# PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN PHÂN GIẢI CELLULOSE

Võ Văn Phước Quệ và Cao Ngọc Điệp 1

#### **ABSTRACT**

The objective of the isolation of cellulolytic bacteria from paddy soil and cow-rumen is to degrade rice-straw and organic wastes to compost. Of 96 bacterial isolates from the paddy soil cultured on CMC media, only 59 isolates possess CMC hydrolyzing ability but none of them were able to break down photocopy paper. Four isolated bacteria from cow-rumen, namely Q4, Q5, Q8 and Q9 were able to produce effective extracellular enzymes (endoglucanases, exoglucanases and β-glucosidases) in anaerobic condition. In CMC media experiments, where photocopy paper or rice-straw were used as the main carbon source, these were able to degrade 53-61% of photocopy paper after 7 days and 53-55% of rice-straw after 10 days. Molecular identification of these strains based on 16S rRNA sequence showed that 3 strains Q5, Q8 and Q9 were 99-100% homogeneous to that of <u>Bacillus megaterium</u> M530013, TF10 and LAMA262 respectively; Strain Q4 had 99% similarity to that of <u>Cellulomonas flavigena</u>.

Keywords: <u>Bacillus megaterium</u>, <u>Cellulomonas flavigena</u>, cow-rumen, hydrolyzing CMC, rice-straw degradation

Title: Isolation and identification of cellulolytic bacteria

### TÓM TẮT

Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose trong đất trồng lúa và dạ cỏ bò nhằm sử dụng để phân giải rơm rạ và rác hữu cơ thành phân hữu cơ. Trong 96 dòng vi khuẩn phân lập từ đất trồng lúa trên môi trường CMC, có 59 dòng vi khuẩn có khả năng thủy phân CMC nhưng không có dòng vi khuẩn nào có khả năng phân giải giấy photocopy. Bốn dòng vi khuẩn Q4, Q5, Q8 và Q9 được phân lập từ dịch dạ cỏ bò đều có khả năng sản sinh hiệu quả enzyme cellulase ngoại bào (endoglucanases, exoglucanases và β-glucosidases) ở điều kiện kỵ khí. Khi được nuôi trong môi trường với nguồn carbon là giấy photocopy hoặc rơm rạ, cho thấy các dòng vi khuẩn này có khả năng phân giải giấy photocopy 53-61% sau 7 ngày và phân giải rơm rạ 53-55% sau 10 ngày. Phân tích di truyền phân tử dựa trên trình tự 16S rRNA cho thấy 3 dòng vi khuẩn Q5, Q8 và Q9 đồng hình 99-100% tương ứng với các dòng Bacillus megaterium M530013, TF10 và LAMA262; Dòng vi khuẩn Q4 đồng hình 99% với dòng Cellulomonas flavigena.

Từ khóa: <u>Bacillus</u> <u>megaterium</u>, <u>Cellulomonas flavigena</u>, dạ cỏ bò, phân giải rơm rạ, thủy phân CMC

## 1 GIỚI THIỆU

Khoảng một nửa hợp chất carbon trong sinh khối (biomass) trên mặt đất là cellulose, chiếm tới 35 - 50% khối lượng khô sinh khối thực vật. Tất cả sản phẩm sinh khối sẽ được khoáng hóa nhờ hệ thống enzyme được cung cấp bởi vi sinh vật. Hệ thống enzyme phân giải cellulose thường chậm và không hoàn toàn. Tuy nhiên, trong khoảng thời gian ngắn (48 giờ) hệ vi sinh vật trong dạ cỏ bò có thể phân giải

<sup>1</sup> Viện NC&PT Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

60 – 65% cellulose. Hơn thế nữa, nhờ hệ thống vi sinh vật trong đường ruột mà loài mối có thể tiêu hóa đến 90% cellulose của gỗ. Còn trong hệ thống sinh học phức tạp như rễ cây hoặc những mảnh vỡ thực vật trong đất, cellulose có thể được phân hủy trong khoảng thời gian lâu hơn (Schwarz, 2001). Hệ vi sinh vật phân giải cellulose có thể lên men hiếu khí hoặc ky khí, bình nhiệt hoặc ái nhiệt, bao gồm nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn được tìm thấy nhiều trong đất, nước, đường tiêu hóa một số động vật... nơi cung cấp lượng cellulose dồi dào để vi sinh vật phân giải và phát triển.

