

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY CELLULOSE VÀ HEMICELLULOSE TRONG RUỘT MỎI *COPTOTERMES GESTROI* CƯ TRÚ TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM

Nguyễn Thị Thảo¹, Đỗ Thị Huyền², Trương Nam Hải² ✉

¹Trường Đại học Vinh, Nghệ An

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: tnhai@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 10.6.2019

Ngày nhận đăng: 26.9.2019

TÓM TẮT

Ở các loài mối bậc thấp như *Coptotermes gestroi*, cellulose và hemicellulose được thủy phân bởi cellulase và hemicellulase từ vi khuẩn, vi khuẩn cổ, động vật nguyên sinh và nấm sống ở ruột sau trong ống tiêu hóa của mối. Trong đó, enzyme thủy phân chủ yếu được tiết ra bởi động vật nguyên sinh. Từ bộ dữ liệu trình tự DNA đa hệ gen vi sinh vật ruột mối *C. gestroi* thu thập ở miền Bắc Việt Nam (125.423 khung đọc mở - open reading frame- ORF) và bằng phần mềm MEGA, 100.340 ORF được dự đoán có nguồn gốc từ 1.368 loài vi khuẩn gồm 628 chi, 217 họ, 97 bộ, 41 lớp và 22 ngành (Do *et al.*, 2014). Trong số này, 2.131 ORF (2,12%) thuộc 24 loài vi khuẩn (chiếm 1,75% tổng số loài vi khuẩn) thuộc 11 họ, 9 bộ, 8 lớp và 5 ngành có khả năng sinh cellulase, 679 ORF thuộc 18 loài vi khuẩn nằm trong 8 họ, 6 bộ, 5 lớp, 4 ngành được dự đoán có khả năng sinh hemicellulase. Số loài có khả năng sinh cellulase chủ yếu thuộc ngành Firmicutes (15/24 loài), phần lớn thuộc lớp Clostridia, bộ Clostridiales. Loài chiếm ưu thế nhất có khả năng sinh cellulase là *Pseudomonas fluorescens* (1.258 ORF) thuộc bộ Pseudomonadaceae. Trong 18 loài sinh hemicellulase, loài chiếm ưu thế nhất là *Clostridium thermocellum* (113 ORF) thuộc ngành Firmicutes, sau đó là 3 loài thuộc ngành Bacteroidetes. Các vi khuẩn có khả năng phân hủy cả cellulose, hemicellulose được ước đoán là *C. thermocellum*, *Ruminococcus flavefaciens* và *Bacillus subtilis*. Kết quả nghiên cứu này đã góp phần cung cấp dữ liệu về thành phần của vi khuẩn phân hủy cellulose và hemicellulose sống trong đường ruột mối *C. gestroi*.

Từ khóa: *Coptotermes gestroi*, vi khuẩn, cellulase, hemicellulase, metagenomics.

MỞ ĐẦU

Mối đóng một vai trò quan trọng đối với hệ sinh thái bởi khả năng phân hủy sinh khối lignocellulose và góp phần vào chu trình carbon. Tuy nhiên, mối cũng là một trong những sinh vật gây hại đối với các công trình kiến trúc của con người. Trong đó, *C. gestroi* là một trong những loài mối nguy hại nhất ở vùng đồng bằng. Cũng như những loài mối thuộc chi *Coptotermes*, hệ vi sinh vật sống trong đường ruột của loài mối này đóng vai trò quan trọng trong việc tiêu hóa hiệu quả nguồn thức ăn lignocellulose để cung cấp chất dinh dưỡng cho mối (Brune, 2011).

Hệ vi sinh vật trong ruột mối rất đa dạng, bao gồm rất nhiều ngành khác nhau và chủ yếu là vi sinh vật không thể nuôi cấy (Brune, 2014). Ở 2 loài mối bậc thấp phổ biến nhất là *Coptotermes formosanus*

và *Reticulitermes speratus*, vi khuẩn đường ruột của chúng chủ yếu thuộc các ngành Bacteroidetes, Spirochaetes, Fibrobacters, Elusimicrobia, Firmicutes và Proteobacteria. Những ngành này đều có các loài có khả năng phân hủy lignocellulose, ví dụ *Bacillus* thuộc ngành Firmicutes tiết endoglucanase (Mathew *et al.*, 2011), *Pseudotrichonympha grassii* thuộc ngành Bacteroidetes có khả năng tạo ra cellulase (Nakashima *et al.*, 2002). Tuy nhiên, tỷ lệ các loài thuộc các ngành này ở 2 loài hoàn toàn khác nhau. Trong đó, Bacteroidetes chiếm tỷ lệ rất cao trong đường ruột của *Coptotermes formosanus*, còn Spirochaetes chiếm ưu thế trong đường ruột của *R. speratus* (Brune, 2014).

