



PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE ĐỂ SẢN XUẤT PHÂN HỮU CƠ VI SINH

Nguyễn Thị Thu Thủy*, Nguyễn Tiến Long, Trần Thanh Đức

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

Tóm tắt: Việc sử dụng phụ phẩm nông nghiệp làm phân hữu cơ vi sinh là giải pháp tối ưu hiệu nay vì vừa giảm thiểu thải chất thải lại vừa tận dụng để làm phân hữu cơ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose, tuyển chọn được chủng 6NH1 có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất và được nhân sinh khối để sản xuất phân hữu cơ vi sinh. Chủng 6NH1 phát triển tốt nhất khi được nuôi cấy ở 30 °C và pH 6-7. Khi ủ rom rạ với chủng vi khuẩn này, hàm lượng cellulose giảm 49,6 % so với đối chứng. Phân tích di truyền phân tử dựa trên trình tự 16S rRNA, chủng vi khuẩn 6NH1 đồng hình 99 % với loài *Bacillus amyloliquefaciens*.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens*, cellulose, phân hữu cơ vi sinh

1 Đặt vấn đề

Việt Nam là một nước sản xuất nông nghiệp nên nguồn phế phụ phẩm nông nghiệp rất phong phú và đa dạng. Mỗi năm, nguồn sinh khối thải ra từ cây cà phê ở các tỉnh Tây Nguyên là 0,3-0,5 triệu tấn, ở vùng Tây Bắc hàng năm đã thải ra khoảng 55.000-60.000 tấn mùn cưa từ việc khai thác và chế biến gỗ. Những chất thải trên gần như chưa được sử dụng hoặc chỉ có thể để chúng ngoài môi trường để tự phân hủy [5]. Các phế thải này có thành phần chính là cellulose. Cellulose có thể bị thủy phân trong môi trường kiềm hoặc acid. Tuy nhiên, việc phân hủy cellulose bằng phương pháp vật lý và hóa học rất phức tạp, tốn kém và gây độc hại cho môi trường. Trong khi đó, việc xử lý các chất thải hữu cơ chứa cellulose bằng công nghệ sinh học, đặc biệt sử dụng các enzyme cellulase ngoại bào từ vi sinh vật sẽ có nhiều ưu điểm về cả mặt kỹ thuật, kinh tế và môi trường. Số lượng các loài vi sinh vật tham gia sinh tổng hợp enzyme cellulase có trong điều kiện tự nhiên rất phong phú. Chúng thuộc nấm sợi, xạ khuẩn, vi khuẩn và trong một số trường hợp, các nhà khoa học còn thấy cả nấm men cũng tham gia quá trình phân giải này [3].

Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước đều chứng minh rằng sử dụng vi sinh vật phân giải cellulose để sản xuất các chế phẩm sinh học nhằm phân hủy rác thải nông nghiệp thành phân hữu cơ vi sinh rất có ích cho cây trồng [7], [9], [12]. Như vậy, việc nghiên cứu xử lý rác thải nông thôn làm cơ chất để sản xuất phân hữu cơ vi sinh sẽ đem lại nhiều lợi ích. Một mặt vừa giảm ô nhiễm môi trường nông thôn, giảm phát thải khí nhà kính, mặt khác cung cấp

* Liên hệ: nguyenthithuthuy@huaf.edu.vn

Nhận bài: 08-08-2017; Hoàn thành phản biện: 27-08-2017; Ngày nhận đăng: 28-08-2017

nguồn dinh dưỡng thiết yếu cho cây trồng. Do đó việc tiến hành nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose để sản xuất phân hữu cơ vi sinh là cần thiết và có ý nghĩa quan trọng.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng

Vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose phân lập từ bãi rác, xường mùn cưa và một số vùng đất canh tác khác nhau ở Thừa Thiên Huế.

2.2 Phương pháp

Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose

Thu mẫu đất ở các bãi rác, xường mùn cưa, và các vùng đất canh tác của 12 địa điểm trên địa bàn huyện Phú Vang, Hương Trà, Phong Điền, Quảng Điền và thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế (Bảng 1). Mỗi điểm thu 5 mẫu, sau đó trộn 5 mẫu thành 1 mẫu, ghi kí hiệu mẫu, ngày thu mẫu, nơi lấy mẫu, đặc điểm của mẫu. Độ sâu tầng đất thu mẫu là 0–15 cm.

