

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI KHUẨN PHÂN GIẢI CELLULOSE TỪ ĐẤT TRỒNG SÂM NGỌC LINH TẠI TỈNH QUẢNG NAM

Trần Bảo Trâm¹, Phạm Hương Sơn¹, Nguyễn Thị Hiền¹, Ngô Thị Hoa¹, Nguyễn Thu Hiền², Nguyễn Huy Hoàng²

¹Trung tâm Sinh học thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

²Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 17.7.2015

Ngày nhận đăng: 20.12.2015

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là loài đặc hữu của Việt Nam được phát hiện tại vùng núi Ngọc Linh (Kon Tum/Quảng Nam). Kết quả khảo sát cho thấy những vùng đất có tầng mùn dày là nơi có điều kiện lý tưởng cho cây sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển. Chính vì vậy việc tìm hiểu về khu hệ vi sinh vật nói chung, vi khuẩn phân giải cellulose nói riêng trong đất trồng sâm là một trong những hướng đi tiềm năng cho nghiên cứu trồng đi thực loài sâm này của Việt Nam. Từ mẫu đất trồng sâm Ngọc Linh tại Quảng Nam, chúng tôi đã phân lập được 05 vi khuẩn có hoạt tính phân giải cellulose (kí hiệu QN1, QN2, QN3, QN4, QN5 với kích thước vòng phân giải đo được trên môi trường chứa cơ chất CMC (0,1%) tương ứng đạt: 10, 11, 22, 7, 22 mm), hoạt tính cellulase đạt lần lượt là 1,31; 1,23; 2,99; 0,99; 2,51 U/ml. Kết hợp nghiên cứu một số đặc điểm nuôi cấy/sinh hóa và phân tích trình tự gen 16S rARN đã xác định vị trí phân loại của các vi khuẩn phân lập được như sau: QN1 và QN4 thuộc chi *Pseudomonas*; QN2, QN3 thuộc chi *Bacillus*; QN5 thuộc chi *Roseomonas*.

Từ khóa: Đất Quảng Nam, gen 16S rRNA, phân lập vi khuẩn, sâm Ngọc Linh, vi khuẩn phân giải cellulose

MỞ ĐẦU

Vùng núi Ngọc Linh bao gồm nhiều đỉnh núi cao trên 2000 m so với mặt biển, cao nhất là ngọn Ngọc Linh (2598 m). Khí hậu trong toàn vùng núi Ngọc Linh là sự tương phản giữa hai mùa: mùa mưa và mùa khô rõ rệt. Độ ẩm trung bình trong khu vực từ 80 đến 85% và sự đa dạng về nguồn gốc của các thành phần thực vật đã phát hiện cho thấy vùng núi Ngọc Linh có thể là điểm hội tụ của nhiều luồng di trú khác nhau. Kết quả điều tra sơ bộ hệ thực vật ở vùng núi Ngọc Linh đã xác định được 264 loài thuộc 111 họ thực vật, trong đó có họ Nhân Sâm phát triển mạnh với số loài và số cá thể khá phong phú (Nguyễn Thượng Dong, *et al.*, 2007). Ở Quảng Nam và Kon Tum, cây sinh trưởng và phát triển tốt dưới tán rừng tự nhiên ở độ cao 1500 m trở lên, nơi có tầng mùn dày (Lê Thanh Sơn, Nguyễn Tập, 2006). Như vậy có thể thấy đất trồng sâm (tầng mùn) là một trong những môi trường sống tốt cho các vi sinh vật như vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm. Hơn nữa, với cây sâm do thời gian canh tác dài, sinh trưởng dưới bóng mát và độ ẩm cao, không có ánh sáng mặt trời trực tiếp và pH của đất trồng sâm khoảng 5,5 nên môi trường đất trồng sâm Ngọc Linh thuận lợi cho sự phát triển của tập đoàn vi sinh vật.