Đồng bằng sông Cửu Long là vùng chuyên canh cây lúa, hàng năm sinh ra một lượng rơm rạ khổng lồ. Với phế phẩm giàu cellulose này, một lượng rất ít được sử dụng để trồng nấm hay làm thức ăn gia súc, phần lớn được xử lý theo phương pháp truyền thống là đốt trực tiếp trên đồng ruộng, điều này gây ra nhiều hậu quả như góp phần ô nhiễm không khí, phá hủy hệ sinh thái đất và đất ngày càng bạc màu. Một biện pháp nhằm tận dụng rơm rạ có hiệu quả hơn đó là sử dụng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose giúp phân giải rơm rạ thành phân hữu cơ bón cho đất, góp phần cải thiện độ phì nhiêu đất. Vì vậy, đề tài "Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose" được thực hiện nhằm mục tiêu phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose từ đất trồng lúa và dạ cỏ bò, bước đầu đánh giá khả năng phân giải rơm rạ của các dòng vi khuẩn phân lập được ở điều kiện phòng thí nghiệm.

### 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIỆN CỦU

### 2.1 Nguồn phân lập vi khuẩn

Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose từ đất trồng lúa và dịch dạ cỏ bò. Đất trồng lúa được thu thập từ 8 tỉnh: Trà Vinh, Vĩnh Long, Tiền Giang, Kiên Giang, Hậu Giang, Cần Thơ, An Giang, Đồng Tháp. Dịch dạ cỏ bò được thu từ trại giết mổ Ô Môn-Cần Thơ. Mẫu thu về được trữ ở 4°C.

## 2.2 Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose

Phân lập trên môi trường với nguồn carbon là CMC: Cân 1g mẫu đất trồng lúa pha loãng với 100ml nước cất khử trùng, lắc 15 phút, sau đó hút 20μl trải đều trên môi trường CMC (Ulrich *et al.*, 2008). Ủ môi trường 2 – 3 ngày ở 30°C, tách ròng từng khuẩn lạc thu được những dòng vi khuẩn riêng biệt. Môi trường CMC gồm 1g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001g NaCl, 10g CMC, 2g Agar, thêm nước đến thể tích 1lít và điều chỉnh pH7.

Phân lập trên môi trường với nguồn carbon là giấy photocopy: Cân 1g mẫu đất trồng lúa hoặc dịch dạ cỏ bò pha loãng với 100ml nước cất khử trùng, lắc 15 phút, hút 20μl dung dịch này trải đều trên môi trường M (Lee *et al.*, 2002), sau đó dùng giấy photocopy (được khử trùng và cắt tròn có đường kính bằng với đường kính bề mặt đĩa môi trường) áp sát trên bề mặt môi trường, ủ môi trường 5-10 ngày ở 30°C cho đến khi khuẩn lạc phát triển trên bề mặt giấy, tiến hành tách ròng từng khuẩn lạc trên môi trường CMC. Môi trường M gồm: 0,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 0,1g MgCl<sub>2</sub>, 0,2g Yeast extract, 6g NaHCO<sub>3</sub>, 0,5g Cysteine-HCl, 0,25g Na<sub>2</sub>S, 0,001g Resazarin, 10ml dung dịch khoáng, 10ml dung dịch vitamin, 20g Agar, thêm nước đến thể tích 1lít và điều chỉnh pH7. Dung dịch khoáng gồm: 4,5g

