

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.114

XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN, NẤM PHÂN LẬP TỪ RUỘT MỐI (*Microcerotermes* spp.) THU NHẬN Ở HUYỆN BÌNH TÂN, TỈNH VĨNH LONG

Ngô Thanh Phong^{1*}, Nguyễn Thị Cẩm Vân¹, Nguyễn Huỳnh Thúy Diệu² và Bùi Thế Vinh³

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Trường Trung học Phổ thông Chuyên Vị Thanh, Hậu Giang

³Nhà máy sữa Vinamilk Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Ngô Thanh Phong (email: ngophong@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 02/03/2021

Ngày nhận bài sửa: 15/04/2021

Ngày duyệt đăng: 20/08/2021

Title:

Determination of cellulose degrading capability of bacteria and fungi strains isolated from gut of termite collected in Binh Tan district, Vinh Long province

Từ khóa:

Bình Tân, CMC, *Microcerotermes* sp., phân giải cellulose, ruột mối

Keywords:

Binh Tan district, cellulose-degrading, CMC, gut of termite, *Microcerotermes* sp.

ABSTRACT

Cellulose-degrading bacteria and fungi become more important due to their applications in life, especially in degradation of cellulose rich waste and in production of organic fertilizer. From six termite nests collected in Binh Tan district, Vinh Long province, 28 bacteria strains and 7 fungi strains were isolated. All strains isolated were capable of degrading CMC (carboxymethyl cellulose). In which, some the strains that can degrade CMC with high efficiency include 1BTL6 (61.7%), 3BTT6 (65.8%), 2BTNT5 (61.5%) and 1BTNT3 (60.4%). In addition, strain 2BTNT5 has ability to degrade cellulose from straw for glucose production (0.14 mg/L) after 15 days.

TÓM TẮT

Vi khuẩn và nấm phân giải cellulose càng trở nên quan trọng hơn do có nhiều ứng dụng trong đời sống, đặc biệt trong phân hủy chất thải giàu cellulose và sản xuất phân hữu cơ. Từ 6 tổ mối thu nhận ở huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long đã phân lập được 28 chủng vi khuẩn và 7 chủng nấm đều có khả năng phân giải CMC (carboxymethyl cellulose), trong đó các chủng có khả năng phân giải CMC đạt hiệu quả cao gồm 1BTL6 (61,7%), 3BTT6 (65,8%), 2BTNT5 (61,5%) và 1BTNT3 (60,4%). Thêm vào đó, chủng 2BTNT5 có khả năng phân giải cellulose từ rơm tạo đường glucose (0,14 mg/L) sau 15 ngày.

1. GIỚI THIỆU

Việt Nam là nước có nền nông nghiệp phát triển và có một lượng lớn phế phẩm nông nghiệp thải ra môi trường mỗi năm. 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

rộng, điều này gây ra nhiều hậu quả như 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. Hệ vi sinh vật phân giải cellulose có thể lên men hiếu khí hoặc kỵ khí, bình nhiệt hoặc ái nhiệt, bao

gồm nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn (Võ Văn Phước Quê & Cao Ngọc Diệp, 2011).

Mối là côn trùng sống ở vùng nhiệt đới sử dụng chủ yếu những loại thức ăn có nguồn gốc từ cellulose. Trong khoảng thời gian ngắn, hệ vi sinh vật trong dạ cỏ bò có thể tiêu hóa 60 - 65% cellulose, nhưng trong đường ruột của mối, cellulose có thể được tiêu hóa lên đến 90%. Trong môi trường tự nhiên, nếu không có sự tác động của hệ vi sinh vật thì cellulose phân hủy trong khoảng thời gian rất chậm (Schwarz, 2001). Trong một tổ mối bao gồm mối vua, mối chúa, mối lính, mối thợ và mối cánh. Trong tự nhiên, mối tham gia vào các quá trình phân hủy các chất hữu cơ có nguồn gốc cellulose để tạo thành đường và các hợp chất đơn giản (Nguyễn Đức Khâm và ctv., 2007). Mối vua là những cá thể mối cánh đực nhưng cánh đã rụng sau khi bay giao hoan với mối cái. Mối chúa có đầu nhỏ, bụng to, bộ phận sinh dục phát triển và là cỗ máy sinh sản trong tổ mối. Mối thợ có số lượng đông nhất trong quần thể mối thuộc vào nhóm không sinh sản, có cơ thể nhỏ, các chi phát triển, chiếm số đông (70% - 80% trong đàn mối), gánh vác tất cả các công việc trong tổ mối như kiếm và chế biến thức ăn, xây tổ, chuyên trứng, nuôi mối con và hút nước (Nguyễn Đức Khâm & Hồ Đức Nhuận, 1993). Mối lính được phân hóa từ mối thợ, số lượng không nhiều có nhiệm vụ canh gác,