Với những thông tin về giá trị dược liệu và tác dụng làm thuốc chữa bệnh của sâm Ngọc Linh nên nhu cầu sử dụng sâm và các sản phẩm từ sâm Ngọc Linh ngày càng tăng, đồng thời trữ lượng sâm tự nhiên ngày một cạn kiệt do việc khai thác tràn lan nên gần đây, ở Việt Nam xu hướng nghiên cứu trồng đi thực sâm Ngọc Linh được nhiều tổ chức, cá nhân quan tâm thực hiện. Một trong những điều kiện trồng đi thực được đề cập là yếu tố thổ nhưỡng. Do vậy việc phát hiện và ứng dụng hệ vi sinh đất tương tự như vùng trồng tự nhiên là nghiên cứu có ý nghĩa thực tế, trong đó phải kể đến các vi khuẩn phân giải cellulose – tác nhân quan trọng trong quá trình phân giải cellulose tạo mùn cho đất.

Cellulose là một polymer hữu cơ phổ biến nhất trong tự nhiên. Hằng năm, có đến 1102 tấn sinh khối cellulose được tạo thành chủ yếu từ quá trình quang hợp (Sukumaran *et al.*, 2005). Cellulase phân hủy cellulose có thể được tổng hợp từ nhiều nguồn khác nhau trong tự nhiên từ nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn... Vi sinh vật phân giải cellulose có vai trò quan trọng trong nhiều lĩnh vực như trong công nghiệp dệt, giấy, trong chất tẩy rửa (Xia, Cen, 1999) xử lý rác thải (Lý Kim Bằng *et al.*, 1999), sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh (Nguyễn Lan Hương *et al.*, 1999).

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích phân lập và xác định một số đặc điểm của vi khuẩn phân giải cellulose trong đất trồng sâm Ngọc Linh tự nhiên. Từ đó có thể lựa chọn môi trường, điều kiện sinh trưởng để làm tăng khả năng thủy phân cellulose của chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn có hoạt tính cellulase cao an toàn với môi trường sẽ được bổ sung vào nguồn giống vi sinh vật có khả năng ứng dụng để sản xuất các chế phẩm vi sinh bổ sung cho đất trồng sâm Ngọc Linh tại các vùng di thực.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu đất

Địa điểm lấy mẫu: Đất được lấy tại khu vực trồng sâm Ngọc Linh (6 năm tuổi) trên núi Ngọc Linh dưới tán rừng già nguyên sinh, ở độ cao 1835 m so với mặt nước biển thuộc xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Thời gian lấy mẫu vào mùa khô từ tháng 1 đến tháng 4/2014. Đất có một số đặc điểm: Màu nâu sẫm, tơi, xốp, pH 4,5. Mẫu đất được lấy và bảo quản theo phương pháp của Kim và đồng tác giả (Kim *et al.*, 2009).

Phương pháp

Phân lập vi khuẩn

Vi khuẩn được phân lập trên môi trường R2A (Kim *et al.*, 2009).

Chủng vi khuẩn được phân lập trực tiếp bằng phương pháp pha loãng (Vũ Thị Minh Đức, 2001) sau đó được ủ ở 37°C trong 2 ngày. Lựa chọn khuẩn lạc mọc riêng rẽ tiến hành làm sạch và bảo quản trong ống thạch nghiêng ở 4°C (Myung Kyum Kim *et al.*, 2009; Vũ Thị Minh Đức, 2001).

Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào

Hoạt tính cellulase được thử theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch chứa 0,1% cơ chất CMC.

Tiến hành: Chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng ở 37°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 3 ngày. Dịch nuôi cấy ly tâm 5000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút, thu dịch lỏng phía trên được enzym thô (Mekar *et al.*, 2014). Nhỏ phần dịch enzym thô vào các lỗ đã đục ở đĩa petri chứa cơ chất CMC 0,1%, đặt các đĩa thạch ở 37°C. Sau 48 giờ tráng dung dịch Lugol. Quan sát vòng phân giải tạo thành. Hoạt tính enzyme của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được tính bằng đường kính vòng phân giải (ΔD) (Nyi, Wikwiek, 2014).

$\Delta D = D - d$ (mm)

D: đường kính vòng phân giải (mm); d: đường kính lỗ thạch (mm).

Thử nghiệm khả năng lên men các loại đường

Môi trường: Phenol red carbohydrate broth (trypticase: 1%; NaCl: 0,5%; phenol đỏ: 0,018g/l; carbohydrate: 0,1% (glucose, manitol, lactose...)).