Metagenomics, thông qua việc giải trình tự toàn bộ DNA đa hệ gen, là một phương pháp hiệu quả cho

phép nghiên cứu sự đa dạng loài các vi khuẩn không nuôi cấy được từ hệ sinh thái trong các môi trường tự nhiên. Chính vì vậy, số lượng các nghiên cứu đa hệ gen của khu hệ vi sinh vật dựa trên việc giải trình tự toàn bộ hệ gen bằng máy giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing - NGS) không ngừng gia tăng kể từ khi DNA đa hệ gen đầu tiên của các vi sinh vật sống trong hệ thống thoát nước của mô acid được giải trình tự (Tyson *et al.*, 2004). Cho đến nay, nhiều DNA đa hệ gen của vi sinh vật ở các môi trường khác nhau đã được đánh giá đa dạng vi sinh vật cũng như đa dạng di truyền như môi trường nước biển (Kennedy *et al.*, 2008), ruột người (Gill *et al.*, 2006; Arumugam *et al.*, 2011), dạ cỏ bò (Hess *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2012), đất compost (Martins *et al.*, 2013) và đất (Xu *et al.*, 2014)...

Ở Việt Nam, hơn 100 loài mới khác nhau đã được mô tả (Nguyễn Đức Khâm *et al.*, 2007). Tuy nhiên, hệ vi sinh vật nói chung và đa dạng vi khuẩn phân hủy lignocellulose nói riêng trong đường ruột của chúng vẫn chưa được nghiên cứu. Năm 2013, phòng Kỹ thuật di truyền, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam lần đầu tiên bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới đã giải trình tự DNA đa hệ gen của vi sinh vật sống trong ruột mỗi *C. gestroi* thu tại năm địa điểm tại Hà Nội và một địa điểm tại Hưng Yên (Do *et al.*, 2014). Bằng các công cụ tin sinh học, 125.423 ORF từ 5,4 Gb trình tự đã được ước đoán trong đó có 100.340 ORF được dự đoán là có nguồn gốc từ vi khuẩn, 533 ORF được dự đoán có nguồn gốc từ vi khuẩn cổ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá đa dạng các vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose và hemicellulose trong ruột loài mỗi *C. gestroi* thu thập ở miền Bắc Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Bộ dữ liệu trình tự DNA đa hệ gen vi sinh vật ruột mỗi *C. gestroi* thu thập ở miền Bắc Việt Nam và danh sách các đơn vị taxon vi khuẩn đã được dự đoán bằng các phần mềm tin sinh học.

Phương pháp phân tích đa dạng vi sinh vật ruột mỗi *C. gestroi* từ dữ liệu giải trình tự đa hệ gen

Từ dữ bộ dữ liệu trình tự DNA đa hệ gen vi sinh vật ruột mỗi *C. gestroi* mà chúng tôi có được (Do *et al.*, 2014), dựa vào các cơ sở dữ liệu đáng tin cậy (KEGG, eggNOG, Non redundant), các trình tự được dự đoán gen và dự đoán taxon bằng phần mềm tin

sinh (MetageneAnnotator/Metagene, MEGAN). Mức độ bao phủ của trình tự các đoạn đọc đối với trình tự gen của cơ sở dữ liệu là 98%. Kết quả dự đoán là danh sách các đơn vị taxon của vi sinh vật nói chung và vi khuẩn nói riêng sống trong ruột mỗi *C. gestroi*.