đánh đuổi kẻ thù bảo vệ đàn mối (Cowie et al., 1989). Việc nuôi dưỡng tộc đoàn mối chủ yếu do mối thợ đảm nhiệm. Đầu tiên, thức ăn qua miệng vào ruột mối thợ, sau đó mối thợ đem thể tích thức ăn có trong cơ thể của chúng đã được enzyme cellulase tiêu hóa hoặc tiêu hóa một phần ựa ra đường miệng hoặc bài tiết ra cuối đường tiêu hóa để mớm cho mối chúa, mối vua, mối lính và mối non. Vùng ruột sau của mối là nơi tiêu hóa cellulose mạnh nhất, tạo thành các chuỗi acid béo ngắn, sau đó được hấp thu và oxy hóa (Nguyễn Đức Khâm & Hồ Đức Nhuận, 1993). Chính vì vậy, việc tìm ra những chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose và tinh bột từ ruột mối từ đó đánh giá khả năng phân giải cellulose từ rơm rạ của chúng là rất cần thiết để xử lý nguồn chất thải, đáp ứng nhu cầu năng lượng trong tương lai.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Sáu tổ mối đã được thu ở 3 xã là Tân Thành, Tân Bình, Tân Quới thuộc huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long và đưa về phòng thí nghiệm thuộc Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ để nghiên cứu. Rơm được thu tại xã Tân Thành, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long từ giống lúa IR50404 sau 2 ngày thu hoạch.



Hình 1. Mối (*Microcerotermes* sp.): Mối lính (trái) và Mối thợ (giữa và phải)

2.2. Dụng cụ, thiết bị

Các thiết bị, dụng cụ dùng trong thí nghiệm bao gồm: tủ cấy Esco (class II BSC, Singapore), tủ ủ vi sinh vật (Memmer, Đức), nồi hấp khử trùng SA-300VL (Hyayama, Nhật Bản), tủ lạnh trữ mẫu Sanyo (MDF-U334-PE, Nhật Bản), máy lắc (Stuart, Anh), máy vortex (VELP Scientifica, Châu Âu), kính hiển vi (3CO3634), cân phân tích (Mellter Toler, Thụy Sĩ), máy đo quang phổ UV-VIS (Multiskan Go 96 giếng), đĩa petri có nắp đậy, tủ lạnh, ống nghiệm, ống đong, pipet, micropipette,

que cấy, ống nghiệm có nắp cao su, ống đong, bình tam giác, micropipette, lame, lamelle.

2.3. Hóa chất

Hóa chất dùng để xử lý mẫu mối gồm: cồn 70%, nước cất vô trùng; hóa chất dùng nhuộm Gram tế bào vi khuẩn gồm: iodine (I), fuchsin ($C_{20}H_{20}N_3.HCl$), crystal violet ($C_{25}N_3H_{30}Cl$); hóa chất dùng nuôi tăng sinh khối vi khuẩn: TSB – Merck. Môi trường phân lập vi khuẩn: 1 g K_2HPO_4 ; 2 g $(NH_4)_2SO_4$; 1 g $MgSO_4.7H_2O$; 0,5 g KCl; 0,02 g $CaCl_2$; 0,001 g $MnSO_4.4H_2O$; 0,01 g $FeSO_4.7H_2O$; 0,5 g bột giấy lọc; 1000 mL H_2O ; Môi trường CMC

(Carboxy Methyl Cellulose): 1 g K_2HPO_4 ; 1 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,5g $MgSO_4.7H_2O$; 0,001 g NaCl; 10g CMC; 500 mL H_2O . Môi trường tinh bột: 1 g K_2HPO_4 ; 1 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,5g $MgSO_4.7H_2O$; 0,001g NaCl; 10g tinh bột; 500 mL H_2O (Ulrich *et al.*, 2008). Môi trường nuôi vi khuẩn trong rom: 1 g K_2HPO_4 ; 2 g $(NH_4)_2SO_4$; 1 g $MgSO_4.7H_2O$; 0,5 g KCl; 0,02 g $CaCl_2$; 0,001 g $MnSO_4.4H_2O$; 0,01 g $FeSO_4.7H_2O$; 1 g rom khô; 1000 mL H_2O .

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phân lập vi khuẩn, nấm trong ruột mối

Mỗi tổ mối có sự phân chia thành phần gắn liền với chức năng, khả năng phân giải cellulose của mỗi thợ và mối lính là tốt nhất (Tokuda *et al.*, 2014) nên mỗi tổ mối chọn 10 mối thợ và 10 mối lính tiến hành phân lập riêng từng loại mối theo quy trình như sau: sử dụng cồn 70° để khử trùng mối trong khoảng 30 giây và rửa lại với nước cất vô trùng. Dùng hai kẹp, một kẹp cố định phần đầu mối, kẹp khác kéo ruột mối ra khỏi hậu môn và chấm lên đĩa môi trường (mỗi loại mối chấm riêng từng đĩa). Ủ các đĩa này ở nhiệt độ 32°C trong 48 giờ trong điều kiện hiếu khí. Chọn từng khuẩn lạc riêng biệt và cấy chuyển sang đĩa môi trường mới. Tiến hành cấy truyền nhiều lần bằng phương pháp cấy ria đến khi rỗng. Kiểm tra độ rỗng dưới kính hiển vi. Mẫu rỗng thu được đem cấy trừ mẫu.

