup> ± 1,01	43,98 <sup>b</sup> ± 3,08	16,43 <sup>bc</sup> ± 0,00
NT17	38,16 <sup>b</sup> ± 0,74	37,26 <sup>cd</sup> ± 1,54	12,73 <sup>d</sup> ± 2,54
NT9	34,57 <sup>c</sup> ± 2,02	40,28 <sup>bc</sup> ± 3,08	18,78 <sup>b</sup> ± 1,16
NT20	41,29 <sup>a</sup> ± 1,54	50,70 <sup>a</sup> ± 1,01	23,15 <sup>a</sup> ± 1,54
Đối chứng	0,64 <sup>e</sup> ± 0,35	0,23 <sup>e</sup> ± 0,12	0,30 <sup>e</sup> ± 0,20

Ghi chú: Các giá trị trung bình theo sau có các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

**Bảng 4. Khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải ở thời điểm 5, 10 ngày sau khi ủ với vi khuẩn**

Chủng vi khuẩn	m1 (g)	5 ngày ủ			10 ngày ủ		
		m2 (g)	M (g)	M/m1 (%)	m2 (g)	M (g)	M/m1 (%)
NT5	0,5	0,33 ± 0,01	0,17 ± 0,01	34,40 <sup>bc</sup> ± 1,40	0,30 ± 0,00	0,20 ± 0,00	39,73 <sup>c</sup> ± 0,95
NT21	0,5	0,31 ± 0,01	0,19 ± 0,01	37,07 <sup>b</sup> ± 1,81	0,28 ± 0,01	0,22 ± 0,01	44,60 <sup>b</sup> ± 1,56
NT17	0,5	0,35 ± 0,02	0,15 ± 0,02	30,60 <sup>c</sup> ± 3,27	0,31 ± 0,01	0,19 ± 0,01	37,27 <sup>c</sup> ± 2,20
NT9	0,5	0,37 ± 0,02	0,13 ± 0,02	25,80 <sup>d</sup> ± 3,14	0,35 ± 0,00	0,15 ± 0,00	30,07 <sup>d</sup> ± 0,83
NT20	0,5	0,29 ± 0,01	0,21 ± 0,01	41,20 <sup>a</sup> ± 1,25	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01	51,33 <sup>a</sup> ± 2,41
Đối chứng	0,5	0,46 ± 0,01	0,04 ± 0,01	7,93 <sup>a</sup> ± 1,10	0,46 ± 0,00	0,04 ± 0,00	8,78 <sup>e</sup> ± 0,64

Ghi chú: Các giá trị trung bình theo sau có các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.



**Hình 4. Cây phát sinh loài của vi khuẩn NT20 dựa trên trình tự gen 16S rRNA**



### 3.5. Định danh vi khuẩn

Kết quả giải trình tự DNA: Mẫu DNA vi khuẩn đã tinh sạch từ sản phẩm PCR được giải trình tự tại công ty Sinh hóa Phù Sa. Kết quả giải trình tự của vi khuẩn NT20 được so sánh độ tương đồng với dữ liệu gen trên ngân hàng NCBI và lựa chọn những loài có trình tự tương đồng cao để xác định loài. Chủng vi khuẩn NT20 có độ tương đồng 100% với trình tự của các loài *Bacillus amyloliquefaciens* dòng HT-22-B1, *B. subtilis* dòng MS07903, *B. licheniformis* dòng HT-22, *B. subtilis* dòng 2B, *B. amyloliquefaciens* dòng R1 và *B. amyloliquefaciens* dòng DL-3-4-1.

Kết quả này tương tự với nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose phân lập từ con tằm (*Bombyx mori*) và ruột giun đất, chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất đều là vi khuẩn *Bacillus* sp. (Li & cs., 2023, Mai Thi & cs., 2017). Dựa trên trình tự gen 16S rRNA cây phát sinh loài được xây dựng trên phần mềm Mega 11 để phân tích mối quan hệ gần gũi của chủng NT20 với các loài vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* dòng HT-22-B1, *B. subtilis* dòng MS07903, *B. licheniformis* dòng HT-22, *B. subtilis* dòng 2B, *B. amyloliquefaciens* dòng R1 và *B. amyloliquefaciens* dòng DL-3-4-1 (Hình 4).

Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn NT20 có quan hệ gần gũi nhất và thể hiện mức độ tin cậy cao với loài *Bacillus amyloliquefaciens* strain HT-22-B1. Vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* có khuẩn lạc hình tròn, màu trắng, bề mặt khuẩn lạc khô, lồi và sần sùi, khuẩn lạc bám chắc vào thạch khi phát triển trong 48 giờ và có nhiều đặc tính quý, trong đó có sản xuất enzyme phân hủy cellulose (Trịnh Thành Trung & cs., 2013). Đặc điểm này hoàn toàn phù hợp với chủng vi khuẩn NT20. Theo Mei & cs. (2020) vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* là chủng có hiệu suất phân hủy lignin mạnh đạt 28,55% ở thời điểm 15 ngày ủ vi khuẩn với phụ phẩm cây thuốc lá, có tiềm năng sử dụng để ủ phân hữu cơ từ phụ phẩm cây thuốc lá. Ngoài ra, vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có khả năng ứng dụng làm chất kích thích tăng trưởng thực vật, kiểm soát

sinh học bệnh trên cây trồng, sản xuất enzyme và kháng sinh (Ngalimat & cs., 2021).

## 4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu giun đất thu được ở tỉnh Vĩnh Long, đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn có sự phát triển tốt và đa dạng về hình thái khuẩn lạc. Trong đó, 16 chủng có khả năng phân giải CMC trên môi trường thạch với đường kính vòng phân giải cao nhất là 24,67mm. Chủng vi khuẩn NT20 có khả năng tổng hợp enzyme cellulase cao, lượng đường khử sinh ra đạt cao nhất là 50,70 µg/ml ở thời điểm 48 giờ và khả năng phân hủy phụ phẩm rau cải xanh đạt 51,33% ở thời điểm 10 ngày. Trình tự 16S rRNA của vi khuẩn NT20 có độ tương đồng 100% và có mối quan hệ loài gần nhất với loài *Bacillus amyloliquefaciens* strain HT-22-B1.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barker G.C., Smith J.J. & Cowan D.A. (2003). Review and reanalysis of domain specific 16S primers. *Journal of Microbiological Method.* 55: 541-555.
- Banerjee A., Biswasa J.K., Pant D., Sarkar B., Chaudhuri P., Rai M., Meers E. (2019). Enteric bacteria from the earthworm (*Metaphire posthuma*) promote plant growth and remediate toxic trace elements. *Journal of Environmental Management.* 15(250): 109530. doi: 10.1016/j.jenvman. 2019.109530.
- Bernfeld P. (1955). Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology.* 1: 149-158.
- Brown G.G. & Doube B.M. (2004). Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants. In: Edwards C. A., ed. *Earthworm ecology.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC. pp. 213-239.
- Cao Ngọc Diệp & Nguyễn Hữu Hiệp (2002). *Giáo trình vi sinh vật chuyên sâu.* Trường Đại học Cần Thơ.
- Dey K.K., Talukdar N.C., Nongkhlaw F.M.W. & Thakuria D. (2018). Isolation, characterization and practical significance of cellulose degrading bacteria from the gut wall of two ecologically distinct earthworms. *Current Science.* 114(7): 1474-1484.
- Fujii K., Ikeda K. & Yosida S. (2012). Isolation and characterization of aerobic microorganisms with cellulolytic activity in the gut of endogeic earthworms. *International microbiology.* 15: 121-130.