Bảng 1. Địa điểm thu thập mẫu

TT	Kí hiệu mẫu	Địa điểm lấy mẫu	Loại mẫu
1	M1	Tổ 2, phường Hương Sơ, Thành phố Huế	Xường cưa
2	M2	Tổ 4, phường Hương Sơ, Thành phố Huế	Xường cưa
3	M3	Thôn An Vân, phường Hương An, thị xã Hương Trà	Bãi rác
4	M4	Thôn An Lưu, phường Hương An, thị xã Hương Trà	Bãi rác
5	M5	Tổ 4, phường Hương Vân, huyện Hương Trà	Đất ruộng
6	M6	Tổ 7, phường Hương Vân, huyện Hương Trà	Đất ruộng
7	M7	Thôn Xuân Thiên Hạ, Xã Vinh Xuân, huyện Phú Vang	Đất vườn
8	M8	Thôn Tân Sa, Xã Vinh Xuân, huyện Phú Vang	Đất vườn
9	M9	Thôn Bồ Điền, Xã Phong An, huyện Phong Điền	Đất ruộng
10	M10	Thôn Đông An, Xã Phong An, huyện Phong Điền	Đất vườn
11	M11	Thôn Phước Yên, xã Quảng Thọ, huyện Quảng Điền	Đất vườn
12	M12	Tổ 11, thị xã Tứ Hạ, huyện Hương Trà	Đất ruộng

Phân lập nhóm vi khuẩn phân giải cellulose: Sử dụng môi trường MPA (Malt Peptone

Agar) để phân lập vi khuẩn, thay nguồn carbon trong các môi trường bằng CMC (carboxymethyl cellulose) [1].

Xác định hoạt tính enzyme cellulase của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Tiến hành nuôi cấy các chủng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường xốp gồm cám gạo:bột bắp (tỷ lệ 3:1), có bổ sung 10 ml dung dịch MPA. Nuôi cấy tĩnh trong vòng 5 ngày ở 30 °C. Sau đó chiết enzyme thô bằng cách cân 5 g canh trường hòa trong nước cất vô trùng, cho vào máy lắc 130 vòng trong 5 phút, sau đó lọc và li tâm ở 5000 vòng trong 20 phút thu dịch chiết enzyme. Lấy 100 μ l dịch chiết enzyme nhỏ vào lỗ thạch trên đĩa petri có thành phần môi trường là CMC 1 %, agar 2 %. Đặt đĩa petri vào tủ lạnh ở 4°C trong 24 giờ, sau đó chuyển sang ủ ở tủ ấm ở 50 °C trong vòng 24 giờ. Tiến hành nhuộm màu bằng dung dịch Congo Red, sau đó rửa lại bằng dung dịch NaCl 1M và đo kích thước vòng phân giải. Hoạt tính enzyme cellulase của vi sinh vật được phản ánh qua độ lớn của đường kính vòng phân giải [4].

Khả năng phân giải (V) được tính theo công thức

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

trong đó V là khả năng phân giải, D là đường kính vòng phân giải, d là đường kính lỗ khoan. Chỉ số V càng lớn cho thấy hoạt lực của enzyme ngoại bào càng mạnh, phân cấp hoạt lực theo chỉ tiêu sau [5]:

$V < 10$ mm: Khả năng phân hủy cellulose yếu (-),

$15 \text{ mm} > V \geq 10$ mm: Khả năng phân hủy cellulose trung bình (+),

$20 \text{ mm} > V \geq 15$ mm: Khả năng phân hủy cellulose khá (++) ,

$V \geq 20$ mm: Khả năng phân hủy cellulose mạnh (+++).