Nitrilotriacetic, 0,4g FeCl<sub>2</sub>, 0,12g CoCl<sub>2</sub>, 0,01g AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 1g NaCl, 0,02g CaCl<sub>2</sub>, 0,01g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,1g MnCl<sub>2</sub>, 0,1g ZnCl<sub>2</sub>, 0,01g H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>, 0,01g CuSO<sub>4</sub>, 0,02g NiCl<sub>2</sub>, thêm nước đến thể tích 1lít. Dung dịch vitamin gồm: 2mg Biotin, 2mg Folic acid, 10mg Pyridoxine hydrochloride, 5mg Thiamine, 5mg Riboflavin, 5mg Nicotinic, 5mg Dl-calcium pantothenate, 0,1mg B12, 5mg D-amilobenzoic, 5mg Lipoic, thêm nước đến thể tích 1lít.

### 2.3 Kiểm tra khả năng thủy phân CMC của các dòng vi khuẩn

Thực hiện trên môi trường CMC, dùng que cấy nhọn lấy sinh khối các chủng vi khuẩn phân lập được và chấm lên môi trường, ủ 3 ngày ở 30°C. Sau đó đĩa môi trường được nhuộm với dung dịch Congo Red (1g/lít) trong 15 phút, cuối cùng rửa với dung dịch muối NaCl 1M. Vi khuẩn thủy phân CMC sẽ tạo vùng không màu xung quanh khuẩn lạc (halo). Công thức tính khả năng thủy phân:

(Đường kính halo – Đường kính khuẩn lạc)/Đường kính halo x 100

### 2.4 Kiểm tra khả năng phân giải giấy photocopy của các dòng vi khuẩn

Chọn những dòng vi khuẩn có khả năng thủy phân CMC, chủng nuôi trong 50ml môi trường Mfp lỏng (0,1g giấy photocopy đã xay mịn/ 50ml môi trường M). Nguồn giống chủng được nuôi trong môi trường CMC lỏng trong 3 ngày, chủng với tỉ lệ 1%. Sau 7 ngày đánh giá khả năng phân giải dựa trên khối lượng khô mất đi của giấy photocopy. Công thức tính khả năng phân giải:

(Khối lượng ban đầu – Khối lượng lúc sau)/Khối lượng ban đầu x 100

### 2.5 Đánh giá khả năng phân giải rơm rạ lúa của các dòng vi khuẩn

Tiến hành với các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải tốt giấy photocopy. Sử dụng 100ml môi trường Mrs lỏng (0,5g rơm khô/ 100ml môi trường M). Nguồn giống chủng được nuôi trong môi trường CMC lỏng trong 3 ngày, chủng với tỉ lệ 1%. Sau 10 ngày đánh giá khả năng phân giải dựa trên khối lượng khô mất đi của rơm. Công thức tính khả năng phân giải:

(Khối lượng ban đầu – Khối lượng lúc sau)/Khối lượng ban đầu x 100

## 2.6 Khảo sát hoạt tính hệ enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn

Ly trích enzyme: Chọn các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải rom rạ tốt nhất, nuôi trong 100ml môi trường Mrs nguồn carbon là rom khô, nguồn giống chủng được nuôi trong môi trường CMC trong 3 ngày, chủng với tỉ lệ 1%. Nuôi cho vi khuẩn phát triển ở điều kiện thường (30°C), sau đó hút 10ml môi trường, tiến hành ly tâm 5000 vòng trong thời gian 20 phút, loại bỏ sinh khối, lấy phần dịch trong sử dụng như dung dịch enzyme ngoại bào.