Phương pháp dự đoán các vi sinh vật có khả năng sinh cellulase, hemicellulase

Từ dữ liệu đa dạng đơn vị taxon vi khuẩn sống trong ruột mỗi *C. gestroi* đã được dự đoán bằng các phần mềm tin sinh học ở trên, các chi vi khuẩn có các loài sản sinh cellulase và hemicellulase đã được công bố trong các bài báo và cơ sở dữ liệu NCBI được lọc riêng để phân tích. Tiếp theo, từ các chi đã lọc ra, tất cả các loài cụ thể có khả năng sản sinh cellulase và hemicellulase sẽ được xác định dựa vào bộ dữ liệu các loài có khả năng sản sinh cellulase và hemicellulase đã được công bố trước đó trên thế giới.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đa dạng các vi khuẩn có khả năng sinh cellulase trong ruột mỗi *C. gestroi*

Trên cơ sở bộ dữ liệu trình tự DNA đa hệ gen, mức độ đa dạng vi sinh vật ruột mỗi *C. gestroi* được đánh giá. Kết quả cho thấy 80% ORF thuộc vi khuẩn gồm 1.368 loài thuộc 628 chi, 217 họ, 97 bộ, 41 lớp và 22 ngành (Do *et al.*, 2014). Trong đó, 24 loài vi khuẩn thuộc 11 họ, 9 bộ, 8 lớp và 5 ngành có khả năng phân hủy cellulose đã được tìm thấy (Bảng 1). Dữ liệu cũng cho thấy, số loài thuộc ngành Firmicutes chiếm tỷ lệ cao nhất 15/24 loài và số loài có mật độ cá thể cao chủ yếu thuộc lớp Clostridia, bộ Clostridiales, đặc biệt 3 loài chiếm ưu thế nhất của ngành này là *Clostridium phytofermentans* (153 ORF), *C. thermocellum* (113 ORF) và *Acetivibrio cellulolyticus* (85 ORF). Tuy nhiên, trong 24 loài sản xuất cellulase tìm thấy, *P. fluorescens* là loài chiếm ưu thế nhất (1.258 ORF) thuộc bộ Pseudomonadaceae, họ Pseudomonadales, lớp Gammaproteobacteria, ngành Proteobacteria (Bảng 1 và Hình 1). Đây là loài vi khuẩn phân hủy cellulose phân bố rất phổ biến ở các môi trường sinh thái, đặc biệt là môi trường đất. Theo nghiên cứu của Sethi và đồng tác giả (2013), trong 4 loài vi khuẩn sản xuất cellulase phân lập được từ đất (*P. fluorescens*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* và *Serratia marcescens*) thì *P. fluorescens* là loài sản xuất cellulase tốt nhất. Do đó, rất có thể mật độ *P. fluorescens* cao trong ruột mỗi *C. gestroi* đã góp phần giúp mỗi tiêu hóa nguồn thức ăn cellulose.

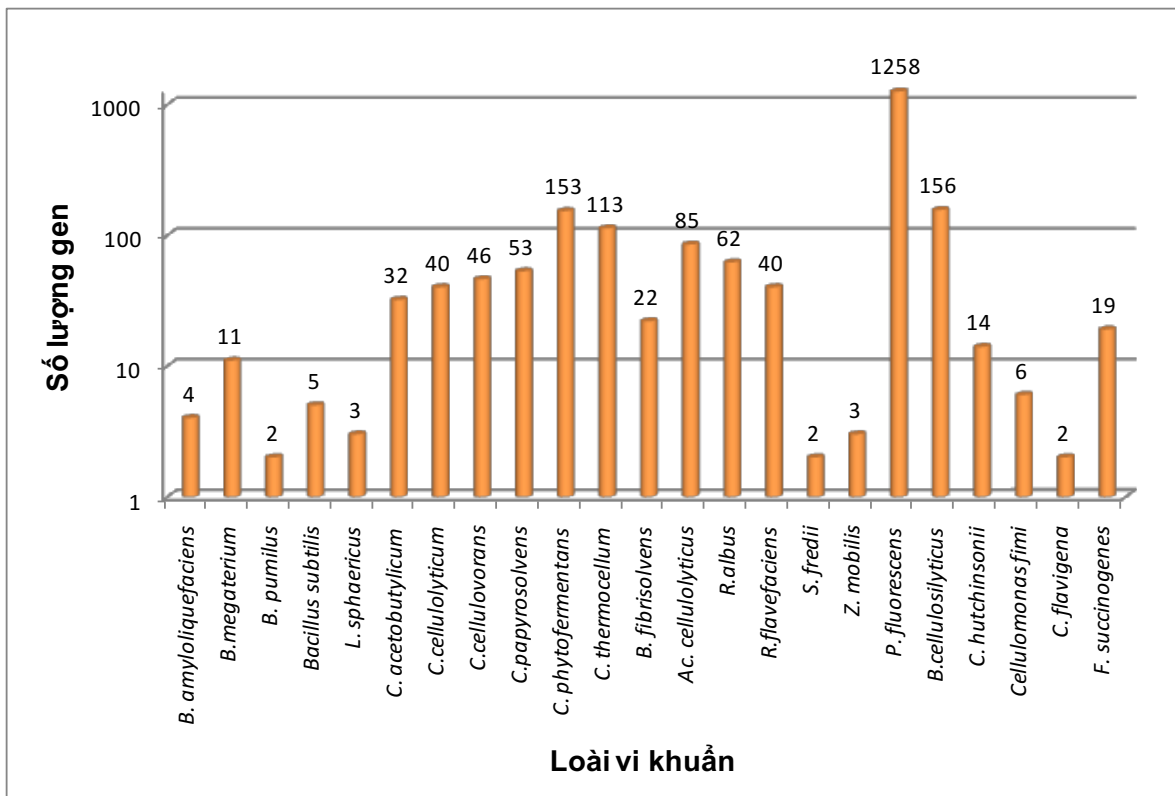
Bảng 1. Các taxon vi khuẩn sản xuất cellulase được tìm thấy trong dữ liệu DNA đa hệ gen vi khuẩn ruột mồi *C. gestroi* thu thập ở miền Bắc Việt Nam.