Xác định điều kiện sinh trưởng tối ưu cho chủng vi khuẩn phân giải cellulose

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật độ tế bào vi khuẩn: Thí nghiệm được thực hiện trong môi trường MPA, nuôi ở các mức nhiệt độ 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C. Sau 120 giờ xác định số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

Ảnh hưởng của pH môi trường: Thí nghiệm được thực hiện trong môi trường MPA ở 30 °C. Điều chỉnh pH đạt đến giá trị 5, 6, 7, 8 bằng dung dịch NaOH 10 % hoặc HCl 10 %. Sau 120 giờ xác định số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

Thử nghiệm khả năng phân giải rơm rạ của chủng vi khuẩn tuyển chọn

Xử lý rơm rạ: Xử lý rơm rạ ngoài tự nhiên với 2 công thức: CT 1 (đối chứng): 5 kg rơm rạ; CT2: 5 kg rơm rạ + chủng vi khuẩn tuyển chọn (tỷ lệ cấy giống là 5 %).

Tạo hỗn hợp vi khuẩn 6NH1: Chúng tôi tiến hành tạo hỗn hợp vi khuẩn 6NH1 với chất mang là cám gạo:bột bắp (tỷ lệ 3:1): với 2 ml nước cất vô trùng cho 0,1 kg cám gạo + bột bắp. Tiến hành nuôi ở nhiệt độ phòng thí nghiệm và sau 5 ngày đếm số lượng bào tử và thu được $3,12 \times 10^8$ CFU/g, phù hợp với tiêu chuẩn về chế phẩm vi sinh ($>10^8$ CFU/g)

Phương pháp ủ: Trộn đều 5 kg nguyên liệu ủ với hỗn hợp vi khuẩn 6NH1, nén chặt, đậy kín nắp. Thời gian ủ 30 ngày. Đánh giá sự sai khác về hàm lượng cellulose của công thức ủ có bổ sung chủng vi khuẩn 6NH1 so với đối chứng (không bổ sung chủng vi khuẩn) để đánh giá khả năng phân giải cellulose của chủng vi khuẩn 6NH1.

Sử dụng phương pháp Koch để phân lập và đếm mật độ vi khuẩn thí nghiệm khi bắt đầu ủ và 7, 14, 21, 28 ngày sau ủ để đánh giá sự biến động mật độ vi khuẩn trong khối ủ theo thời gian.

Phương pháp nhận diện vi khuẩn

Định danh vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự gen 16S. Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn và nhân đoạn gene mã hóa 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction). Xác định trình tự đoạn gene mã hóa 16S rRNA theo phương pháp của Sanger, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Data Collection v1.0 và Sequence Analysis [8]. Trình tự của đoạn gene mã hóa 16S rRNA của mẫu được so sánh với các đoạn gene mã hóa 16S rRNA đã được công bố trên Blast Search. Sử dụng phần mềm Clustal X, Bioedit để phân loại chủng vi khuẩn.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2010 và Statistix 10.0.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose

Từ 12 mẫu đất đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải hợp chất hữu cơ cellulose với hình dạng, kích thước màu sắc và độ phân giải cellulose khác nhau (Bảng 2).

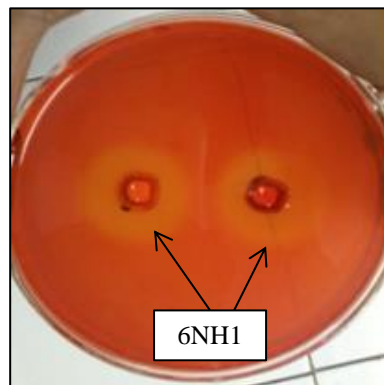
Bảng 2. Đặc điểm của các chủng vi khuẩn phân giải cellulose

TT	Kí hiệu	Mật độ (CFU/g)	Mô tả hình thái	Đường kính vòng phân giải (mm)
1	6NH1	$2,3 \times 10^4$	Màu trắng sữa, dạng tròn, mép có hình răng cưa	22,8± 0,00
2	6NH2	$4,2 \times 10^5$	Vàng nhạt, nhầy nhót, dẹt, mép không đều	18,5± 0,33
3	6NH3	$1,4 \times 10^3$	Vàng nhạt, nhầy nhót, dẹt, mép không đều	16,0± 0,67
4	6NH4	$3,5 \times 10^4$	Trắng sữa, dẹt, vòng tròn đồng tâm	14,0± 0,42