Khảo sát hoạt tính enzyme cellulase: hệ enzyme cellulase gồm endoglucanases, exoglucanases và β-glucosidases. Hoạt tính enzyme endoglucanases được đo bằng cách cho 1ml enzyme phản ứng với 1ml CMC (1% CMC trong dung dịch đệm acetate pH5) ở 40°C trong thời gian 30 phút, đo lượng đường khử sinh ra bằng phương pháp của Nelson (1944), tính hoạt tính enzyme. Hoạt tính enzyme exoglucanases: cho 1ml enzyme phản ứng với 1ml Cellulose powder (1% Cellulose powder trong dung dịch đệm acetate pH5) ở 40°C trong thời gian 2 giờ,

đo lượng đường khử sinh ra bằng phương pháp Nelson. Hoạt tính enzyme  $\beta$ -glucosidases: cho 1ml enzyme phản ứng với 1ml Cellobiose (0.2% Cellobiose trong dung dịch đệm acetate pH5) ở  $40^{\circ}$ C trong thời gian 1 giờ, đo lượng đường khử sinh ra bằng phương pháp Nelson.

Đơn vị hoạt tính enzyme (U/ml): là lượng đường khử sinh ra trong 1 phút trên 1ml enzyme ở điều kiện 40°C và pH5.

#### 2.7 Nhận diện vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

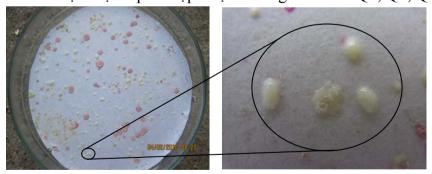
Tiến hành ly trích DNA của các dòng vi khuẩn được tuyển chọn và khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi: 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3', 1492r: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3' (Akasaka *et al.*, 2002). Sản phẩm sau khi được khuếch đại được điện di trên agarose gel 1,2% bằng bộ điện di một chiều có bổ sung thêm ethidium bromide để kiểm tra sản phẩm. Cuối cùng giải trình tự đoạn DNA được khuếch đại. Được kết quả, dùng chương trình BLAST N để so sánh trình tự đoạn DNA của dòng vi khuẩn với trình tự DNA của các loài vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI, nhận diện từng dòng vi khuẩn.

## 3 KÉT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn phân giải cellulose

Phân lập trên môi trường với nguồn carbon là CMC: Từ 15 mẫu đất trồng lúa phân lập được 96 dòng vi khuẩn, trong đó có 62 dòng vi khuẩn hiếu khí và 34 dòng vi khuẩn kỵ khí.

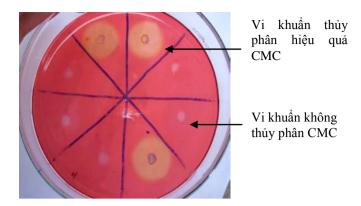
Phân lập trên môi trường với nguồn carbon là giấy photocopy: Từ mẫu đất, sau 10 ngày ủ vẫn chưa thấy sự phát triển của khuẩn lạc nào trên bề mặt giấy photocopy. Trong khi đó, từ dạ cỏ bò, môi trường được ủ trong 5 ngày đã xuất hiện khuẩn lạc, vi khuẩn phân giải làm giấy nhầy ướt và tạo khuẩn lạc mô lên trên bề mặt giấy (Hình 1). Từ 2 mẫu dịch da cỏ phân lập được 4 dòng vi khuẩn Q4, Q5, Q8 và Q9.



Hình 1: Khuẩn lạc vi khuẩn phân giải cellulose phát triển trên môi trường với cơ chất giấy photocopy

## 3.2 Kiểm tra khả năng thủy phân CMC của các dòng vi khuẩn

Từ 96 dòng vi khuẩn phân lập được từ đất trồng lúa, có 59 dòng có khả năng thủy phân CMC (12,5 - 88%) thể hiện qua vòng thủy phân không màu quanh khuẩn lạc trên môi trường CMC agar khi nhuộm với Congo Red (Hình 2). Bốn dòng vi khuẩn Q4, Q5, Q8 và Q9 phân lập từ dạ cỏ bò cũng đều có khả năng thủy phân CMC rất tốt (79,2 - 85,6%).