S TT	Ngành	Lớp	Bộ	Họ	Loài	Số ORF	
1					<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4	
2		Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus megaterium</i>	11	
3	<i>Bacillus pumilus</i>				2		
4	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>				3		
5	<i>Bacillus subtilis</i>				5		
6							<i>Clostridium acetobutylicum</i>
7				<i>Clostridium cellulolyticum</i>	40		
8	Firmicutes			Clostridiaceae	<i>Clostridium cellulovorans</i>	46	
9					<i>Clostridium papyrosolvans</i>	53	
10					<i>Clostridium phytofermentans</i>	153	
11		Clostridia	Clostridiales			<i>Clostridium thermocellum</i>	113
12						Lachnospiraceae	<i>Butyrivibrio fibrisolvans</i>
13				<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	85		
14				Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus albus</i>	62	
15					<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	40	
16	Proteobact- eria	Alphaproteobac- teria	Rhizobiales	Methylocystaceae	<i>Sinorhizobium fredii</i>	2	
17			Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Zymomonas mobilis</i>	3	
18			Gammaproteob- acteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1258
19	Bacteroides	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	156	
20		Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	14	
21	Actinobac- teria	Actinobacteria	Actinomycetales	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas fimi</i>	6	
22					<i>Cellulomonas flavigena</i>	2	
23	Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	19	
24	Deinococcu- sthermus	Deinococci	Thermales	Thermaceae	<i>Meiothermus ruber</i>	2	
Tổng						2131	

Như vậy, bằng cách tiếp cận là giải trình tự toàn bộ DNA đa hệ gen vi khuẩn ruột môi, 24 loài vi khuẩn sản xuất cellulase đã được tìm thấy, đồng thời mức độ chiếm ưu thế của mỗi loài trong ruột một *C. gestroi* cũng được chỉ ra. Kết quả này cho thấy, đây là cách tiếp cận hiệu quả hơn để tìm hiểu sự đa dạng vi khuẩn phân hủy cellulose so với các cách tiếp cận khác. Bằng cách khai thác gen theo chức năng, Mattéotti và đtg (2011a) chỉ sàng lọc được 3 dòng mang 3 ORF mã hóa các cellulase từ một số lượng rất lớn (khoảng 7.700) dòng của thư viện DNA đa hệ gen vi sinh vật ruột môi *Reticulitermes santonensis*. Các dòng này có trình tự tương đồng cao với các gen tương ứng của *Enterobacter* sp. 638, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* và *E. coli* K12. Bằng một cách tiếp cận khác, Subodh và đtg (2012) cũng chỉ phân lập trực tiếp được một số chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose từ môi trường sống ruột môi ở bậc phân loại chỉ là *Cellulomanas*, *Enterobacter* và *Citrobacter*. Tương tự, ở đối tượng là vi khuẩn đường ruột của hai loài mối bậc thấp

Coptotermes curvignathus (Holmgren) và bậc cao *Macrotermes gilvus* (Hagen), Ramin và đtg (2008) phân lập được 3 loài vi khuẩn phân hủy cellulose là *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* and *Clavibacter agropyri* (*Corynebacterium*).