TT	Kí hiệu	Mật độ (CFU/g)	Mô tả hình thái	Đường kính vòng phân giải (mm)
5	6NH5	$6,7 \times 10^3$	Trắng sữa, nhẵn nheo, không đều	10,5± 0,33
6	6NH6	$2,5 \times 10^2$	Trắng sữa, nhẵn nheo, không đều	12,5± 0,42
7	6NH7	$5,8 \times 10^3$	Trắng sữa, tròn không đều, nhầy nhót	8,5± 0,56
8	6NH8	$7,2 \times 10^3$	Trắng sữa, tròn không đều, nhầy nhót	18,5± 0,48
9	6NH9	$3,5 \times 10^4$	Tia tâm, tròn đều, hồng nhạt	9,5± 0,00
10	6NH10	$2,6 \times 10^5$	Trắng sữa, tròn không đều, nhầy nhót	17,0± 0,23
11	6NH11	$4,1 \times 10^5$	Màu trắng sữa, mặt gồ ghề, nhẵn nheo	10,5± 0,43
12	6NH12	$5,4 \times 10^4$	Màu trắng sữa, mặt gồ ghề, nhẵn nheo	7,5± 0,45
13	6NH13	$2,6 \times 10^3$	Màu trắng sữa, mặt gồ ghề, nhẵn nheo	10,0± 0,33
14	6NH14	$5,3 \times 10^4$	Vàng nhạt, dẹt, nhẵn nheo, có vòng đồng tâm	20,5 ± 0,00
15	6NH15	$4,2 \times 10^2$	Màu vàng nhạt, hơi nhầy nhót, bờ tròn đều	9,0± 0,43
16	6NH16	$3,1 \times 10^4$	Trắng trong, nhầy nhót, tròn, có vòng đồng tâm	7,5± 0,53
17	6NH17	$4,2 \times 10^5$	Trắng sữa, tròn đều, vòng đồng tâm, nhầy nhót	12,5± 0,46
18	6NH18	$2,8 \times 10^3$	Trắng đục, ít nhầy nhót, bờ không đều	9,0± 0,44

Các chủng vi khuẩn có màu sắc rất phong phú: trắng trong, trắng sữa, vàng nhạt, hồng nhạt... Các chủng có khả năng phân giải cellulose khác nhau. Chủng 6NH1 và 6NH14 có khả năng phân giải cellulose mạnh với đường kính vòng phân giải lớn hơn 20 mm (11,1 %). 10 chủng có đường kính vòng phân giải cellulose đạt từ 10 đến 20 cm (55,5 %); 6 chủng có khả năng phân giải cellulose ở mức độ yếu. Số liệu cho thấy mật độ vi khuẩn phân lập được có khả năng phân giải cellulose ở các vùng đất này là khá cao, đạt từ $4,1 \times 10^2$ CFU/g đến $4,2 \times 10^5$ CFU/g.

Căn cứ vào đường kính vòng phân giải của các chủng vi khuẩn phân giải cellulose, (Bảng 2), chúng tôi đã chọn 1 chủng có đường kính lớn nhất là chủng 6NH1 (Hình 1) tiếp tục nghiên cứu điều kiện sinh trưởng phát triển tối ưu cho chủng vi khuẩn này. So với một số kết quả nghiên cứu về vi khuẩn phân giải cellulose thì chủng vi khuẩn 6NH1 có hoạt tính cellulase tốt và tương đương với các chủng vi khuẩn X1, X10, PV41 và PV69 đã được tuyển chọn từ các nghiên cứu của Nguyễn Thị Thúy Nga và cs.; Nguyễn Ngọc Trúc Ngân và Phạm Thị Ngọc Lan [5], [6].



Hình 1. Vòng phân giải CMC của dịch enzyme từ chủng vi khuẩn 6NH1

3.2 Điều kiện tối ưu cho sinh trưởng, phát triển của chủng vi khuẩn tuyển chọn

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển và sinh tổng hợp enzyme cellulase. Khả năng hoạt động của các chủng vi sinh vật thay đổi theo sự biến thiên của nhiệt độ, hoạt động sống của chúng dựa trên sự chuyển hóa của hàng loạt các phân hủy theo những trình tự xác định. Khi nhiệt độ tăng cao thì tốc độ các quá trình này cũng tăng theo. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của chủng vi khuẩn phân giải cellulose 6NH1 được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến mật độ tế bào chủng vi khuẩn 6NH1

