

PHÂN LẬP VI SINH VẬT TỪ DẠ DÀY BÒ ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG XỬ LÝ RÁC THẢI NÔNG NGHIỆP GIÀU CELLULOSE

LÊ HỒNG THÍA, NGUYỄN VĂN ĐOÁN, CHÂU THỊ THẢO MY, LÂM TRÚC PHƯƠNG
Viện Khoa học Công nghệ và Quản lý Môi trường, Trường đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh
lehongthia@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Hệ vi sinh vật trong dạ dày bò rất phong phú, có vai trò chính trong việc tiêu hóa các loại thức ăn giàu cellulose. Nhằm tuyển chọn các chủng vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng để phân hủy phế phẩm nông nghiệp giàu cellulose, 37 chủng vi khuẩn và 4 chủng nấm phân lập từ dạ dày bò được kiểm tra các đặc tính sinh lý và đặc điểm khuẩn lạc. Trong số đó, 18 chủng vi khuẩn và 3 chủng vi nấm có hoạt tính phân giải cellulose bằng enzyme ngoại bào khi được kiểm tra trên môi trường chứa carbomethyl cellulose (CMC). Năm chủng vi khuẩn và 2 chủng nấm có hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất, với chỉ số $D/d > 2.5$ (đường kính vòng phân giải/đường kính khuẩn lạc) đối với vi khuẩn $D/d > 1.5$ đối với nấm mốc được lựa chọn và định bằng giải trình tự vùng gen 16S rRNA và ITS, theo thứ tự. Kết quả phân tích cho thấy, các chủng K9, Db1, T8, và Db7, N1 và N2 lần lượt là *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aspergillus versicolor* và *Aspergillus terreus* với mức độ tin cậy trung bình và cao, có tiềm năng ứng dụng để sản xuất các chế phẩm vi sinh vật phân giải phế phẩm nông nghiệp giàu cellulose.
Từ khoá. 16S rRNA, cellulase, dạ dày bò, ITS, vi sinh vật phân giải cellulose.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF RUMEN CELLULOLYTIC BACTERIA FOR AGRICULTURAL BYPRODUCT BIO-DEGRADATION

Abstract. Cow rumen microbes play an important role in cellulose digestion in animal nourishment. To select potential microorganisms for cellulose bio-degradation in agricultural byproducts, thirty-seven bacteria strains and four mold strains which were isolated from the cow rumen were identified and described characteristics and physiology of colony and cells. Among them, eighty bacteria strains and three mold strains showed cellulose-degrading activities on carbomethyl cellulose (CMC) medium. Five bacteria strains and two mold strains with highest of cellulose-degrading activities, due to hydrolyzed CMC halos diameters/colony diameter > 2.5 for bacteria and > 1.5 for molds, were selected for identify by 16S rRNA or ITS, respectively, gene sequencing. The results indicated that K9, Db1, T8, và Db7, N1 and N2 strains were *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aspergillus versicolor* và *Aspergillus terreus*, respectively, with similarity index at medium and high level.

Keywords. 16S rRNA, cellulase, cellulolytic bacteria, cow rumen, ITS.

1 GIỚI THIỆU

Việt Nam là một trong những quốc gia có nền nông nghiệp phát triển. Cùng với xu hướng phát triển, hằng năm lượng phế phẩm từ quá trình chế biến các sản phẩm nông sản, thực phẩm là rất lớn, nhất là các phế phẩm giàu cellulose, với khoảng gần 900 triệu tấn [1, 2]. Lượng chất thải này đã và đang gây khó khăn cho việc xử lý, đe dọa ô nhiễm môi trường với những địa phương có thể mạnh về sản xuất nông nghiệp [3]. Bên cạnh đó, một số thói quen xử lý chất thải giàu cellulose như đốt, chôn lấp thường gây hậu quả nghiêm trọng tới môi trường đất, không khí, hệ vi sinh vật, cây trồng [4, 5].

Dạ dày của động vật nhai lại không có các tuyến tiêu hoá nhưng có vai trò rất quan trọng, không những là nơi chứa thức ăn mà ở đây còn xảy ra rất nhiều quá trình phân giải và phản ứng hoá học giúp cho việc tiêu hoá chất xơ như quá trình lên men, phân giải các chất hữu cơ, tổng hợp và hấp thu các chất dinh dưỡng [6, 7]. Khác với động vật có dạ dày đơn như lợn, ngựa, dạ dày bò có cấu tạo phức tạp gồm 4 túi: dạ cỏ, dạ tổ ong, dạ lá sách và dạ múi khế. Dạ cỏ ở trâu bò trưởng thành chiếm tới 80-90% dung tích toàn bộ dạ dày và 70-75% dung tích cơ quan tiêu hoá. Lông nhung ở thành dạ cỏ rất phát triển đã làm tăng bề mặt tiếp xúc