Xét vai trò của vi khuẩn sản xuất cellulase trong đường ruột môi *C. gestroi* thông qua số lượng loài và mật độ cá thể tương ứng, số loài vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose chỉ chiếm 1,754% (24/1368) tổng số loài dự đoán được trong ruột môi *C. gestroi* nghiên cứu. Tổng số ORF của các loài này trong dữ liệu là 2.131/100.340 (2,123%). Như vậy, cả mật độ cũng như số lượng loài vi khuẩn phân hủy cellulose đều chiếm tỷ lệ khiêm tốn trong khu hệ vi khuẩn ruột môi *C. gestroi*. Kết quả này cho thấy, ở *C. gestroi*, vi khuẩn có vai trò nhất định trong sự phân hủy cellulose mà không đóng vai trò chủ đạo trong việc tiêu hóa nguồn cellulose thức ăn của mối. Điều này cũng đã được Brune (2014) đề cập đến ở các loài mối bậc thấp.



Hình 1. Số lượng gen của hai bốn loài vi khuẩn có khả năng sản xuất cellulase được tìm thấy trong dữ liệu DNA đa hệ gen vi khuẩn ruột môi *C. gestroi* thu thập ở miền Bắc Việt Nam.

Bảng 2. Các taxon vi khuẩn sản xuất hemicellulase được tìm thấy trong dữ liệu DNA đa hệ gen vi khuẩn ruột mối *C. gestroi* thu thập ở miền Bắc Việt Nam.

STT	Ngành	Lớp	Bộ	Họ	Loài	Số ORF	
1		Thermoanaero-bacterales	Family III. Incertae Sedis	Thermoanaerob-acterales	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	18	
2	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus halodurans</i>	10	
3						<i>Bacillus subtilis</i>	5
4				Clostridiaceae	<i>Clostridium thermocellum</i>	113	
5		Clostridia	Clostridiales		<i>Ruminococcus albus</i>	62	
6				Ruminococcac-eae	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	40	
7					Prevotellaceae	<i>Prevotella bryantii</i>	6
8					<i>Prevotella ruminicola</i>	17	
9					<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	156	
10					<i>Bacteroides eggerthii</i>	32	
11	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales		<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	21	
12					Bacteroidaceae	<i>Bacteroides intestinalis</i>	81
13						<i>Bacteroides xylophilus</i>	13
14						<i>Bacteroides ovatus</i>	63
15						<i>Bacteroides vulgatus</i>	38
16						<i>Bacteroides fragilis</i>	80
17				Actinobac-teria	Actinobacteria	Rubrobactera-les	Rubrobacterace-ae
18		Actinomyceta-les	Promicromono-sporaceae			<i>Xylanimonas cellulosilytica</i>	13
Tổng						769	

Đa dạng các loài vi khuẩn có khả năng sinh hemicellulase trong ruột mối *C. gestroi*

Trong nghiên cứu này, 18 loài vi khuẩn có khả năng sản xuất hemicellulase đã được dự đoán từ bộ dữ liệu trình tự DNA đa hệ gen vi khuẩn. Chúng thuộc 4 ngành, 5 lớp, 6 bộ và 8 họ (Bảng 2). Trong đó, có đến 9/18 loài thuộc ngành Bacteroidetes, lớp Bacteroidia, bộ Bacteroidales; đồng thời, mật độ cá thể của các loài này cũng rất cao so với các loài sản xuất hemicellulase khác (số ORF của những loài này chiếm tỷ lệ rất cao 507/769). Theo Dodd và đtg (2011), các loài sản xuất hemicellulase thuộc ngành Bacteroidetes cũng chiếm ưu thế trong hệ vi sinh vật đường ruột người và dạ cỏ động vật. Chúng có vai trò quan trọng trong việc phân hủy hemicellulose từ nguồn thức ăn của vật chủ. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, kết quả thể hiện ở Bảng 2 và Hình 2 cho thấy, cũng giống như vi khuẩn sản xuất cellulase, vi khuẩn có khả năng sản xuất hemicellulase có vai trò nhất định trong việc hỗ trợ vật chủ phân hủy