Nhiệt độ (°C)	Mật độ tế bào vi khuẩn (CFU/ml)
25	77×10^7
30	88×10^8
35	78×10^8
40	15×10^8

Bảng 3 cho thấy chủng 6NH1 sinh trưởng, phát triển được trong khoảng 25–40 °C nhưng thích hợp nhất là ở 30 °C, mật độ tế bào đạt cực đại là 88×10^8 CFU/ml. Trong khi ở 25 °C, mật độ tế bào chỉ đạt 77×10^7 CFU/ml. Khi được nuôi ở 40 °C, mật độ tế bào có giảm nhưng không đáng kể, đạt 15×10^8 CFU/ml.

Ảnh hưởng của pH

Giá trị pH của môi trường ảnh hưởng đến sinh trưởng và sinh tổng hợp của vi sinh vật không giống nhau. Muốn phát triển và sinh tổng hợp enzyme mạnh nhất thì chủng vi khuẩn

phân giải cellulose cũng đòi hỏi phải có một khoảng pH thích hợp. Thí nghiệm được tiến hành trên 4 mức pH môi trường khác nhau (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến mật độ tế bào chủng vi khuẩn 6NH1

pH	Mật độ tế bào chủng vi khuẩn (CFU/ml)
5	23×10^7
6	47×10^8
7	58×10^8
8	34×10^6

Số liệu cho thấy chủng 6NH1 sinh trưởng, phát triển được trong khoảng pH 5–8, nhưng thích hợp nhất ở pH môi trường từ 6 đến 7 với mật độ tế bào đạt cực đại là 47×10^8 – 58×10^8 CFU/ml. Trong khi ở pH = 5, mật độ tế bào chỉ đạt 23×10^7 CFU/ml và khi nuôi vi khuẩn trong môi trường có pH = 8 mật độ tế bào giảm đáng kể, chỉ đạt 34×10^6 CFU/ml. Như vậy, chủng 6NH1 thích hợp khi nuôi cấy trong môi trường có pH trong khoảng 6–7.

3.3 Khả năng phân giải rơm rạ của chủng vi khuẩn 6NH1

Để tìm hiểu khả năng phân hủy các phế thải nông nghiệp giàu cellulose của chủng vi khuẩn 6NH1, chúng tôi tiến hành thí nghiệm ủ chủng 6NH1 với rơm rạ trong xô chậu ngoài điều kiện tự nhiên trong 30 ngày. Sau khi kết thúc thí nghiệm, chúng tôi đánh giá sai khác khối lượng và hàm lượng chất xơ trong các công thức ủ có bổ sung chủng 6NH1 so với đối chứng (Bảng 5 và Bảng 6).

Bảng 5. Khả năng phân giải rơm rạ của chủng vi khuẩn 6NH1

Công thức	Khối lượng tươi (kg)			Tỷ lệ vật chất khô (%)	
	Trước ủ	Sau ủ	Giảm so với ĐC (%)	Sau ủ	Giảm so với ĐC (%)
ĐC	5	4,74	–	10	–
Chủng 6NH1	5	4,12	12,4	6,7	33

Khối lượng tươi của rơm rạ sau 30 ngày ủ với chủng 6NH1 giảm đáng kể so với đối chứng (12,4 %). Tỷ lệ vật chất khô của rơm rạ sau ủ ở công thức bổ sung chủng 6NH1 là 5 % cũng cho thấy sự khác biệt. Ở công thức có bổ sung chủng 6NH1, tỷ lệ vật chất khô chiếm 6,7 %, trong khi đó ở đối chứng là 10 %. Như vậy, xử lý rơm rạ bằng chủng 6NH1 làm giảm 33 % tỷ lệ vật chất khô. Điều này chứng tỏ việc xử lý rơm rạ bằng chủng 6NH1 cho hiệu quả phân giải cellulose khá cao.