với thức ăn lên nhiều lần. Trong dạ cỏ trâu bò có một lượng lớn vi sinh vật bao gồm vi khuẩn, vi nấm, protozoa [8]. Từ năm 1941 cho đến nay, những công trình nghiên cứu đã cho thấy có tới hơn 200 loài vi khuẩn dạ cỏ đã được mô tả [9]. Tổng số vi khuẩn có trong dạ cỏ thường vào khoảng 10^9 - 10^{10} tế bào/g chất chứa dạ cỏ. Trong dạ cỏ vi khuẩn ở thể tự do chiếm khoảng 25-30%, số còn lại bám vào các mẫu thức ăn, trú ngụ ở các nếp gấp biểu mô và bám vào protozoa [8]. Nhờ hoạt động của hệ vi sinh vật này, thức ăn giàu cellulose được tiêu hoá và tạo thành các chất dinh dưỡng như acid béo, acid amin, vitamin [10]. Hệ vi sinh vật trong dạ dày động vật nhai lại được đánh giá có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong việc xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp giàu cellulose [11].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn những chủng vi sinh vật có hiệu quả phân giải cellulose cao phù hợp cho định hướng ứng dụng sản xuất các chế phẩm xử lý chất thải nông nghiệp giàu cellulose.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu dạ dày bò được thu nhận từ Trại giết mổ tập trung tỉnh Đồng Nai. Mẫu dạ dày được bảo quản ở 4°C trong các thùng giữ lạnh với các túi đá khô suốt trong quá trình vận chuyển. Các mẫu đưa về phòng thí nghiệm được bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C cho đến khi sử dụng để phân lập vi sinh vật và không bảo quản quá 24 giờ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phân lập vi sinh vật phân giải cellulose

Các chủng vi sinh vật trong dịch dạ dày bò được phân lập trên môi trường cơ bản chứa nguồn carbon duy nhất là carboxymethyl cellulose (CMC), với thành phần bao gồm: 1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1.31g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.001g NaCl; 10g CMC; 15g agar; nước đến đủ 1 lít. Môi trường được điều chỉnh đến pH 7 để phân lập vi khuẩn và pH 5.5 để phân lập vi nấm. Dịch thu nhận từ bề mặt dạ dày được pha loãng trong nước muối sinh lý vô trùng và cấy trải trên đĩa Petri chứa môi trường phân lập. Các đĩa phân lập vi sinh vật được đặt trong tối ở điều kiện 30°C để phân lập nấm mốc và 37°C để phân lập vi khuẩn. Điều kiện thiếu khí được duy trì trong các bình kín (McIntosh & Filde's jar) với các túi hấp thu oxy AnaeroPack-Anaero (Mitsubishi, Nhật Bản).

Khảo sát khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật phân lập

Khả năng phân giải cellulose bằng enzyme cellulase ngoại bào của các chủng vi sinh vật phân lập được thực hiện trên môi trường có nguồn carbon là CMC với thành phần tương tự như trên. Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy 3 ngày ở 37°C đối với vi khuẩn và 30°C đối với nấm mốc. Hiệu quả phân giải CMC được xác định bằng cách đo vòng phân giải trên đĩa Petri chứa môi trường nuôi cấy với thuốc thử lugol.

Xác định các đặc tính của các chủng vi sinh vật

Đặc tính di động của các chủng vi khuẩn được thực hiện bằng phương pháp cây thẳng đứng vào môi trường thạch sâu cao thịt peptone, các ống thạch được ủ ở 37°C. Sự ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đối với sự sinh trưởng của các chủng vi sinh vật phân lập được thực hiện trên môi trường CMC có pH lần lượt 5.5, 7.0 và 9.0. Sau 2 ngày tiến hành so sánh sự sinh trưởng của các chủng vi sinh vật. Hoạt tính enzyme catalase của vi sinh vật được xác định bằng thử khả năng phân giải dung dịch H_2O_2 . Đặc tính Gram của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram.

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của các chủng nấm mốc được tách chiết theo phương pháp CTAB cải tiến của Doyle and Doyle (1987) [12]. Sinh khối tơ nấm (200 mg) được nghiền trong 1000 μl dung dịch đệm tách chiết (NaCl 1.5M, TrisHCl (pH 8.0) 100 mM; EDTA (pH 8.0) 20 mM, CTAB 4%) và được ủ 60°C trong 15 phút. Hỗn hợp được bổ sung 800 μl chloroform : isoamyl alcohol (tỉ lệ 24 : 1), và ly tâm ở tốc độ 13000 rpm trong 10 phút ở 4°C. Dịch nổi được thu nhận và bổ sung 800 μl isopropanol lạnh để tủa DNA. Tủa DNA tiếp tục được hoà tan vào 800 μl ethanol 70% và ly tâm ở 13000 rpm trong 10 phút ở 4°C. Tủa DNA được thu nhận và hoà vào 50 μl dung dịch TE trước khi bảo quản ở -20°C. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn được thu nhận theo phương pháp được mô tả bởi Maniatis et al. (1982) [13] với sinh khối vi khuẩn được ly giải trong

đệm ly giải chứa 10% SDS 20 mg ml⁻¹ proteinase K ở 37°C trong 1 giờ. Các bước tủa thu nhận DNA được thực hiện tương tự như mô tả ở trên.