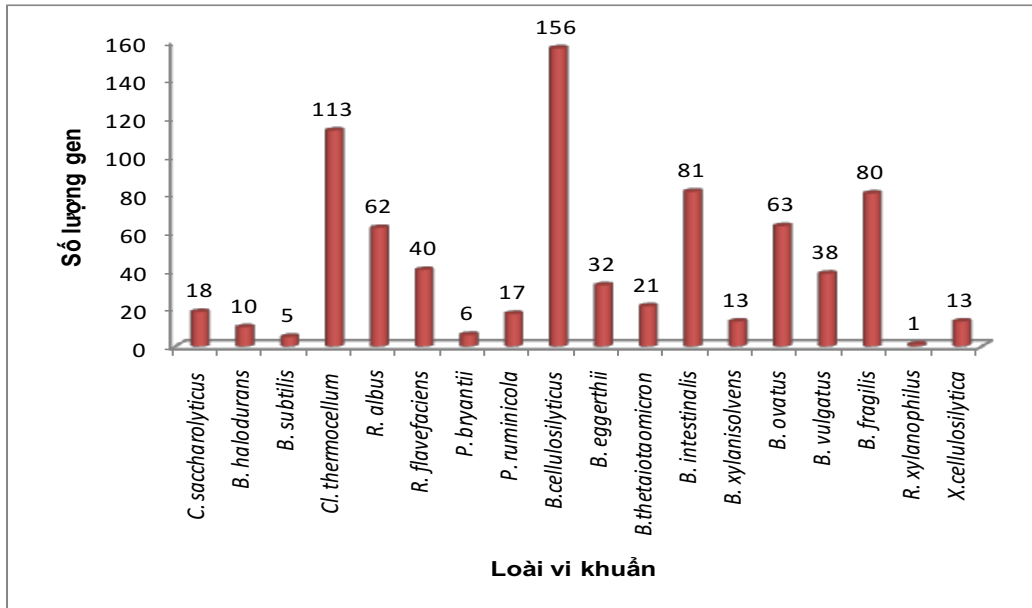
hemicellulose mà không đóng vai trò chủ đạo trong công việc này. Số loài vi khuẩn sản xuất hemicellulase và số ORF của chúng tương ứng chiếm 1,316% và 0,793% của tổng số loài vi khuẩn dự đoán được sống trong đường ruột mối *C. gestroi*.

Trong 18 loài, *C. thermocellum* (113 ORF), *B. cellulosilyticus* (156 ORF), *B. fragilis* (80 ORF) và *B. ovatus* (63 ORF) là 4 loài chiếm ưu thế nhất (Hình 2). Ngoài trừ loài *C. thermocellum* thuộc ngành Firmicutes, 3 loài còn lại đều thuộc ngành Bacteroidetes. *C. thermocellum* là loài vi khuẩn có khả năng phân hủy cả cellulose và hemicelulose. Ngoài ra còn có 2 loài *R. flavefaciens* và *B. subtilis* cũng có khả năng như *C. thermocellum*. Những loài này có được khả năng phân hủy đồng thời cellulose và hemicellulose là nhờ cơ phức hệ cellulosome ở bề mặt tế bào chứa nhiều tiểu đơn vị xúc tác phân cắt các loại polysaccharide khác nhau.

Như vậy, số lượng loài vi khuẩn có khả năng phân hủy hemicellulose có mặt trong ruột mối *C.*

gestroi được xác định trong nghiên cứu này khá phong phú và phong phú hơn so với cách tiếp cận khác cũng cùng mục đích. Ví dụ, Mattéotti và đtg (2011b) chỉ sàng lọc được tất cả 8 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose hoặc hemicellulose, cả 8 dòng này đều chưa được định loài; Phân tích trình

tự của gen mã hóa rRNA 16S của vi khuẩn sống trong đường ruột của 2 loài mối *Nasutitermes aquilinus* và *Cortaritermes fulviceps*, Ben Guerrero và đtg (2015) đã tìm thấy một số ít loài vi khuẩn thuộc chi *Paenibacillus* spp., *Klebsiella* spp. và *Cohnella* có khả năng phân hủy cellulose và xylan.



Hình 2. Mười tám loài vi khuẩn sản xuất hemicellulase được tìm thấy trong dữ liệu DNA đa hệ gen của vi khuẩn ruột mối *C. gestroi* thu thập ở miền Bắc Việt Nam.