Bảng 6. Hàm lượng cellulose của rom rạ trước và sau ủ

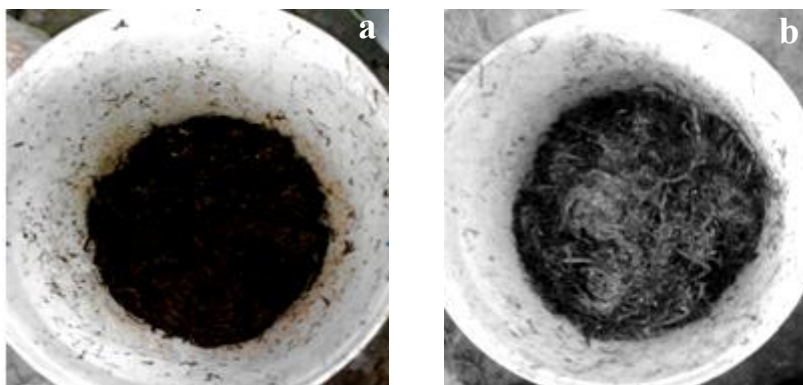
Công thức ủ	Hàm lượng cellulose (%)		
	Trước ủ	Sau ủ	Giảm SV ĐC (%)
ĐC	4,71	4,21	–
Chủng 6NH1	4,71	1,90	49,6

Phân tích hàm lượng cellulose của rom rạ trước và sau khi xử lý chủng 6NH1 cho thấy so với đối chứng, hàm lượng cellulose giảm 49,6 % sau xử lý 30 ngày ngoài đồng ruộng. Điều này phản ánh khả năng phân giải vật liệu rom rạ rất tốt của chủng vi khuẩn 6NH1 (Hình 2).

Bảng 7. Diễn biến mật độ vi khuẩn trong khối ủ theo thời gian

Thời gian ủ (ngày)	Mật độ vi khuẩn (CFU/g)
Bắt đầu ủ	$5,29 \times 10^9$
7	$2,73 \times 10^9$
14	$9,6 \times 10^8$
21	$4,8 \times 10^8$
28	$7,4 \times 10^7$

Với tỷ lệ cấy giống vào khối ủ là 5 % khối lượng, mật độ vi khuẩn trong khối ủ nhìn chung giảm đều theo thời gian. Khi bắt đầu ủ, mật độ vi khuẩn đạt khoảng $5,29 \times 10^9$ CFU/g. Tỷ lệ này giảm không đáng kể sau 1 tuần ủ. Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn giảm dần từ $2,73 \times 10^9$ sau 1 tuần ủ xuống còn $7,4 \times 10^7$ CFU/g sau 4 tuần ủ. Tỷ lệ này vẫn đảm bảo mật độ vi sinh trong khối ủ khoảng 10^7 tế bào (Bảng 7).



Hình 2. Phân giải rom rạ sau 30 ngày của chủng vi khuẩn 6NH1 (a. rom rạ được ủ với vi khuẩn 6NH1; b. rom rạ ủ không có vi khuẩn)

3.4 Định danh chủng vi khuẩn 6NH1

Để định danh chính xác chủng vi khuẩn 6NH1, chúng tôi đã giải trình tự đoạn gen 16S rRNA và so sánh trên ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng 6NH1 là tương đồng 99% với trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng *Bacillus amyloliquefaciens*, mã số truy cập NR075005.1 (Hình 3). Chủng 6NH1 được xếp vào chi *Bacillus*, loài *Bacillus amyloliquefaciens*.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
976 bits (528)	0.0	530/531(99%)	0/531(0%)	Plus/Plus
Query 4	GGAGAGTTTGATCTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGA			63
Sbjct 7	GGAGAGTTTGATCTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGA			66
Query 64	GCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT			123
Sbjct 67	GCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT			126
Query 124	AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCT			183
Sbjct 127	AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCT			186
Query 184	GAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG			243
Sbjct 187	GGACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG			246
Query 244	CGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG			303
Sbjct 247	CGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG			306
Query 304	AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA			363
Sbjct 307	AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA			366
Query 364	GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGTT			423
Sbjct 367	GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGTT			426
Query 424	TTGGGATCGTAAAGCTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACC			483
Sbjct 427	TTGGGATCGTAAAGCTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACC			486
Query 484	TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGG			534
Sbjct 487	TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGG			537

Hình 3. So sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn 6NH1 với trình tự loài đã công bố trên thế giới