Khuếch đại vùng gen 16S rRNA ở vi khuẩn và ITS ở nấm mốc

Vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn và vùng gen ITS của nấm mốc được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi được liệt kê trong Bảng 1. Thành phần phản ứng trong thể tích phản ứng 25µl bao gồm: 15µl Go Taq Green Master Mix (Promega, Mỹ), 5µl mỗi mồi xuôi và ngược có nồng độ 10 µM, 5µl nước khử ion và 5µl mẫu DNA. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR được thực hiện trên máy Mastercycler (Eppendorf, Đức) gồm các bước: 3 phút ở 94°C; lặp lại 33 chu kỳ của các bước biến tính mạch khuôn (30 giây ở 94°C), bắt cặp mồi (30 giây ở 50-55°C) và tổng hợp mạch mới (1 phút ở 72°C); phản ứng hoàn thiện ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kết quả. Sản phẩm khuếch đại được giải trình tự tại Công ty Nam Khoa Biotek (Tp. Hồ Chí Minh).

Bảng 1: Trình tự nucleotide các cặp mồi sử dụng cho các phản ứng PCR

| Tên gen | Loại mồi | Trình tự nucleotide |
|----------|-----------|----------------------------|
| 16S rRNA | Mồi xuôi | 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' |
| | Mồi ngược | 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' |
| ITS | Mồi xuôi | 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' |
| | Mồi ngược | 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' |

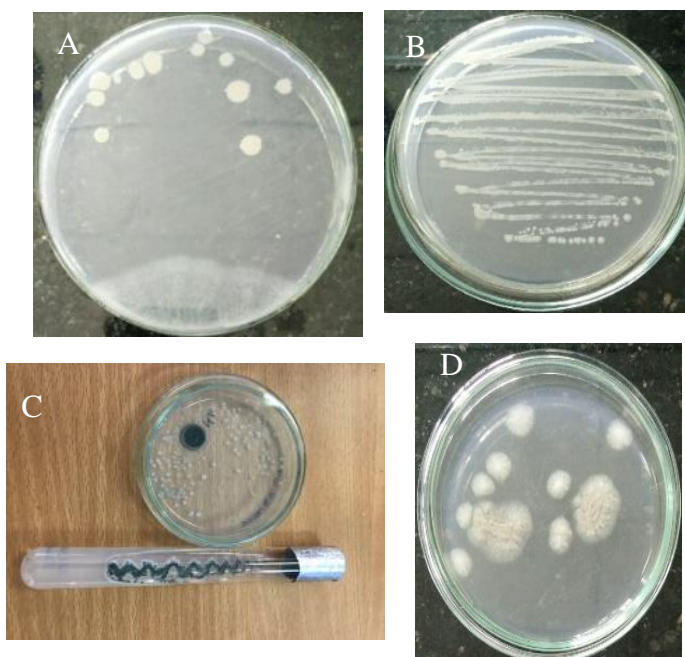
Xây dựng cây phát sinh loài

Trình tự vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn và vùng gen ITS của nấm mốc được kiểm tra độ chính xác bằng phần mềm Finch TV và hiệu chỉnh bằng phần mềm Seaview. Các chủng tham chiếu được lấy từ ngân hàng dữ liệu NCBI và được sắp đống bằng phần mềm ClusatlX2.1. Cây phát sinh loài của các chủng phân tích và các chủng tham chiếu được xây dựng trên phần mềm MrBayes phiên bản 3.2.6.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn phân giải cellulose từ dạ dày bò

Từ dịch dạ dày thu nhận tại 4 vị trí dạ cỏ, dạ tổ ong, dạ lá sách, dạ lá khé đã phân lập được 37 chủng vi khuẩn và 3 chủng nấm mốc (Hình 1). Vi khuẩn được phân lập nhiều nhất ở dạ cỏ với 11 chủng, tiếp theo là lá khé với 9 chủng, dạ tổ ong và lá sách có 8 chủng. Có một chủng vi khuẩn tồn tại ở tất cả các vị trí phân lập trong dạ dày bò.



Hình 1: Một số chủng vi sinh vật phân lập từ dạ dày bò trên môi trường CMC. (A) chủng K9, (B) chủng T8, (C) chủng N1, (D) chủng N2

Các chủng vi khuẩn được nhuộm Gram và xác định một số đặc tính sinh lý cơ bản. Kết quả được mô tả trong Bảng 2. Đa số các chủng vi khuẩn phát triển tốt ở môi trường có pH trung tính hoặc kiềm nhẹ. Chỉ một số chủng phát triển yếu ở môi trường có pH acid yếu. Ngược lại, các chủng nấm mốc phát triển thuận lợi hơn ở môi trường có pH yếu. Điều này phù hợp với điều kiện đặc trưng của dạ dày bò có pH khoảng 6.5 [10] và là điều kiện lý tưởng cho sự hoạt động của vi khuẩn hơn là nấm mốc. Phần lớn các chủng vi khuẩn có khả năng di động và có hoạt tính enzyme catalase (đặc trưng của vi sinh vật hiếu khí hoặc hiếu khí tùy nghi).