KẾT LUẬN

Bằng Metagenomics với hướng tiếp cận giải trình tự toàn bộ DNA đa hệ gen vi khuẩn và phân tích bộ dữ liệu, 24 loài vi khuẩn có khả năng sản xuất cellulase và 18 loài vi khuẩn có khả năng sản xuất hemicellulase trong đường ruột của mối bậc thấp *C. gestroi* đã được dự đoán với số lượng ORF tương ứng là 2.131 và 769 ORF. Số lượng các loài vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose và hemicellulose được xác định được cho thấy chúng có một vai trò nhất định trong sự phân hủy cellulose mà không đóng vai trò chủ đạo trong việc tiêu hóa nguồn cellulose thức ăn của mối. Đồng thời, kết quả nghiên cứu cũng thể hiện rằng số lượng các loài vi khuẩn phân hủy cellulose và hemicellulose và gen được dự đoán nhờ Metagenomics nhiều hơn so với việc xác định bằng các kỹ thuật khác. Như vậy, nghiên cứu này cũng góp phần khẳng định thêm ưu thế về hiệu quả, sự chính xác và nhanh chóng của Metagenomics trong việc xác định thành phần loài vi

sinh vật cũng như các gen của chúng có mặt trong môi trường sống tự nhiên so với các cách tiếp cận khác.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ về kinh phí của đề tài Nghị định thư với Nhật Bản: “Phân lập hệ gen mã hóa cho enzyme thủy phân lignocellulose từ khu hệ vi sinh ruột mối Việt Nam bằng kỹ thuật Metagenomics”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arumugam MM, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borrue N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims STorrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara

- C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mériex A, Melo Minardi R, M'irini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174–180.
- Ben Guerrero E, Arneodo J, Bombarda Campanha R, Abrão de Oliveira P, Veneziano Labate MT, Regiani Cataldi T, Campos E, Cataldi A, Labate CA, Martins Rodrigues C, Talia P (2015) Prospection and evaluation of (Hemi) cellulolytic enzymes using untreated and pretreated biomasses in two Argentinean native termites. *PLoS One* 10(8): 1–23.
- Brune A (2011) Microbial symbioses in the digestive tract of lower termites. In: Rosenberg E, Gophna U (eds) *Beneficial microorganisms in multicellular life forms*. Springer Berlin Heidelberg, pp 3–25
- Brune A (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat Rev Micro* 12: 168–180.
- Dai X, Zhu Y, Luo Y, Song L, Liu D, Liu L, Chen F, Wang M, Li J, Zeng X, Dong Z, Hu S, Li L, Xu J, Huang L and Dong X (2012) Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in Yak Rumen. *PLoS ONE* 7(7): e40430.
- Dodd D, Mackie RI, Cann IKO (2011) Xylan degradation, a metabolic property shared by rumen and human colonic Bacteroidetes. *Mol Microbiol* 79: 292–304.
- Do TH, Nguyen TT, Nguyen TN, Le QG, Nguyen C, Kimura K, Truong NH (2014) Mining biomass-degrading genes through Illumina-based de novo sequencing and metagenomic analysis of free-living bacteria in the gut of the lower termite *Coptotermes gestroi* harvested in Vietnam. *J Biosci Bioeng* 118: 665–71.
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312: 1355–1359.
- Hess M, Sczyrba A, Egan R, Kim TW, Chokhawala H, Schroth G, Luo S, Clark DS, Chen F, Zhang T, Mackie RI, Pennacchio LA, Tringe SG, Visel A, Woyke T, Wang Z, Rubin EM (2011) Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science* 331: 463–467.
- Kennedy J, Marchesi JR, Dobson AD (2008) Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. *Microb Cell Fact* 7: 27.
- Martins LF, Antunes LP, Pascon RC, de Oliveira JCF, Digiampietri LA, Barbosa D, Peixoto BM, Vallim MA, Viana-Niero C, Ostroski EH, Telles GP., Dias Z, da Cruz JB, Juliano L, Verjovski-Almeida S, da Silva AM and Setubal JC (2013) Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the São Paulo zoo park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. *PLoS ONE* 8: e61928.
- Mathew GM, Lin S-J, Chang J-J, Huang C-C (2011) DGGE detection and screening of lignocellulolytic bacteria from the termite gut of *Coptotermes formosanus*. *Malyasia J Microbiol* 7: 201–209.
- Mattéotti C, Haubruge E, Thonart P, Francis F, De Pauw E, Portetelle D, Vandenberg M. (2011) Characterization of a new β -glucosidase/ β -xylosidase from the gut microbiota of the termite (*Reticulitermes santonensis*). *FEMS Microbiol Lett* 314: 147–157.
- Nakashima KI, Watanabe H, Azuma JI (2002) Cellulase genes from the parabasalium symbiont *Pseudotrichonympha grassii* in the hindgut of the wood-feeding termite *Coptotermes formosanus*. *Cell Mol Life Sci* 59: 1554–1560.
- Nguyễn Đức Khâm, Nguyễn Tân Vương, Trịnh Văn Hạnh, Nguyễn Văn Quảng, Lê Văn Triền, Nguyễn Thuý Hiền, Vũ Văn Nghiê, Ngô Trường Sơn và Võ Thu Hiền (2007), *Động vật chi Việt Nam: Mối*. NXB KH và KT
- Ramin M, Alimon A, Abdullah N, Panandam J and Sijam K (2008) Isolation and identification of three species of bacteria from the termite *Coptotermes curvignathus* (Holmgren) present in the vicinity of University Putra Malaysia. *Res J Microbiol* 3: 288–292.
- Sethi S, Datta A, Gupta BL, Gupta S (2013) Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN* 2013: e985685.
- Subodh K. Upadhyaya, Anuroop Manandhar, Hemanta Mainali, Anaya R. Pokhrel, Anurag Rijal, Barun Pradhan, Bhabuk Koirala
- Subodh K. Upadhyaya, Anuroop Manandhar, Hemanta Mainali, Anaya R. Pokhrel, Anurag Rijal, Barun Pradhan, Bhabuk Koirala
- Subodh K. Upadhyaya, Anuroop Manandhar, Hemanta Mainali, Anaya R. Pokhrel, Anurag Rijal, Barun Pradhan, Bhabuk Koirala
- Subodh K. Upadhyaya, Anuroop Manandhar, Hemanta Mainali, Anaya R. Pokhrel, Anurag Rijal, Barun Pradhan, Bhabuk Koirala
- Subodh K. Upadhyaya, Anuroop Manandhar, Hemanta Mainali, Anaya R. Pokhrel, Anurag Rijal, Barun Pradhan, Bhabuk Koirala
- Subodh K. Upadhyaya, Anuroop Manandhar, Hemanta Mainali, Anaya R. Pokhrel, Anurag Rijal, Barun Pradhan, Bhabuk Koirala