Tiến hành: cấy chủng vi khuẩn vào môi trường lỏng nuôi ở 37°C/24-48h, vi sinh vật sử dụng nguồn đường trong môi trường sẽ làm giảm pH, thay đổi màu chất chỉ thị phenol đỏ. Kết quả: (+): môi trường chuyển vàng; (-): môi trường có màu đỏ.

Thử nghiệm catalase

Mục đích: phát hiện vi sinh vật có hệ enzyme catalase.

Tiến hành: lấy một ít khuẩn lạc đặt lên lam kính sạch, nhỏ H₂O₂ 30%, quan sát kết quả: (+): có bọt khí xuất hiện; (-): không có bọt khí xuất hiện.

Xác định hoạt tính celulase

Hoạt tính celulase của các chủng vi khuẩn được xác định dựa vào lượng đường khử tạo thành sau phản ứng bằng phương pháp đo quang phổ theo Nyi, Wikwiek (2014). Phản ứng enzyme với cơ chất CMC 1% xảy ra trong dung dịch đệm Na acetate 50 mM, pH 5, ở 50°C, 30 phút. Một đơn vị hoạt tính enzyme được định nghĩa là lượng enzyme làm thủy phân cơ chất CMC thành đường khử tương đương 1 μ M glucose.

Tách chiết DNA tổng số, nhân gen và xác định trình tự.

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và đồng tác giả (Sambrook *et al.*, 1989) có sử dụng hỗn hợp chloroform/isopropanol tỷ lệ 24:1 và loại bỏ RNA bằng enzyme RNase. Tiếp đó, đoạn gen 16S rRNA được nhân lên từ DNA tổng số nhờ phản ứng PCR sử dụng cặp mồi: 16SF: 5'-CGGAATTCATTGCTGGACCTG-3'; 16SR: 5'-GTCCTAGAGCTTTGTCTTTAGG-3'. Phản ứng chuỗi PCR được tiến hành với tổng thể tích là 50 μ l bao gồm: Đệm PCR, 20 pmol mỗi mồi loại, 2 unit Taq polymerase, 1 mM dNTPs, 100 ng DNA tổng số. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy GenAmp PCR System 9700 (ABI, Mỹ) với chu trình nhiệt: 95°C: 5 phút; (95°C: 1 phút, 55°C: 1 phút, 72°C: 1 phút 30 giây) lặp lại 30 chu kỳ, 72°C: 10 phút. Sản phẩm PCR được phân tách trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

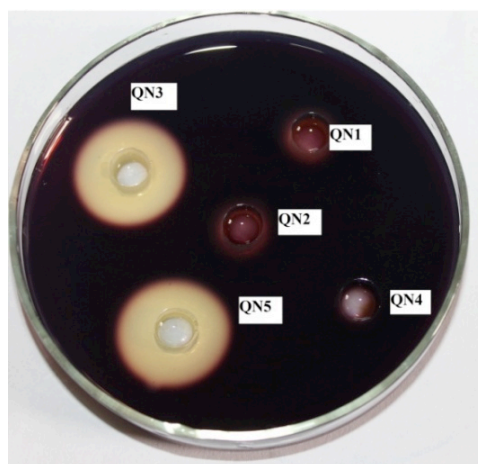
Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% và tinh sạch bằng bộ kit của hãng QIAGEN (Mỹ). Sản phẩm sau tinh sạch được xác định trình tự trên máy ABI 3100 (Ludwig W and Schleifer K.H. 2000). Phân tích trình tự nucleotid và xây dựng cây phát sinh chủng loại: Các trình tự được xử lý bằng các chương trình BLAST/NCBI và phần mềm Bioedit Clustal W và Mega 4.0. So sánh trình tự gen của các chủng nghiên cứu với một số chủng khác từ Ngân hàng gen thế giới (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Maximum Parsimony - MP (Ludwig, Schleifer, 2000).

Với mục đích đánh giá sơ bộ về thành phần và hoạt lực của nhóm vi khuẩn phân giải cellulose, làm cơ sở cho việc tuyển chọn các vi khuẩn thích nghi với điều kiện môi trường, đưa chúng trở lại đất trồng cây dưới dạng phân bón sinh học, chúng tôi tiến hành phân lập và tuyển chọn sơ bộ các vi khuẩn phân giải cellulose từ đất trồng sâm Ngọc Linh tự nhiên ở Quảng Nam. Các chủng được phân lập trên môi trường R2A, đánh giá khả năng sinh enzyme cellulase. Kết quả, năm chủng vi khuẩn được phân lập có hoạt tính phân giải cellulose (Hình 1), hình thái khuẩn lạc được thể hiện rõ ở hình 2.