Bảng 2: Đặc tính của các chủng vi sinh vật

| Ký hiệu chủng | Tính di động | Hoạt tính catalase | pH | | | Gram | Đặc điểm khuẩn lạc |
|---------------|--------------|--------------------|-----|-----|-----|------|---|
| | | | 5.5 | 7 | 9 | | |
| Vi khuẩn | | | | | | | |
| X1 | + | - | + | +++ | +++ | G+ | Hình tròn, màu trắng đục, nhày, mặt bên nhô |
| X2 | + | + | + | +++ | +++ | G- | Hình tròn, màu trắng, mép trong trắng đục ngoài nhạt hơn, hơi nhày, sát mặt thạch |
| X3 | - | - | - | ++ | +++ | G- | Hình tròn, màu vàng nhạt, hơi nhày |
| X4 | + | + | + | +++ | +++ | G+ | Hình tròn, màu trắng, mép trong trắng đục ngoài nhạt hơn, nhày, sát mặt thạch |
| X5 | + | + | - | ++ | ++ | G+ | Dạng bất định, trắng đục, mép phân thùy, hơi nhày |
| K1 | + | | + | ++ | ++ | G+ | Tròn, bên trong có tia tia ra, trắng đục, hơi nhày |
| K2 | + | + | + | ++ | +++ | G- | Hình tròn, màu trắng, mép ngoài trắng trong, mép trong đậm hơn, nhày |
| K3 | + | + | - | +++ | ++ | G- | Hình tròn, trắng đục, nhày nhiều |
| K4 | + | + | - | ++ | ++ | G- | Hình tròn, màu trắng, có ria, mép ngoài trắng trong, có ria. Mép trong trắng đục |
| K5 | + | + | - | +++ | ++ | G+ | Tròn, các hình tròn đồng mức, trắng trong, ít nhày |
| K6 | + | + | - | ++ | ++ | G+ | Tròn, bên trong có tia và các đốm, vàng nhạt, ít nhày |
| K7 | + | + | - | ++ | ++ | G- | Bất định, màu trắng đục, hơi nhày |
| K8 | + | + | - | ++ | +++ | G+ | Bất định, màu trắng đục, nhày nhiều |
| K9 | + | + | - | ++ | ++ | G+ | Bất định, trắng đục, mép hơi, ít nhày |
| R1 | + | + | - | ++ | ++ | G+ | Tròn, trắng đục, nhày nhiều, mặt bên nhô |
| R2 | + | + | - | ++ | ++ | G+ | Bất định, trắng đục, mép có ria, ít nhày |
| R3 | + | + | + | ++ | +++ | G- | Bất định, màu trắng, mép phân thùy |
| R4 | + | + | - | ++ | +++ | G- | Tròn, trắng đục, mặt bên nhô, ít nhày |
| R5 | + | + | - | +++ | +++ | G+ | Hình hoa cúc, vàng nhạt, ít nhày |
| Da1 | + | - | + | +++ | ++ | G+ | Tròn, vàng nhạt, mép ngoài nhạt hơn mép trong, ít nhày |
| Da2 | + | - | + | +++ | ++ | G- | Tròn, trắng đục, nhày nhiều, mặt bên nhô |
| Da3 | + | + | - | ++ | +++ | G- | Bất định, trắng, mép phân thùy, ít nhày |

| | | | | | | | |
|----------------|---|---|-----|-----|-----|----|--|
| Da4 | + | + | - | ++ | ++ | G- | Trong, trắng trong, có ria, bằng mặt thạch |
| Db1 | + | + | - | +++ | +++ | G+ | Tròn, bên trong có chấm vàng, trắng đục, nhô, ít nhày |
| Db2 | + | + | - | +++ | +++ | G- | Tròn, trắng trong, có ria, mép ngoài nhợt hơn mép trong |
| Db3 | + | + | - | ++ | ++ | G+ | Bất định, trắng, mép phân thù, bằng mặt thạch |
| Db4 | + | + | - | ++ | ++ | G+ | Tròn, trắng đục, mặt bên nhô, nhày nhiều |
| Db5 | + | + | - | ++ | +++ | G- | Tròn, vàng nhạt, hình hoa cúc, mép ngoài vàng nhạt mép trong đậm hơn |
| Db6 | + | + | - | +++ | ++ | G- | Hình hoa cúc, mép ngoài trắng trong, mép trong vàng đậm, nhày |
| Db7 | - | + | + | +++ | +++ | G- | Màu trắng đục, sát mặt thạch, không ngày |
| T1 | + | + | - | ++ | ++ | G- | Tròn, vàng nhạt, có ria, ít nhày, bằng mặt thạch |
| T3 | + | + | + | ++ | ++ | G- | Hình hoa cúc, mép ngoài vàng nhạt mép trong đậm hơn, nhày nhiều |
| T4 | + | + | - | +++ | ++ | G+ | Tròn, các hình tròn đồng mức, trắng trong, ít nhày |
| T5 | + | + | - | + | ++ | G+ | Hình tròn, màu vàng, răng cưa, trong đậm hơn ngoài, ít nhày |
| T6 | + | + | - | ++ | ++ | G+ | Vàng đậm có viền trắng trong, mép tròn, ít nhày |
| T7 | - | + | + | +++ | ++ | G+ | Vàng đậm có viền trắng trong, nhô ra có răng cưa, ít nhày |
| T8 | + | + | - | +++ | +++ | G+ | Khuẩn lạc tròn, các hình tròn đồng mức, ít nhày, màu vàng |
| Nấm mốc | | | | | | | |
| N1 | | | +++ | + | - | | Màu xanh đậm, khuẩn lạc tròn xung quanh có vòng sợi tơ màu trắng. Cơ quan sinh sản dạng hoa cúc. |
| N2 | | | +++ | + | - | | Màu vàng đậm xung quanh có nhiều tơ trắng dạng sợi. Cơ quan sinh sản dạng hoa cúc. |
| N3 | | | +++ | + | - | | Màu đen, dạng sợi. Cơ quan sinh sản dạng hoa cúc. |