Pradhan, Bhabuk Koirala

environment. *Nature* 428: 37–43.

Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS and Banfield JF (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the

Xu Z, Hansen MA, Hansen LH, Jacquiod S and Sørensen SJ (2014) Bioinformatic approaches reveal Metagenomic characterization of soil microbial community. *PLoS ONE* 9: e93445.

PREDICTION OF CELLULOLYTIC AND HEMICELLULOLYTIC BACTERIAL DIVERSITY IN THE GUT OF *COPTOTERMES GESTROI* IN THE SOUTHERN VIETNAM

Nguyen Thi Thao¹, Do Thi Huyen², Truong Nam Hai²

¹Vinh University, Nghe An

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

In lower termite such as *Coptotermes gestroi*, cellulose and hemicellulose are hydrolysed by cellulases and hemicellulases secreted from bacteria, archaea, protozoa and fungus in the hindgut. In which, majority of the enzymes are contributed by protozoa. From the metagenomic DNA data (125,423 open reading frames -ORFs) of free-living bacteria in the gut of *C. gestroi* harvested in Southern Vietnam and by MEGA 4.0 software, 100,340 ORFs were classified into 1,368 species, 628 genera, 217 families, 97 orders, 41 classes and 22 phyla (Do *et al.*, 2014). Among these, 2,131 ORFs (2,12%) belong to 24 bacterial species (account 1,75% bacterial species), 11 families, 9 orders, 8 classes and 5 phyla were predicted have ability to produce cellulases; 679 ORFs belong to 18 bacterial species 8 families, 6 orders, 5 classes, 4 phyla were predicted have ability to produce hemicellulase. Majority of cellulase producers were species which of Firmicutes (15/24 species), accumulated in class Clostridia, order Clostridiales. The most abundant cellulase producer was *Pseudomonas fluorescens* (1,258 ORFs) of order Pseudomonadaceae. Out of the 18 hemicellulase producers, the most abundant species was *Clostridium thermocellum* (113 ORFs) in the phylum Firmicutes, followed by 3 species belonging to the phylum Bacteroidetes. The species predicted to produce both cellulase, hemicellulase were *C. thermocellum*, *Ruminococcus flavefaciens* and *Bacillus subtilis*. Our study provides a data of gut cellulose and hemicellulose - degrading bacteria composition of *C. gestroi*

Keywords: *Coptotermes gestroi*, bacteria, cellulase, hemicellulase, metagenomics