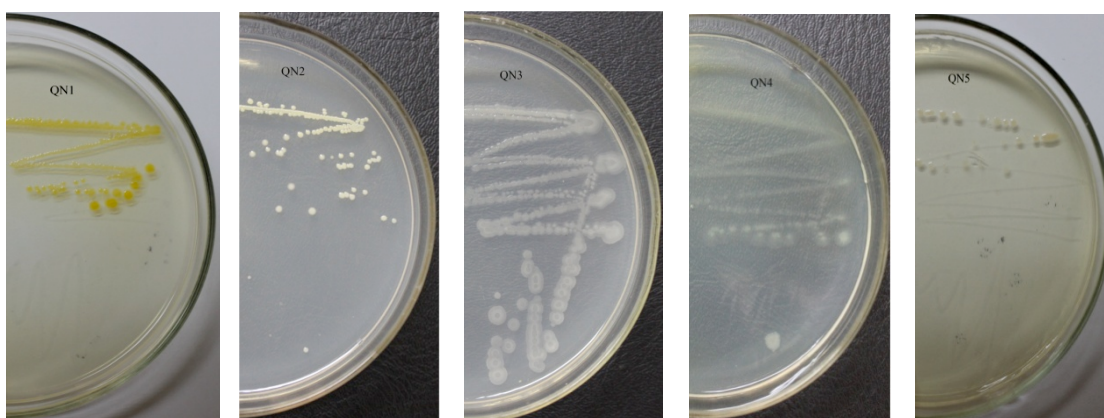
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm các chủng vi khuẩn phân giải cellulose phân lập từ đất trồng sâm ở Quảng Nam

Trên cơ sở phân loại sơ bộ các vi khuẩn có hoạt tính sinh enzyme cellulase, chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa của 05 chủng vi khuẩn phân lập được trình bày trong bảng 1.



Hình 1. Khả năng phân giải cellulose của các chủng nghiên cứu. QN1, QN2, QN3, QN4, QN5: Các chủng phân lập.



Hình 2. Khuẩn lạc của các chủng nghiên cứu. QN1, QN2, QN3, QN4, QN5: Các chủng phân lập.

Bảng 1. Một số đặc điểm của các vi khuẩn nghiên cứu.

| Đặc điểm | Kí hiệu chủng | | | | | |
|----------------------------------|--|--------------------|---------------------------------|--|-----------------------|---|
| | QN1 | QN2 | QN3 | QN4 | QN5 | |
| Đường kính (mm) | 2-3 | 2-3 | 4-5 | 4-5 | 3-3,5 | |
| Hình dạng | Tròn | Tròn | Tròn | Tròn méo | Tròn | |
| Đặc điểm khuẩn lạc | Vàng nhạt xung quanh, chấm nhợt nổi ở giữa, bóng | Trắng, bề mặt bóng | Màu trắng đục, chấm tròn ở giữa | Khuẩn lạc có sắc tố màu xanh, tròn méo, viền mờ xung quanh | Trắng hồng, ướt, nhầy | |
| Đặc điểm tế bào | Hình que | Hình que | Hình que | Hình que | Hình cầu, kết chuỗi | |
| Chiều dài (µm) | 1,5-2 | 2-2,5 | 2,5-3 | 2-4 | 2-2,5 | |
| Khả năng di động | + | + | + | + | - | |
| Phản ứng sinh hóa | Catalaza | + | + | - | - | + |
| Nhuộm Gram | - | + | + | - | - | - |
| Nhiệt độ tăng trưởng tối ưu (°C) | 35-37 | 30-32 | 30-32 | 30-32 | 35-37 | |
| pH tăng trưởng tối ưu | 4,5-5,5 | 4,5-5,5 | 4,5-5,5 | 4,5-5,5 | 4,5-5,5 | |
| Glucose | + | + | + | + | + | |
| Khả năng lên men | Saccharose | + | + | + | + | + |
| Maltose | + | + | + | + | + | |
| Lactose | + | + | + | + | + | |
| Cellulase | 10 | 11 | 22 | 7 | 22 | |
| Khả năng sinh enzyme (ΔD-mm) | | | | | | |

Ghi chú: (+): Thí nghiệm dương tính; (-): Thí nghiệm âm tính.