3.2 Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật

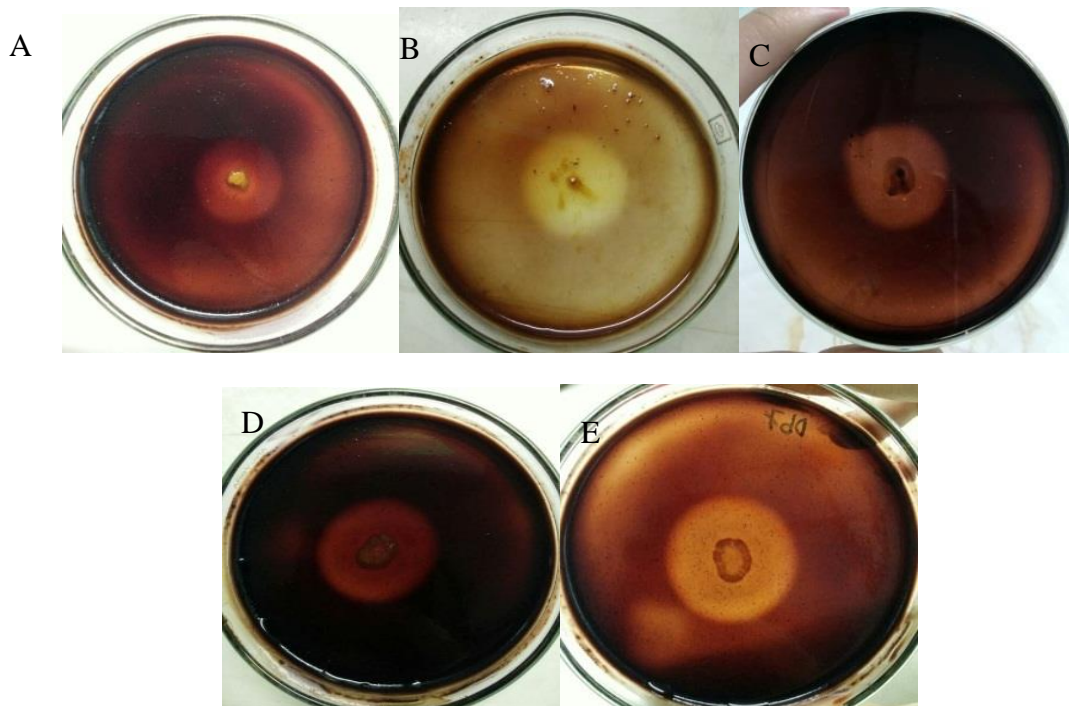
Trên môi trường CMC, các chủng vi sinh vật phân lập đều có khả năng phân giải cellulose thể hiện ở vòng phân giải cellulose xung quanh khuẩn lạc khi thử bằng thuốc thử logol (Hình 2). Một số chủng vi khuẩn có khả năng phân giải mạnh như K9, Db1, Db7, T7, T8, vòng phân giải có đường kính gấp hơn 2.5 lần đường kính khuẩn lạc (Bảng 4). Trong số các chủng nấm mốc, chủng N1 và N2 có hiệu quả phân giải tốt nhất, với đường kính vòng phân giải lớn hơn 1.5 lần so với đường kính khuẩn lạc.

Bảng 4: Khả năng phân giải cellulose bằng enzyme cellulase ngoại bào của các chủng vi sinh vật phân lập

| Ký hiệu chủng | Đường kính vòng phân giải (D) | Đường kính khuẩn lạc (d) | D/d |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------|
| X1 | 0.65±0.02 | 0.28±0.01 | 2.27 ^{bc} |

| | | | |
|-----|-----------|-----------|--------------------|
| X2 | 0.42±0.01 | 0.35±0.02 | 1.2 ^d |
| X3 | 0.57±0.05 | 0.48±0.01 | 1.2 ^d |
| X4 | 0.5±0.04 | 0.42±0.03 | 1.2 ^d |
| K1 | 0.47±0.04 | 0.42±0.02 | 1.12 ^d |
| K2 | 1.45±0.13 | 0.75±0.04 | 1.93 ^c |
| K8 | 0.7±0.11 | 0.4±0.03 | 1.82 ^{cd} |
| K9 | 1.06±0.23 | 0.38±0.05 | 2.81 ^b |
| R4 | 0.58±0.03 | 0.3±0.05 | 1.84 ^{cd} |
| Da2 | 0.65±0.02 | 0.45±0.03 | 1.4 ^d |
| Db1 | 0.78±0.05 | 0.28±0.04 | 2.86 ^b |
| Db2 | 0.7±0.07 | 0.33±0.02 | 2.12 ^c |
| Db7 | 0.65±0.01 | 0.23±0.01 | 2.78 ^b |
| T4 | 1.13±0.05 | 0.98±0.09 | 1.37 ^d |
| T5 | 0.78±0.03 | 0.46±0.03 | 1.82 ^{cd} |
| T6 | 1.06±0.06 | 0.45±0.02 | 2.38 ^{bc} |
| T7 | 0.88±0.06 | 0.33±0.02 | 2.74 ^b |
| T8 | 1.65±0.15 | 0.38±0.03 | 4.65 ^a |
| N1 | 0.8±0.03 | 0.4±0.01 | 2.0 ^c |
| N2 | 1.9±0.21 | 1.1±0.08 | 1.73 ^{cd} |
| N3 | 2.15±0.09 | 2.1±0.12 | 1.02 ^d |