Các đặc điểm của khuẩn lạc được mô tả theo các tiêu chí: hình dạng, màu sắc, độ nổi, dạng bia và đo đường kính khuẩn lạc (sau 72 giờ nuôi cấy).

Nhuộm Gram tế bào vi khuẩn: lấy một ít sinh khối từ khuẩn lạc vào giữa lam kính có sẵn nước cất khử trùng, giã đều, cố định mẫu trên ngọn lửa đèn cồn. Tiếp theo, nhỏ dung dịch tím kết tinh (crystal violet) lên mẫu, để 1 phút. Tiếp tục, rửa bằng cồn 70° thật nhanh để tẩy màu cho đến khi giọt còn cuối cùng không còn màu tím rồi lại rửa bằng nước cất, chậm nhẹ. Tiếp theo, nhỏ dung dịch Fuchsin lên mẫu, để yên trong 1 phút và rửa lại bằng nước cất, để khô tự nhiên. Mẫu được quan sát bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000 lần. Vi khuẩn Gram âm bắt màu hồng, vi khuẩn Gram dương bắt màu xanh.

Quan sát sợi nấm và bào tử của nấm: chuẩn bị lame, đĩa petri và nước cất tất cả đã được vô trùng. Tiến hành đặt lame vào đĩa petri có lót giấy thấm đã được làm ẩm bằng nước cất vô trùng. Đặt lên lame một miếng thạch mỏng, cấy nấm vào 2 góc đối của miếng thạch đẩy đĩa petri lại và ủ sau 48 giờ. Lấy lame đã chứa nấm nhuộm bằng thuốc thử xanh methylen. Mẫu được quan sát dưới kính hiển vi

quang học tiến hành ghi nhận về các đặc điểm sợi nấm và bào tử (Cao Ngọc Diệp & Nguyễn Hữu Hiệp, 2002).

2.4.2. Kiểm tra khả năng phân giải CMC của các chủng vi sinh vật

Bước đầu đánh giá về khả năng phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn hoặc nấm được phân lập từ ruột mối nhằm chọn ra các chủng có khả năng phân giải CMC cao làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

Chủng 1 khuẩn lạc của mỗi chủng vi khuẩn hoặc nấm vào 3 ml môi trường TSB lỏng, lắc với vận tốc 125 vòng/phút. Sau 12 giờ, đo OD từng mẫu ở bước sóng 600 nm. Sau đó, pha loãng mẫu để điều chỉnh sinh khối các chủng vi khuẩn hoặc nấm như nhau ($OD_{600nm} = 0,7$) trước khi chủng vào môi trường CMC-agar để phân tích khả năng phân hủy CMC. Nhỏ 10 μ l dịch nuôi vi khuẩn hoặc nấm của mỗi mẫu vào môi trường CMC-agar (mỗi đĩa nhỏ 3 giọt tương ứng 3 lần lặp lại), ủ trong 3 ngày ở 32°C.

Khả năng phân giải CMC của vi khuẩn hoặc nấm được xác định bằng cách nhuộm đĩa môi trường với dung dịch Congo Red (1g/L) trong 15 phút, tiếp đó rửa với dung dịch NaCl 1M. Vi sinh vật có khả năng phân giải CMC sẽ tạo vùng không màu (halo) xung quanh khuẩn lạc. Khả năng phân giải CMC của vi sinh vật (%) được xác định bằng công thức:

$$\left(\frac{\text{Đường kính halo} - \text{Đường kính khuẩn lạc}}{\text{Đường kính halo}} \right) \times 100\%$$

2.4.3. Kiểm tra khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật

Dựa vào thí nghiệm kiểm tra khả năng phân giải CMC. Chọn ra các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải CMC trên 50% để tiến hành thí nghiệm kiểm tra khả năng phân giải cellulose từ rom.

Mỗi chủng vi sinh vật được chọn cho vào 3 mL môi trường TSB lỏng lắc với vận tốc 125 vòng/phút. Sau 12 giờ, đo OD từng mẫu ở bước sóng 600 nm. Sau đó, pha loãng mẫu để điều chỉnh sinh khối các dòng vi khuẩn hoặc nấm như nhau ($OD_{600nm} = 0,7$).

Cân 1 g rom, cắt nhỏ khoảng 1-2 cm, 3 mL dịch vi sinh vật đã chỉnh mật độ quang và 22 mL nước cất đã khử trùng được cho vào bình tam giác (mỗi chủng vi sinh vật tiến hành với 3 bình tam giác, tương ứng 3 lần lặp lại).

Đề bình tam giác trong điều kiện tối và nhiệt độ phòng (khoảng 27 - 32°C). Thu dung dịch mẫu và đo lượng glucose sinh ra tại bước sóng OD_{490nm} ở các thời điểm 5, 10, 15 ngày.

2.5. Phương pháp phân tích

2.5.1. Xây dựng đường chuẩn glucose

Pha dung dịch chuẩn glucose có nồng độ 1.000 ppm, từ đó pha dung dịch gốc có nồng độ 100 ppm.