Phân loại các chủng vi khuẩn bằng giải trình tự gen 16S rARN

Tách chiết và nhân bản đoạn gen đích bằng kỹ thuật PCR

Phân loại các chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA đã trở nên phổ biến tại nhiều phòng thí nghiệm. Kỹ thuật này cùng với các phương pháp phân loại về hình thái và hóa sinh đã làm tăng độ chính xác cho các nhà phân loại vi sinh vật. Các kết quả tách chiết DNA tổng số, nhân đoạn gen 16S rRNA hoàn toàn phù hợp với những nghiên cứu trước đó (Nguyễn Thu Hiền *et al.* 2010; Nguyễn Huy Hoàng *et al.* 2010).

Sau khi tách chiết và thu được DNA tổng số đạt chất lượng, đoạn DNA đích được nhân bản với độ đặc hiệu cao bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 16S rRNA. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy xuất hiện các băng phụ, không đặc hiệu. Sản phẩm PCR

sau đó được tinh sạch để tiến hành giải trình tự gen trực tiếp bằng cặp mồi 16S rRNA.

Trình tự gen 16S rRNA sau đó được so sánh với các trình tự gen khác trong ngân hàng GenBank qua công cụ Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Các chủng vi khuẩn này có độ tương đồng khá cao từ 95-98% so với một số chủng trong ngân hàng GenBank (Bảng 2).

Từ kết quả bảng 2 có thể phân loại của các chủng phân lập được như sau: QN1 và QN4 thuộc chi *Pseudomonas*; QN2, QN3: thuộc chi *Bacillus*; QN5 thuộc chi *Roseomonas*. Theo những khảo sát về sự đa dạng của hệ vi sinh vật ở đất trồng sâm tại một số nước trên thế giới cho thấy chi *Bacillus* là một trong những chi chiếm ưu thế, không phân biệt độ tuổi của đất trồng sâm (Hong *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu Li khi nghiên cứu hệ vi sinh vật ở đất trồng sâm từ 1 đến 6 năm tuổi cũng phân loại được một số chủng vi khuẩn như *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* (Li *et al.*, 2014).

Bảng 2. Mức độ tương đồng của các chủng phân lập với các chủng trên ngân hàng gen.

| Chủng phân lập | Chủng tương đồng | Mã số trên GenBank | Mức độ tương đồng |
|----------------|--|--------------------|-------------------|
| QN1 | <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> BBAL | FJ217181.1 | 95% |
| QN2 | <i>Bacillus</i> sp. SW-12 16S | KC813161.1 | 98% |
| QN3 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> L4-6 | KC464454.1 | 95% |
| QN4 | <i>Pseudomonas</i> sp. DPs-11 | JN247762.1 | 97% |
| QN5 | <i>Roseomonas ludipueritiae</i> 170-96 | NR_028983.1 | 96% |

Hoạt tính cellulase từ dịch nuôi cấy các chủng phân lập

Kết quả cho thấy 3 chủng QN1, QN2 và QN4 có hoạt tính cellulase thấp, 2 chủng QN3, QN5 có hoạt tính phân giải cellulose cao hơn hẳn (Bảng 3). Kết quả này cũng tương đồng với kết quả xác định khả năng phân giải cellulose của các chủng nghiên cứu (Hình 1).

Tuy nhiên, hoạt tính phân giải cellulose các chủng trong nghiên cứu này còn thấp so với một số kết quả nghiên cứu của một số nhóm tác giả khác khi nghiên cứu về vi khuẩn thủy phân cellulose. Trong nghiên cứu của Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp năm 2011, khi phân lập vi khuẩn phân giải cellulose trong đất trồng lúa và dạ cỏ bò, nhóm tác giả đã phân lập được 4 dòng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào (Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp, 2014). Kết quả đánh giá khả năng sinh enzyme endoglucanases bằng cơ chất CMC (1%) đạt 19,44 -25,43 U/ml. Ngoài ra, các chủng phân lập trong nghiên cứu của Behera và đồng tác giả (2013) khi phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose ở vùng đất ngập mặn ở Ấn Độ (Behera *et al.*, 2014) cũng có hoạt tính thủy phân cellulose rất cao. 15 chủng báo cáo trong nghiên cứu này có hoạt tính cellulase dao động trong khoảng 2,471 to 98,253 U/ml. Hiện nay, báo cáo về khả