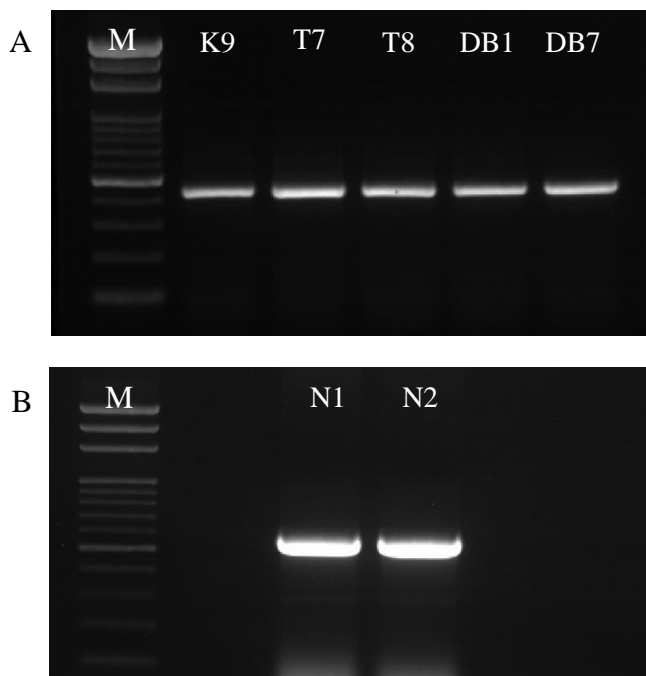
Các chữ khác nhau kèm theo số biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức p<0.05



Hình 2: Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật phân lập. (A) chủng K9, (B) chủng T8, (C) chủng T7, (D) chủng Db1, (E) chủng Db7

3.3 Kết quả định danh các chủng vi sinh vật bằng phương pháp giải trình tự

Dựa vào khả năng phân giải cellulose, 5 chủng vi khuẩn (K9, T7, T8, Db1 và Db7) và 2 chủng vi nấm (N1, N2) được lựa chọn để định danh. Kết quả khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu cho thấy vùng trình tự gene 16S rRNA được khuếch đại của 5 chủng vi khuẩn có kích thước khoảng 450 cặp base (Hình 3A). Đối với 2 chủng nấm mốc, vùng trình tự ITS được khuếch đại có kích thước 520 cặp base (Hình 3B).