Từ dung dịch gốc pha dãy dung dịch chuẩn có nồng độ từ 0 - 100 ppm Bảng 1. Sau khi pha dãy dung dịch chuẩn, lắc đều ống nghiệm trong 30 giây, để nguội và xác định mật độ quang OD_{490nm}. H₂SO₄

Bảng 1. Thành phần hóa chất đường chuẩn glucose

Ống nghiệm	Nồng độ glucose gốc (ppm)	V _{dd} glucose gốc (μL)	V _{Methanol 80%} (μL)	V _{Phenol 5%} (mL)	V _{H₂SO₄ dd} (mL)
1	0	0	1000	1	5
2	10	100	900	1	5
3	20	200	800	1	5
4	30	300	700	1	5
5	40	400	600	1	5
6	50	500	500	1	5
7	60	600	400	1	5
8	70	700	300	1	5
9	80	800	200	1	5
10	90	900	100	1	5
11	100	1000	0	1	5

Từ các nồng độ glucose đã biết và giá trị mật độ quang đo được, thiết lập đường chuẩn về mối tương quan giữa nồng độ glucose và mật độ quang. Sử dụng phần mềm Excel 2010, vẽ đồ thị xác định đường chuẩn glucose, phương trình đường chuẩn dạng: $y = ax + b$.

2.5.2. Xác định nồng độ glucose trong dịch rom đã chủng vi sinh vật

Hút 1 mL dung dịch mẫu cho vào bình định mức 10 ml, thêm tiếp dung dịch methanol 80% thu được dung dịch A. Hút 50 μL dung dịch A + 450 μL methanol 80% + 500 μL dung dịch phenol 5% + 2,5 mL H₂SO₄ đậm đặc cho vào ống nghiệm khác. Trộn đều dung dịch thu được trong 30 giây, để ở nhiệt độ phòng 15 phút. Đo mật độ quang ở bước sóng 490 nm so với mẫu trắng (500 μL dung dịch methanol 80% + 500 μL dung dịch phenol 5% + 2,5 mL H₂SO₄ đậm đặc). Nồng độ glucose được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn glucose và công

$$\text{thức tương ứng: } X = \frac{V.C.100}{m.10^6}$$

Trong đó, V: Thể tích dung dịch mẫu; C: Nồng độ glucose quy đổi từ phương trình đường chuẩn; m: Khối lượng ban đầu của mẫu.

2.6. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Kết quả của các thí nghiệm được phân tích thống kê trên phần mềm Minitab.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

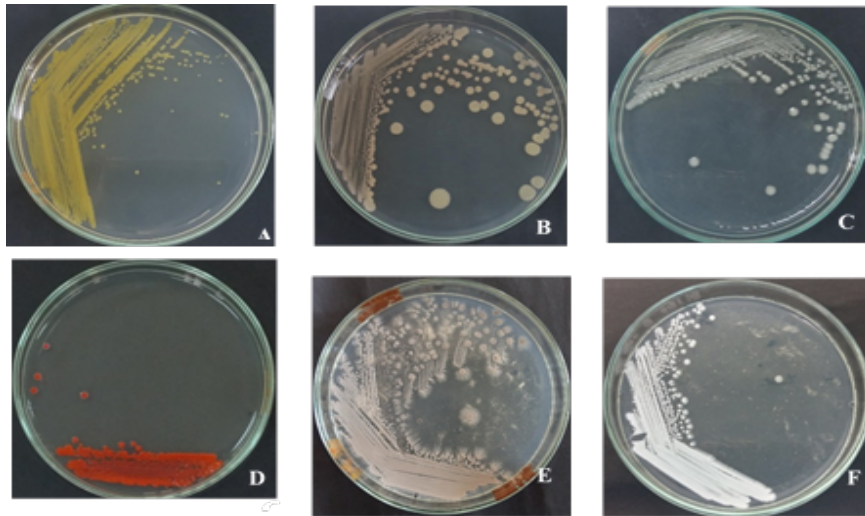
3.1. Kết quả phân lập vi sinh vật từ ruột mối

Từ ruột mối thợ và ruột mối lính ở 6 tổ mối thu được ở huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long đã phân lập được 28 chủng vi khuẩn và 7 chủng nấm (Bảng 2), trong đó 18/28 chủng vi khuẩn phân lập từ ruột mối thợ (64,3%) và 6/7 chủng nấm (chiếm 85,7%), 10/28 chủng vi khuẩn phân lập từ ruột mối lính (36,7%) và 1 chủng nấm (14,3%). Như vậy, số lượng vi khuẩn phân lập từ ruột mối thợ nhiều hơn ruột mối lính có thể liên quan đến chức năng dinh dưỡng của mối thợ. Các mối thợ có nhiệm vụ chính trong nuôi dưỡng, chăm sóc cho cả đàn mối nên hệ vi khuẩn trong ruột mối thợ sẽ phong phú hơn so với các mối lính để hỗ trợ quá trình tiêu hóa thức ăn giàu cellulose của mối (Michael, 2001).