Hình 2: Vòng thủy phân CMC bởi các dòng vi khuẩn

### 3.3 Kiểm tra khả năng phân giải cellulose với giấy photocopy và rơm rạ

Kết quả các dòng vi khuẩn phân lập từ đất không có khả năng phân giải được cơ chất giấy photocopy. Tuy các dòng vi khuẩn này được tuyển chọn có khả năng thủy phân CMC, tức có khả năng sản sinh enzyme β-D-glucanase, nhưng để phân giải được cellulose thì cần một hệ thống các enzyme cellulase (Fields *et al.*, 1998). Vì thế các dòng có hoạt tính mạnh với CMC chưa đánh giá được khả năng phân giải cellulose.

Ngược lại, 4 dòng vi khuẩn Q4, Q5, Q8 và Q9 được phân lập từ dạ cỏ phân giải giấy photocopy rất tốt, mẫu giấy mụt ra và phần còn lại lắng ở đáy ống nghiệm (Hình 3A). Sau 7 ngày khả năng phân giải từ 53 - 61,33%, và không khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các dòng vi khuẩn (Bảng 1).

Đối với cơ chất là rơm rạ, 4 dòng vi khuẩn cũng cho thấy khả năng phân giải rất tốt, sau 10 ngày sự phân giải bởi các dòng vi khuẩn thể hiện rất rõ (Hình 3B), khả năng phân giải rơm rạ từ 53,6 – 55,93%, và không khác biệt giữa các dòng vi khuẩn (Bảng 1).



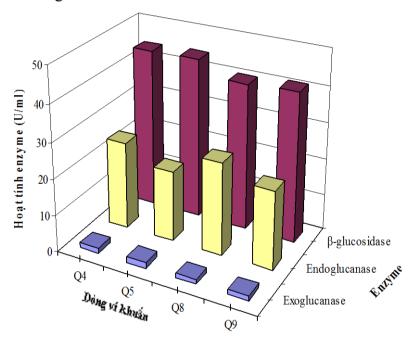
Hình 3: (A) Phân giải giấy photocopy sau 7 ngày, (B) Phân giải rơm rạ sau 10 ngày. Bên trái không chủng vi khuẩn, bên phải chủng dòng vi khuẩn Q4

Bảng 1: Khả năng phân giải giấy photocopy và rơm rạ bởi 4 dòng vi khuẩn phân lập được từ da cỏ bò

Dòng vi khuẩn	Khả năng phân giải giấy photocopy sau 7 ngày (%)	Khả năng phân giải rơm rạ sau 10 ngày (%)
Q4	55,00	55,93
Q5	58,00	53,60
Q8	61,33	54,93
<b>Q</b> 9	53,00	54,73

### 3.4 Khảo sát hoạt tính hệ enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn

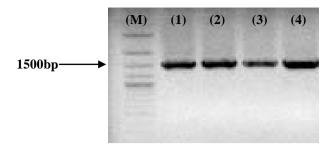
Kết quả 4 dòng vi khuẩn Q4, Q5, Q8 và Q9 đều có khả năng sản sinh enzyme endoglucanases, exoglucanases và β-glucosidases (Hình 4). Hoạt tính enzyme exoglucanases cao nhất đạt 1,31 - 1,5 U/ml, enzyme endoglucanases đạt 19,44 - 25,43 U/ml, enzyme β-glucosidases đạt 40,41 - 44,37 U/ml và không khác biệt ý nghĩa giữa bốn dòng vi khuẩn.



Hình 4: Hoạt tính enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn

### 3.5 Nhận diện vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

Sản phẩm khuếch đại của 4 dòng vi khuẩn Q4, Q5, Q8, Q9 đều có kích thước 1500bp khi điện di trên gel agarose (Hình 5). Giải trình tự các sản phẩm khếch đại và so sánh trên ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy dòng vi khuẩn Q4 đồng hình 99% với dòng vi khuẩn *Cellulomonas flavigena*, các dòng Q5, Q8 và Q9 đồng hình 99 – 100% với dòng vi khuẩn *Bacillus megaterium* (Bảng 2).