4 Kết luận và đề nghị

4.1 Kết luận

Đã phân lập và tuyển chọn được chủng vi khuẩn 6NH1 có khả năng phân giải cellulose cao với đường kính vòng phân giải là 22,8 mm. Chủng vi khuẩn 6NH1 sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện nhiệt độ 30°C và pH môi trường trong khoảng 6-7. Khi ủ rom rạ với chủng vi khuẩn 6NH1 cho thấy khả năng phân giải cellulose rất tốt. Phân tích di truyền phân tử dựa trên trình tự 16S rRNA cho thấy chủng vi khuẩn 6NH1 đồng hình với loài *Bacillus amyloliquefaciens*.

4.2 Đề nghị

Ứng dụng chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* 6NH1 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.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn đề tài mang mã số DHH2016-02-77 đã tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Huỳnh Anh (2004), *Nghiên cứu về nấm sợi Trichoderma reesei sinh tổng hợp enzyme cellulose trên môi trường lỏng với nguồn cacbon là CmC*, Nxb. ĐH quốc gia Tp.HCM.
2. Bhat MK (2000), *Cellulases and related enzymes in biotechnology*, In *Biotechnology Advances* 18, 355–383.
3. Gautam S. P., Bundela P. S., Pandey A. K., Jamaluddin, Awasthi M. K., Sarsaiya S.(2012), *Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain*. *International Journal of Microbiol.*, article ID 325907.
4. Phạm Thị Ngọc Lan (2012), *Giáo trình thực tập vi sinh vật học*, Nxb. Đại học Huế.
5. 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 KHLN 2/2015, 3841–3850.
6. Nguyễn Ngọc Trúc Ngân, Phạm Thị Ngọc Lan (2014), *Tìm hiểu khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật phân lập từ chất thải rắn nhà máy Fococov Thừa Thiên Huế*, Tạp chí Khoa học Đại học Huế, 1 (1), 135–142.
7. Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp (2011), *Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose*, Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 18°, 177–184.
8. Sambrook J. and Russell D.W. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
9. Hà Thanh Toàn, Cao Ngọc Điệp, Trần Lê Kim Ngân, Nguyễn Thu Phương, Mai Thu Thảo, Bùi Thế Vinh (2008), *Phân lập vi khuẩn phân giải xenlulo, tinh bột và protein trong nước rỉ từ bãi rác ở Thành phố Cần Thơ*, Tạp chí Nông Nghiệp 10, Nxb. Đại học Cần Thơ.
10. Tolan JS, Foody B (1999), *Cellulase from submerged fermentation*. In: *Advances in Biochemical Engineering: Biotechnology Vol 65, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. (Tsao, G.T, Ed.), SpringerVerlag, Berlin, 41–67.

11. Lê Phú Tuấn, Vũ Thị Kim Oanh, Nguyễn Thị Thu Phương (2016), *Nghiên cứu xử lý phụ phẩm nông nghiệp làm phân hữu cơ sử dụng chế phẩm vi sinh tại xã Phúc Thuận– Phố Yên– Thái Nguyên*, Tạp chí khoa học lâm nghiệp số 6/2016 (101–108).
12. Yang L. L., Zhang Z., Wu M. And Feng J. F. (2014), *Isolation, screening and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of china and optimization of cellulose production by Paenibacillus terrae ME27-1*, BioMed Research International Volume 2014, Article ID 512497.

ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS CAPABLE OF DEGRADING CELLULOSE TO MICROBIAL ORGANIC FERTILIZER

Nguyen Thi Thu Thuy*, Nguyen Tien Long, Tran Thanh Duc

HU – University of Agriculture and Forestry, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

Abstract: Currently, the use of agriculture by-product as compost is considered as one of the best solutions in terms of reducing waste as well as producing microbial organic fertilizers. In this study, 18 cellulose degrading strains were isolated, one of which homogeneous to that of *Bacillus amyloliquefaciens* had the highest activity and was applied to degrade cellulose to organic fertilizer. This strain developed best at 30°C and pH 6–7 and reduced the cellulose dry mass by 49.6 % compared with the control. The molecular identification was made based on the 16S rRNA sequence.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, cellulose, microbial organic fertilizer