Bảng 2. Kết quả phân lập các chủng vi sinh vật từ ruột mối

Tổ	Kí hiệu các chủng vi sinh vật	Số chủng vi sinh vật		
		Mối lính	Mối thợ	Tổng
1	(1BTL1, 2BTL1); (3BTT1, 4BTT1, 5BTT1); (1BTNT1)	2	4	6
2	(1BTL2, 2BTL2); (3BTT2, 4BTT2, 5BTT2); (1BTNT2)	2	4	6
3	(1BTL3, 2BTL3); (3BTT3, 4BTT3, 5BTT3); (1BTNT3)	2	4	6
4	(1BTL4, 2BTL4); (3BTT4, 4BTT4, 5BTT4); (1BTNT4)	2	4	6
5	(1BTL5, 2BTL5); (3BTT5, 4BTT5, 5BTT5); (1BTNT5, 2BTNT5)	3	4	7
6	(1BTL6), (2BTT6, 3BTT6); (1BTNT6)	1	3	4

Ghi chú: BT: Bình Tân; L: Lính; T: Thợ; N: Nấm (Ví dụ: 1BTL1: Chủng vi khuẩn 1 phân lập từ mối lính của tổ 1 ở Bình Tân, 1BTNT1: Chủng nấm 1 phân lập từ mối thợ của tổ 1 ở Bình Tân).



Hình 2. Một số dạng khuẩn lạc của vi khuẩn, nấm phân lập được từ ruột mối

- (A) Khuẩn lạc vi khuẩn 5BTT3 hình tròn, vàng, mô, nguyên
- (B) Khuẩn lạc vi khuẩn 1BTL6 hình tròn, trắng ngà, phẳng, nguyên
- (C) Khuẩn lạc vi khuẩn 5BTT2 hình tròn, trắng sữa, lồi, nguyên
- (D) Khuẩn lạc vi khuẩn 4BTT1 hình tròn, đỏ, mô, nguyên
- (E) Khuẩn lạc nấm 1BTNT5 không đều, màu nâu, bề mặt xốp
- (F) Khuẩn lạc nấm 1BTNT1 tròn, màu trắng phấn

Hình 2 mô tả đặc điểm khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn và nấm phân lập được từ ruột mối. Kết quả cho thấy phần lớn khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập được đều có hình tròn (85,7%), kích thước không đều (14,3%), bìa nguyên (96,4%), độ nổi dạng mô (42,7%), lồi (50%), phẳng (7,1%). Khuẩn lạc có màu trắng sữa (35,7%), trắng đục (7,1%), trắng trong (3,3%), vàng (39,3%), hồng (7,1%) và đỏ (7,1%). Kết quả nhuộm Gram của 28 chủng vi khuẩn cho thấy có 17/28 chủng vi khuẩn que ngắn (60,7%), 10/28 chủng vi khuẩn hình cầu (35,7%), 1/28 chủng vi khuẩn hình que dài (3,6%), 26/28 chủng vi khuẩn có kiểu sắp xếp rời (92,7%), 1/28 kiểu sắp xếp chuỗi đôi (3,6%), 1/28 kiểu sắp xếp chuỗi rời (3,6%), 19/28 chủng vi khuẩn Gram dương (67,9%), 11/28 chủng vi khuẩn Gram âm (32,1%).

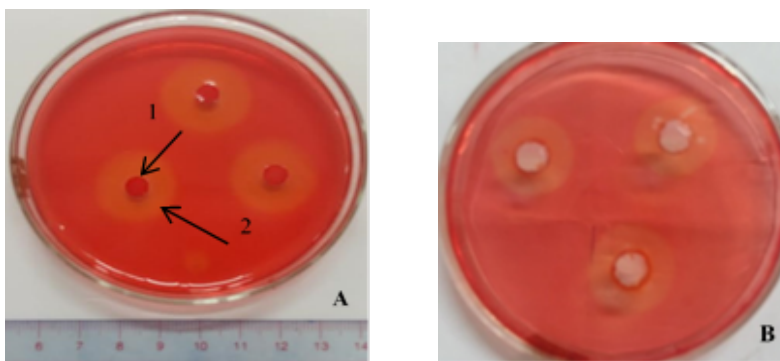
Phần lớn khuẩn lạc của các chủng nấm phân lập có hình dạng không đều (71,4%), dạng tròn (28,6%), màu trắng phấn (57,1%), trắng ngà (28,6%), màu nâu (14,3%). Bề mặt xốp (14,3%), bề mặt phẳng (85,7%). Phần lớn các chủng nấm đều không có sợi nấm 6/7 (85,7%), chỉ có 1 chủng có sợi nấm (14,3%).

3.2. Khả năng phân giải CMC của các chủng vi khuẩn, nấm phân lập được

Kết quả đánh giá khả năng phân giải CMC của các chủng vi khuẩn và nấm thể hiện qua vòng phân giải không màu quanh khuẩn lạc trên môi trường CMC agar khi nhuộm với Congo Red (Hình 2) được chia thành 2 nhóm, trong đó nhóm 1 là nhóm có khả năng phân giải dưới 50% và nhóm 2 là nhóm có khả năng phân giải từ 50% trở lên.