- Hijam S.D., Goyari S., Thokchom E., Kalita M.C. & Talukdar N.C. (2020). Identification and determination of cellulase activity of cellulose degrading microorganisms from earthworm species of different habitats of North East India. *Indian Journal of Biotechnology*. 19: 192-205.
- Huang K., Li F., Wei Y., Chen X. & Fu X. (2013). Changes of bacterial and fungal community compositions during vermicomposting of vegetable wastes by *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology*. 150: 235-241.
- Juturu V. & Wu J.C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33: 188-203.
- Jyotsna K.P., Vijayalakshmi K., Prasanna N.D. & Shaheen S.K. (2010). Isolation, characterization of cellulase producing *Lysinibacillus sphaericus* MTCC No. 9468 from gut of *Eisenia foetida*. *Bioscan*. 6(2): 325-327.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings In Bioinformatics*. 5(2): 150-163.
- Li H., Zhang M., Zhang Y., Xu X., Zhao Y., Jiang X., Zhang R. & Gui Z. (2023). Characterization of Cellulose-Degrading Bacteria Isolated from Silkworm Excrement and Optimization of Its Cellulase Production. *Polymers*. 15(20): 4142. Doi: 10.3390/polym15204142.
- Mai Thi, Nguyễn Hữu Hiệp & 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.
- Mei J., Shen X., Gang L., Xu H., Wu F. & Sheng L. (2020). A novel lignin degradation bacteria - *Bacillus amyloliquefaciens* SL - 7 used to degrade straw lignin efficiently. *Bioresource Technology*. 310: 123445. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123445.
- Ngalimat M.S., Yahaya R.S.R., Baharudin M.M.A.A., Yaminudin S.M., Karim M., Ahmad S.A., & Sabri S. (2021). A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*. 9(3): 614. doi: 10.3390/microorganisms9030614.
- Nguyễn Ngọc Ân, Nguyễn Mộc Tấn, Nguyễn Trung Thế Hiển, Nguyễn Thị Diệu Hạnh & Phạm Tấn Việt (2019). Phân lập và khảo sát điều kiện sinh tổng hợp cellulase của hai chủng vi khuẩn TH-VK22 và TH-VK24. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. 39(3): 247-259.
- Nguyễn Thị Thuý Nga, Phạm Quang Nam, Lê Xuân Phúc, Phạm Quang Thu & Nguyễn Minh Chí (2015). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn phân giải xenlulo sản xuất phân hữu cơ sinh học. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*. 2: 3841-3850.
- Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Tiến Long & Trần Thanh Đức (2018). Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose để sản xuất phân hữu cơ vi sinh. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 127(3A): 117-127.
- Nguyễn Ngọc Quỳnh, Lương Hữu Thành, Vũ Thúy Nga, Đàm Trọng Anh, Vũ Tiến Đức, Đàm Thị Huyền & Nguyễn Văn Thiết (2022). Phân lập tuyển chọn xạ khuẩn ứng dụng trong xử lý rơm rạ trên đồng ruộng tại vùng trồng lúa ven đô thành phố Hà Nội. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 5(138): 44-50.
- Shankar T., Sankaralingam S., Balachandran C., Chinnathambi A., Nasif O., Ali S., Alharbi S.A., Park S. & Baskar K. (2021). Purification and characterization of carboxymethylcellulase from *Bacillus pumilus* EWBCM1 isolated from earthworm gut (*Eudrilus eugeniae*). *Journal of King Saud University - Science*. 33(1): 101261. doi: 10.1016/j.jksus.2020.101261.
- Shankar T., Mariappan V. & Isaiarasu L. (2011). Screening cellulolytic bacteria from the mid-gut of the popular composting earthworm, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg). *World Journal of Zoology*. 6(2): 142-148.
- Trịnh Thành Trung, Phan Lạc Dũng, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp & Đào Thị Lương (2013). Đặc điểm sinh học và tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sp. 1901 phân lập tại Rừng Quốc gia Hoàng Liên. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*. 29(3): 59-70.
- Trần Hoàng Dũng, Huỳnh Văn Hiếu, Trần Duy Dương & Nguyễn Thành Công (2018). Phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose mạnh phục vụ sản xuất chế phẩm phân hủy rơm rạ. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. 60(6): 32-36.
- Võ Văn Phước Quê & Cao Ngọc Điệp (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 18a: 177-184.
- Yang Y., Callaham Jr M.A., Wu X., Zhang Y., Wu D. & Wang D. (2023). Gut microbial communities and their potential roles in cellulose digestion and thermal adaptation of earthworms. *Science of The Total Environment*. 903. 166666. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.166666.