Hình 5: Gel điện di sản phẩm PCR của các dòng vi khuẩn

(M) Thang chuẩn 100bp DNA Plus, (1) Dòng vi khuẩn Q4, (2) Dòng vi khuẩn Q5, (3) Dòng vi khuẩn Q8, (4) Dòng vi khuẩn O9

Bảng 2: Mối quan hệ di truyền của các dòng vi khuẩn phân lập được

Dòng vi khuẩn	Chiều dài trình tự so sánh (nu)	Dòng vi khuẩn đồng hình	Mức độ đồng hình (%)
Q4	401	Cellulomonas flavigena	99
Q5	485	Bacillus megaterium	100
Q8	503	Bacillus megaterium	99
Q9	800	Bacillus megaterium	99

Như vậy 4 dòng vi khuẩn Q4, Q5, Q8, Q9 đều có khả năng sản sinh enzyme cellulase ngoại bào và phân giải hiệu quả rơm rạ. Nhiều nghiên cứu khác cũng đã cho thấy khả năng phân giải cellulose của các nhóm vi khuẩn này. Theo Saha (2006), *Bacillus megaterium* có tế bào hình que, Gram dương, nội bào tử và có khả năng thủy phân cellulose. Dòng vi khuẩn *Cellulomonas flavigena* cũng có tế bào hình que, Gram dương, thuộc giống *Cellulomonas*, ngành Actinobacteria, có khả năng sản sinh nhiều loại enzyme cellulase và xylanase trên cơ chất bã mía, và có thể sử dụng nhiều loại cơ chất cellulose khác (Leticia *et al.*, 2007).

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Từ đất trồng lúa không phân lập được vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose.
- Từ dịch dạ cỏ bò phân lập được 4 dòng vi khuẩn Q4, Q5, Q8 và Q9 đều có khả năng sản sinh enzyme cellulase và phân giải hiệu quả giấy photocopy và rơm rạ. Phân tích di truyền phân tử dựa trên trình tự 16S rRNA cho thấy dòng vi khuẩn Q5, Q8 và Q9 đồng hình với dòng *Bacillus megaterium*, dòng vi khuẩn Q4 đồng hình với dòng *Cellulomonas flavigena*.
- Đề nghị ứng dụng các dòng vi khuẩn này vào thực tế như sản xuất enzyme cellulase, phân giải rơm rạ và các phế phẩm cellulose khác giúp xử lý môi trường hay sản xuất phân hữu cơ...

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akasaka, H., T. Izawa, K. Ueki and A. Ueki. 2002. Phylogeny of numerically abundant culturable anaerobic bacteria associated with degradation of rice plant residue in Japanese paddy feld soil. Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka. 997-8555

- Fields, M. W., J. B. Russell and D. B. Wilson. 1998. The role of ruminal carboxymethylcellulases in the degradation of β-glucans from cereal grain. FEMS Microbiol. Ecol. 27:261–268.
- Lee, R. L., P. J. Weimer, W. H. Zyl and I. S. Pretorius. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular biology reviews. 506–577.
- Leticia, M., S. Herrera, A. Ramos and M. Salgado. 2007. Differential expression of cellulases and xylanases by Cellulomonas flavigena grown on different carbon sources. Applied Microbiology and Biotechnology. 77:0175-7598.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Bio. Chem. 153:375-380
- Saha, S., R. Roy, S. Sen and A. Ray. 2006. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, Oreochromis mossambica (Peters) and grass carp, Ctenopharyngodon idella (Valenciennes). Aquaculture Research. 37:380-388
- Schwarz, W.H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:634-649.
- Ulrich A., G. Klimke, S. Wirth. 2008. Diversity and Activity of Cellulose-Decomposing Bacteria, Isolated from a Sandy and a Loamy Soil after Long-Term Manure Application. Microb Ecol. 55:512–522