Từ 28 chủng vi khuẩn phân lập được trong ruột mối, tất cả đều có khả năng phân giải CMC, trong đó nhóm 1 có 21/28 chủng vi khuẩn (75%) và nhóm 2 có 7/28 chủng vi khuẩn (25%). Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải CMC cao là 3BTT6 (65,6%), 1BAL6 (61,7%) và 3BTT4 (59,7%). Dựa vào khả năng phân giải CMC, chọn được 7 chủng vi khuẩn phân giải CMC cao trên 50% để tiến hành thí nghiệm phân giải cellulose từ rơm.

Tất cả 7 chủng nấm phân lập được trong ruột mối cho thấy tất cả đều có khả năng phân giải CMC, trong đó nhóm 1 có 4/7 chủng nấm (57,1%); và nhóm 2 có 3/7 chủng nấm (42,9%). Trong đó có 3 chủng phân giải CMC cao là 2BTNT5 (61,5%), 1BTNT3 (60,4%) và 1BTNT1 (57,3%). Dựa vào khả năng phân giải CMC, chọn 3 chủng nấm phân giải CMC cao trên 50% để tiến hành thí nghiệm phân giải cellulose từ rơm.



Hình 3. Khả năng phân giải CMC của (A) chủng vi khuẩn 1BTL6 và (B) chủng nấm 2BTNT5

(1: Vòng phát triển của vi khuẩn, 2: Vòng tròn phân giải)

Trong đó, có 5/7 chủng vi khuẩn (71,4%), 2/3 chủng nấm (66,7%) được phân lập từ ruột mỗi thợ; có 2/7 chủng vi khuẩn (28,6%) và 1/3 chủng nấm (33,3%) từ ruột mỗi lính (Bảng 1). Khả năng phân giải CMC cao nhất là 2 chủng 3BTT6 (65,6%), 2BTNT5 (61,5%). Vi sinh vật trong ruột mỗi thợ tiết ra enzyme endo-1,4-β-glucanase (Michael, 2001) nhiều hơn vi sinh vật từ ruột mỗi lính nên khả năng

phân giải CMC của vi sinh vật phân lập từ ruột mỗi thợ cũng cao hơn so với các vi sinh vật phân lập từ ruột mỗi lính.

Bảng 2 và 3 trình bày các đặc điểm khuẩn lạc, tế bào của các chủng vi khuẩn, nấm có khả năng phân giải CMC lớn hơn 50%.

Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc, tế bào, nhuộm Gram và khả năng phân giải CMC của 7 chủng vi khuẩn

TT	Chủng vi khuẩn	Khuẩn lạc				Kích thước (mm)	Hình dạng tế bào	Gram	Khả năng phân giải CMC (%)
		Hình dạng	Màu sắc	Dạng bìa	Độ nổi				
1	1BTL2	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	1	Cầu	+	54,4 ^{cd}
2	5BTT2	Tròn	Trắng sữa	Nguyên	Lài	5	Que ngắn	+	50,9 ^d
3	4BTT3	Tròn	Trắng sữa	Nguyên	Mô	1	Que ngắn	+	53,7 ^{cd}
4	3BTT4	Tròn	Trắng sữa	Nguyên	Lài	4	Que ngắn	-	59,2 ^{bc}
5	5BTT5	Không đều	Trắng sữa	Nguyên	Lài	5	Cầu	-	59,3 ^{bc}
6	1BTL6	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Phẳng	7	Que dài	+	61,7 ^{ab}
7	3BTT6	Tròn	Trắng sữa	Nguyên	Mô	1	Que ngắn	-	65,6 ^a

Ghi chú: Các giá trị trên cùng một cột có một mẫu tự theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

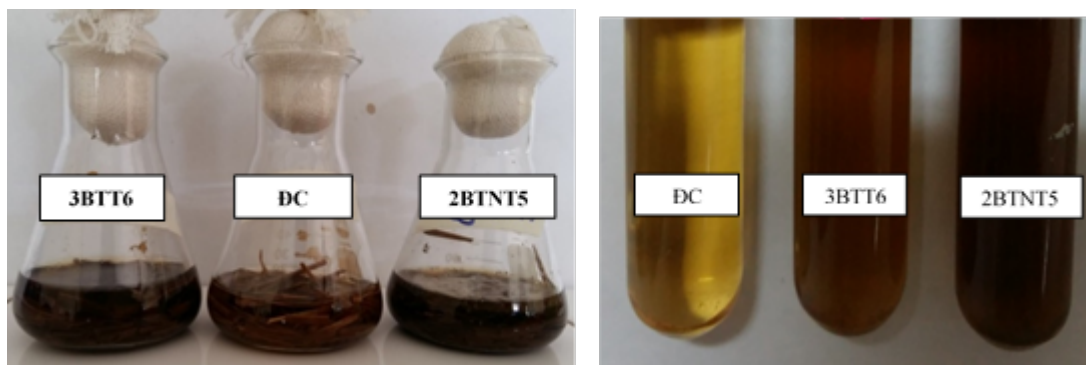
Bảng 3. Đặc điểm khuẩn lạc, sợi nấm và bào tử của 3 chủng nấm