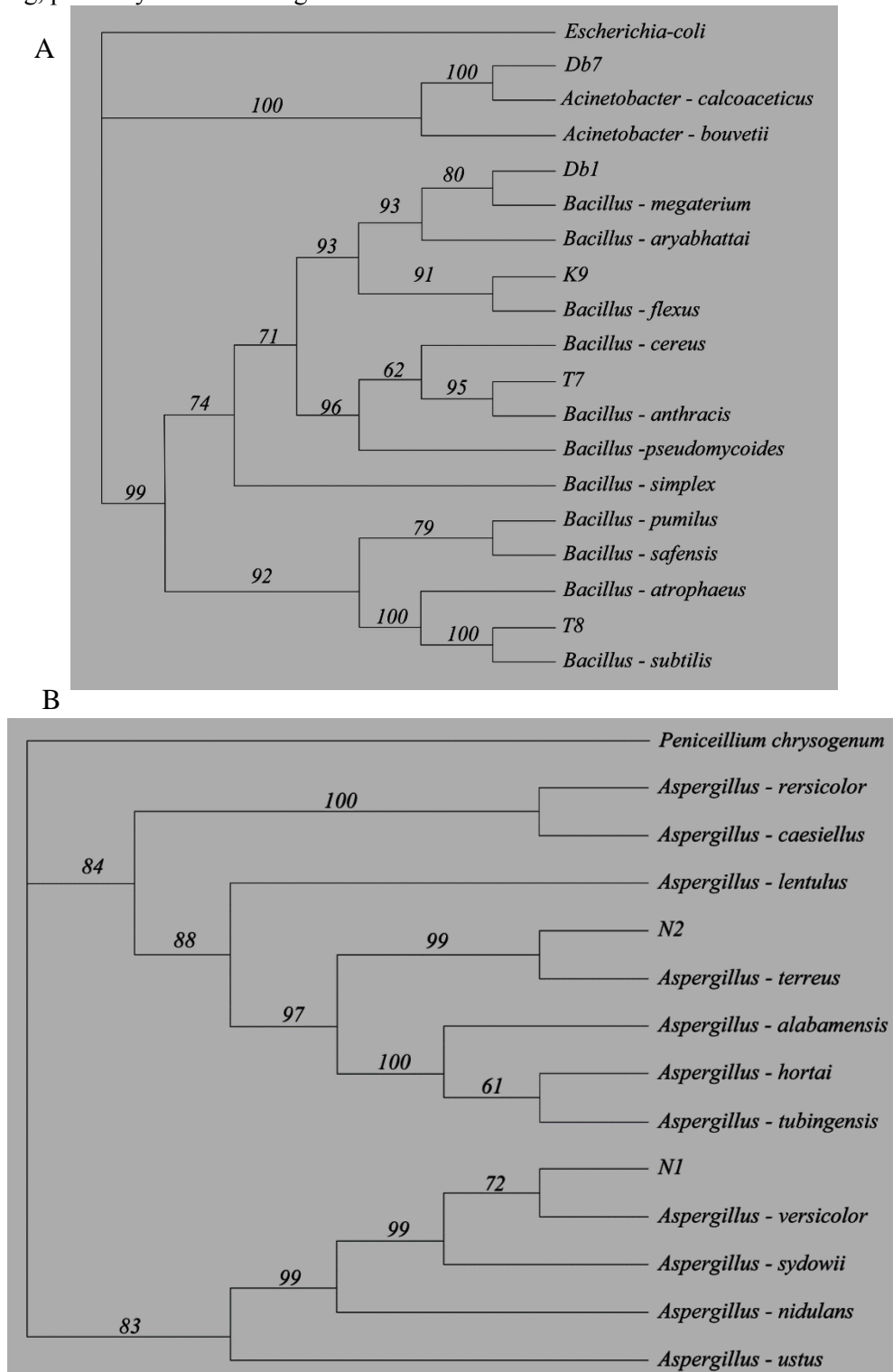


Hình 3: Kết quả khuếch đại bằng kỹ thuật PCR vùng gen 16s rRNA của 5 chủng vi khuẩn (A) và ITS của 2 chủng nấm mốc (B). M: Marker 100 bp.

Sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen 16S rRNA và ITS được giải trình tự hai chiều và được blast với cơ sở dữ liệu của NCBI để tìm trình tự tham vấn của một số chủng vi sinh vật có trình tự gen 16S rRNA và ITS tương đồng. Dùng phần mềm MrBayes, cây phát sinh loài của 5 chủng vi khuẩn phân lập và 2 chủng nấm mốc được thiết lập. Kết quả phân tích từ cây phát sinh loài cho thấy chủng DB1 cùng điểm nhánh với loài *Bacillus megaterium* với chỉ số bootstrap là 80. Chủng DB7 cùng điểm nhánh với loài *Acinetobacter calcoaceticus* với chỉ số bootstrap là 100. Chủng K9 cùng điểm nhánh với loài *Bacillus flexus* với chỉ số bootstrap là 91. Chủng T7 cùng điểm nhánh với loài *Bacillus anthracis* với chỉ số bootstrap là 72. Chủng T8 cùng điểm nhánh với loài *Bacillus subtilis* với chỉ số bootstrap là 100 (Hình 4A). Hai chủng nấm mốc N1 và N2 cùng điểm nhánh với *Aspergillus versicolor* và *Aspergillus terreus*, theo thứ tự, với chỉ số bootstrap lần lượt là 72 và 99 (Hình 4B). Các chỉ số bootstrap ở các nhánh có sự phân bố của các chủng vi sinh vật có mức độ tin cậy trung bình (65-85%) và cao (>85%).

Trong số 5 chủng vi sinh vật được định danh, có bốn chủng thuộc chi *Bacillus* và một chủng thuộc chi *Acinetobacter*. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Võ Văn Song Toàn và cộng sự (2017) [14], Nguyễn Hoàng Anh và cộng sự (2017) [15], Zhang et al. (2018) [16], các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* chiếm ưu thế trong dạ dày bò. Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có vai trò quan trọng trong việc tiết enzyme ngoại bào hỗ trợ tiêu hoá cellulose có trong thức ăn của bò [15]. Sự tồn tại của chủng vi khuẩn thuộc chi *Acinetobacter* trong dạ dày bò cũng đã được xác định trong nghiên cứu của Chang et al. (2015) [17]. Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được, có thể thấy tồn tại cả các chủng gây bệnh ở vật nuôi như chủng T7. Kết quả phân lập và định danh cũng xác định được các chủng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* từ dạ dày bò. Sự hiện diện của chi nấm mốc này đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Aihemaiti et al. (2013) [8] và Oyeleke and Okusanmi (2008) [6]. Như vậy, sự tiêu hoá thức ăn giàu cellulose trong dạ dày bò có sự hoạt động phối hợp của nhiều của các chủng vi sinh vật khác nhau. So với các nghiên cứu trước đây được thực hiện bởi các tác giả trong và ngoài nước [6, 8, 14, 15, 16, 17], nghiên cứu này đã

định danh chi tiết đến loài bằng kỹ thuật giải trình tự gen đối với một số các vi sinh vật phân lập từ dạ dày bò. Đây là cơ sở quan trọng để ứng dụng được các vi sinh vật này vào trong sản xuất các chế phẩm để xử lý môi trường, phân hủy các chất thải giàu cellulose.