TT	Chủng nấm	Khuẩn lạc				Sợi nấm	Bào tử	Khả năng phân giải CMC (%)
		Màu sắc	Bề mặt	Hình dạng	Kích thước (mm)			
1	1BTNT1	Trắng ngà	Phẳng	Không đều	2	Không	Có	57,3 ^b
2	1BTNT3	Trắng phấn	Phẳng	Không đều	2	Không	Có	61,5 ^a
3	1BTNT4	Trắng phấn	Phẳng	Tròn	5	Không	Có	60,4 ^a

Ghi chú: Các giá trị trên cùng một cột có một mẫu tự theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Các chủng vi khuẩn và nấm có khả năng phân giải CMC trên 50% được sử dụng để kiểm tra khả năng phân giải cellulose trên cơ chất bột rom thông qua việc đo lượng đường glucose được sinh ra do vi sinh vật phân hủy bột rom. Kết quả cho thấy tất cả 10 chủng vi sinh vật (7 chủng vi khuẩn và 3 chủng

nấm) có khả năng phân giải CMC trên 50% đều phân giải được cellulose của rom nhưng khả năng phân giải cellulose khác nhau giữa các chủng vi sinh vật. Đồng thời, qua khảo sát ở các thời điểm 5, 10, 15 ngày cho thấy vi sinh vật thể hiện khả năng phân giải cellulose cao nhất ở thời điểm 15 ngày.



Hình 4. Rom được phân giải ở thời điểm 10 ngày

(ĐC: Không chủng vi khuẩn hoặc nấm)

Bảng 4. Hàm lượng đường glucose tạo ra của các chủng nấm và vi khuẩn sau khi phân giải cellulose từ rom sau 5, 10, 15 ngày

STT	Chủng vi khuẩn	Hàm lượng đường glucose trung bình (mg/L)		
		5 ngày	10 ngày	15 ngày
1	1BTL2	0,08 ^a	0,13 ^a	0,10 ^{ab}
2	5BTT2	0,09 ^a	0,09 ^b	0,10 ^{ab}
3	4BTT3	0,09 ^a	0,09 ^b	0,11 ^{ab}
4	3BTT4	0,07 ^{ab}	0,10 ^{ab}	0,10 ^{ab}
5	5BTT5	0,09 ^a	0,09 ^b	0,10 ^{ab}
6	1BTL6	0,08 ^{ab}	0,09 ^b	0,10 ^{ab}
7	3BTT6	0,08 ^a	0,09 ^b	0,10 ^{ab}
8	1BTNT3	0,09 ^a	0,10 ^b	0,11 ^{ab}
9	2BTNT5	0,09 ^a	0,11 ^b	0,14 ^a
10	1BTNT1	0,08 ^a	0,09 ^b	0,10 ^{ab}
11	ĐC	0,03 ^b	0,05 ^c	0,06 ^c

Ghi chú: Các giá trị trên cùng một cột có một mẫu tự theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Bảng 4 trình bày kết quả lượng đường glucose sinh ra từ quá trình phân giải cellulose rom sau 5, 10, 15 ngày. Kết quả cho thấy lượng đường do vi khuẩn và nấm phân giải cellulose tạo ra tăng dần từ 5, 10, 15 ngày làm cho hàm lượng glucose biến động theo hướng tăng dần theo thời gian. Tuy nhiên hàm lượng đường được sinh ra bắt đầu giảm xuống ở thời điểm 15 ngày đối với 2 chủng vi khuẩn 1BTL2 (0,10 mg/L) và 3BTT4 (0,10 mg/L).

Sau 5 ngày, có 5/10 chủng vi sinh vật cho hàm lượng đường 0,09 mg/L là: 5BTT2 (0,09 mg/L), 4BTT3 (0,09 mg/L), 5BTT5 (0,09 mg/L), 1BTNT3 (0,09 mg/L) và 2BTNT5 (0,09 mg/L). Sau 5 ngày chủng các chủng vi sinh vật vào môi trường có cơ chất là rom thì hàm lượng đường tạo ra chưa cao, có thể do thời gian các chủng vi sinh mới bắt đầu thích nghi với môi trường mới nên hoạt động chưa mạnh.

Sau 10 ngày, tất cả các chủng vi sinh vật đều cho hàm lượng đường trên 0,09 mg/L, trong đó có 4

chủng vi sinh vật có hàm lượng đường trên 0,10 mg/L: 1BTL2 (0,13), 3BTT4 (0,10 mg/L), 1BTNT3 (0,10 mg/L) và 2BTNT5 (0,11 mg/L). Ở thời gian này lượng đường tạo ra đã bắt đầu tăng cho thấy các chủng vi sinh vật đã thích nghi với môi trường với cơ chất là rom.

Sau 15 ngày, 10/10 chủng vi sinh vật cho hàm lượng đường trên 0,10 mg/L. Riêng chủng 2BTNT5 (0,14 mg/L) có hàm lượng đường sinh ra cao nhất phù hợp với khả năng phân giải CMC. Tuy nhiên có 2 chủng vi khuẩn ở thời điểm 15 ngày có hàm lượng đường bắt đầu giảm xuống là 1BTL2 (0,10 mg/L) và 3BTT4 (0,10 mg/L). Bên cạnh đó, ở ngày thứ 15 thì hàm lượng glucose tạo ra cao (0,10 - 0,14 mg/L) ở các chủng vi sinh vật được phân lập từ ruột mỗi thợ kết quả này phù hợp với kết quả kiểm tra khả năng phân giải CMC của các chủng vi sinh vật trong ruột mỗi thợ cao thì hàm lượng đường tạo ra cũng cao. Những nghiên cứu trước đây trên cho thấy vi khuẩn sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất sau 42-72

giờ nuôi cấy (Tăng Thị Chính và ctv, 1999). Các chủng nấm sợi sinh tổng hợp cellulose mạnh nhất sau 144 giờ nuôi cấy (Đặng Minh Hằng, 1999).

Vi khuẩn có khả năng phân huỷ cellulose, tuy nhiên không cao bằng nấm. Nguyên nhân là do số lượng enzyme tiết ra môi trường của vi khuẩn thường ít và thành phần các loại enzyme không đầy đủ (Michael, 2001). Nấm tiết ra nhiều loại khác nhau và chúng phối hợp với nhau để phân giải cơ chất trong môi quan hệ cộng sinh (Lê Gia Hy, 2010). Ngoài ra khả năng phân giải cellulose không phụ thuộc vào khả năng phân giải CMC do một số chủng vi sinh vật chỉ có khả năng sinh ra một loại enzyme nhất định, nên khi trên môi trường CMC thì chúng có hoạt tính mạnh nhưng khi chùng vào môi trường có cơ chất là rom thì khả năng phân giải không cao bằng những chủng khác (Michael, 2001). Do những chủng khác có thể có một phức hệ enzyme có khả năng phân giải nhiều thành phần trong rom nên lượng đường glucose tạo ra cao hơn.

4. KẾT LUẬN

Từ 6 tổ mỗi thu nhận ở huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long đã phân lập được 28 chủng vi khuẩn và 7 chủng nấm đều có khả năng phân giải CMC, trong đó các chủng có khả năng phân giải CMC đạt hiệu quả cao là: 1BTL6 (61,7%), 3BTT6 (65,8%), 2BTNT5 (61,5%) và 1BTNT3 (60,4%). Chủng 2BTNT5 tạo ra lượng đường glucose là 0,14 mg/L ở thời điểm 15 ngày. Nấm có khả năng phân giải cellulose tốt hơn vi khuẩn trong môi trường cơ chất là rom. Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật được phân lập từ ruột mối thợ tốt hơn so với chủng được phân lập từ ruột mối lính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cao Ngọc Điệp & Nguyễn Hữu Hiệp. (2002). *Vi sinh vật đại cương*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.

Cowie, R., Logan, W. & Wood, G. (1989). Termite (Isoptera) damage and control in tropical forestry with special reference to Africa and Indo-Malaysia: A review. *Bulletin of Entomological Research*, 79(2), 173-184.

Đặng Minh Hằng. (1999). Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của một số chủng vi sinh vật để xử lý rác. *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 1999* (tr. 214-218). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Tokuda, G., Yuuri T., Kumiko K., Seikou S., Sigeharu M., Nathan L. & Jun K. (2014). Metabolomic profiling of ¹³C-labelled cellulose digestion in a lower termite: insights into gut symbiont function. *Biological Sciences*, 22, 281-289.

Lê Gia Hy. (2010). *Công nghệ vi sinh vật xử lý chất thải*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

Michael, F. D. (2001). Speciation of termite gut protists: the role of bacterial symbionts. *International journal of Microbiology*, 4, 203-208.

Nguyễn Đức Khâm & Hồ Đức Nhuận. (1993). *Đời sống ong, kiến, mối*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.

Nguyễn Đức Khâm, Nguyễn Tân Vương, Trịnh Văn Hạnh, Nguyễn Văn Quang, Lê Văn Triển, Nguyễn Thủy Hiền, Vũ Văn Nghiê, Ngô Trường Sơn & Võ Thu Hiền. (2007). *Động vật chí Việt Nam. Mối: bộ cánh đều – Isoptera*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Schwarz, W. H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5), 634-649.

Tăng Thị Chính, Lý Kim Bằng & Lê Gia Hy. (1999). Nghiên cứu sản xuất cellulase của một số chủng vi sinh vật ưa nhiệt phân lập từ bả ủ rác. *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 1999* (tr. 790-796). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Ulrich A., Klimke G. & Wirth S. (2008). Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application. *Microbial Ecology*, 55(3), 512-522.

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*, 18, 177-184.