Hình 4. Cây phát sinh loài của các chủng vi khuẩn (A) và nấm mốc (B) phân lập từ dạ dày bò. Chủng ngoại cho cây phát sinh loài của vi khuẩn là *Escherichia coli* và của nấm mốc là *Penicillium chrysogenum*

4 KẾT LUẬN

Dạ dày bò có sự hiện diện của số lượng lớn của các chủng vi khuẩn và lượng nhỏ hơn các chủng nấm mốc. Đa số các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose bằng enzyme cellulase ngoại bào. Dựa vào phương pháp định danh bằng giải trình tự vùng gen 16S rRNA và ITS, các chủng vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng để sản xuất các chế phẩm vi sinh vật hữu ích phân giải phế phụ phẩm nông nghiệp giàu cellulose, bao gồm K9, Db1, T8, và Db7, N1 và N2 lần lượt là *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aspergillus versicolor* và *Aspergillus terreus* với mức độ tin cậy trung bình và cao.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự hỗ trợ về kinh phí của Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh theo đề tài nghiên cứu cơ sở năm 2018.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đặng Minh Hằng, Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của 1 số chủng vi sinh vật để xử lý rác, Báo cáo Khoa học - Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, *Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội*, trang 333 – 339, 1999.
- [2] Nguyễn Ngọc Trúc Ngân, và Phạm Thị Ngọc Lan, Tìm hiểu khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật phân lập từ chất thải rắn của nhà máy Fococev Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Khoa Học Huế*, tập 1, 135 – 142, 2014.
- [3] Nguyễn Thị Thu Thủy, Trần Thị Xuân Phương, Cao Thị Dung, Lê Thị Hương Xuân, và Trương Thị Hồng Hải, Phân lập, tuyển chọn 1 số chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose và bước đầu ứng dụng trong xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp làm phân hữu cơ vi sinh, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Nông Nghiệp*, tập 1, số 1, trang 159 – 167, 2017.
- [4] Hà Thanh Toàn, Mai Thu Thảo, Nguyễn Thu Phương, Trần Lê Kim Ngân, Bùi Thế Vinh, và Cao Ngọc Điệp, Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose, tinh bột và protein trong nước rỉ từ bãi rác ở thành phố Cần Thơ, *Tạp chí Khoa học Trường đại học Cần Thơ*, tập 10, trang 195 – 202, 2008.
- [5] Hà Thanh Toàn, Lê Phương Trâm, Nguyễn Thị Mỹ Điện, và Cao Ngọc Điệp, Phân hủy rác thải hữu cơ bằng phương pháp sinh học: Thí nghiệm thùng lên men 10-L, *Tạp chí Khoa học Trường đại học Cần Thơ*, tập 15b, 197 – 205, 2010.
- [6] S.B. Oyeleke and T.A. Okusanmi, Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants, *Academic Journals*, vol. 10, pp.1503-1504, 2008.
- [7] Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp, Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose, *Tạp chí Khoa học Trường đại học Cần Thơ*, tập 18a, trang 177 – 184, 2011.
- [8] M. Aihemaiti, F. Zhen, Y. Li, G. Aibaidoula and W. Yimit, Isolation and identification of rumen bacteria for cellulolytic enzyme production, *Acta microbiologica Sinica*, vol. 53, no. 4, pp. 470-477, 2013.
- [9] M.K. Theodorou and J. France, Rumen microorganisms and their interactions, In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism (Ed: J.M. Forbes and J. France), *CAB International*, pp. 145-162, 1993.
- [10] Trần Cừ, Sinh lý và hóa sinh tiêu hóa của động vật nhai lại. *Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội*, 1979.

- [11] Hoàng Quốc Khánh, Ngô Đức Duy, và Nguyễn Duy Long, Khả năng sinh tổng hợp và đặc điểm cellulase của *Aspergillus niger* RNNL – 363, Báo cáo Khoa học - Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, trang 304 – 307, 2003.
- [12] J. Doyle and J. Doyle, A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, vol. 9, pp. 11–15, 1987.
- [13] T. Maniatis, E.F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor – New York, 1982.
- [14] Võ Văn Song Toàn, Đỗ Thị Cẩm Hương, Hồ Quảng Đồ, và Trần Nhân Dũng, Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn dạ cỏ của bò để phân giải bột bã mía trong điều kiện in vitro, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, tập 48b, trang 71-80, 2017.
- [15] Nguyễn Hoàng Anh, Nguyễn Thị Thanh Thủy, và Nguyễn Vĩnh Hoàng, Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* spp. từ dạ cỏ bò có khả năng sinh enzyme β -glucanase và bước đầu xác định đặc tính của enzyme, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, tập 15, số 1, trang 85-91, 2017.
- [16] Y. Zhang, Z. Zhang, L. Dai, Y. Liu, M. Cheng, and L. Chen, Isolation and characterization of a novel gossypol-degrading bacteria *Bacillus subtilis* strain rumen *Bacillus subtilis*, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, vol. 31, no. 1, pp. 63-70, 2018.
- [17] D. H. Chang, M. S. Rhee, H. Jeong, S. Kim, and B. C. Kim, Draft Genome Sequence of *Acinetobacter* sp. HR7, Isolated from Hanwoo, Korean Native Cattle, *Genome Announc*, vol. 3, no. 1, pp. e01358-14, 2015.

Ngày gửi bài: 21/11/2018

Ngày chấp nhận đăng: 01/03/2019