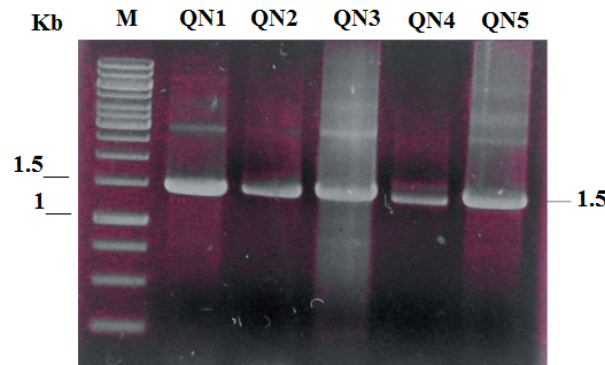
năng thủy phân cellulose cao của các chủng vi khuẩn có thể kể đến chủng *Bacillus cereus* trong nghiên cứu của Mukesh Kuma và cộng sự, chủng này có hoạt tính cellulase lên đến 102 U/ml trong 48 giờ (Mukesh Kuma *et al.*, 2012). Theo những nghiên cứu trước đây về khả năng sinh cellulase của vi khuẩn, *Bacillus* là một trong những chi có khả năng phân hủy cellulose cao nhất. Một số chủng được quan tâm nhiều nhất như *B. subtilis* (Park *et al.*, 1991), *B. pumilus* (Padaria *et al.*, 2014), *Bacillus* sp. KMS-330 (Ozaki, Ito 1991), *Bacillus megaterium* (Shakoore, 2013).

Chính vì thế, đối với các chủng phân lập trong nghiên cứu của chúng tôi, cần thiết phải khảo sát, lựa chọn môi trường nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, để có thể tăng cao khả năng thủy phân cellulose của chúng.

Bảng 3. Kết quả xác định hoạt tính cellulase.

| Chủng phân lập | Hoạt tính (U/ml) |
|----------------|------------------|
| QN1 | 1,31 |
| QN2 | 1,23 |
| QN3 | 2,99 |
| QN4 | 0,99 |
| QN5 | 2,51 |

Ghi chú: QN1, QN2, QN3, QN4, QN5: Chủng phân lập.



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR của các vi khuẩn nghiên cứu. M: Thang DNA chuẩn; QN1, QN2, QN3, QN4, QN5: Chủng phân lập.

KẾT LUẬN

Từ mẫu đất thu thập từ vùng rễ cây Sâm Ngọc Linh, chúng tôi đã phân lập được 5 chủng vi khuẩn. Một số đặc điểm sinh hóa của các chủng đã được xác định và phân loại dựa trên đặc điểm sinh hóa kết hợp với giải trình tự gen 16S như sau: *Pseudomonas oryzae* QN1, *Bacillus* sp. QN2, *Bacillus amyloliquefaciens* QN3, *Pseudomonas* sp. QN4, *Roseomonas ludipueritiae* QN5.

Hai chủng QN3 và QN5 có hoạt cellulase khá cao 2,99 và 2,51 U/ml, có ưu thế lớn trong việc chế tạo phân bón vi sinh.

Lời cảm ơn: Bài báo được hoàn thành từ kết quả của đề tài số 04/2014/HĐ-ĐTCB ngày 28/02/2014 của Viện Ứng dụng Công nghệ và sự hỗ trợ về trang thiết bị của phòng thí nghiệm của Viện Ứng dụng Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Behera BC., Parida S, Dutta SK, Thato HN (2014) Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi river Delta and their cellulase production ability. *American J Microbiol Res* 2(1): 44-46.
- Eun Hye Hong, Sun Hee Lee, Regupathy Thamizh Vendan, Young Ha Rhee (2012) Molecular diversity of *Rhizobacteria* in ginseng soil and their plant benefiting attributes. *Korean J Microbiol* 48(4): 246-253.
- Nguyễn Thu Hiền, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Huy Hoàng (2010) Phân lập chủng vi khuẩn *Chryseobacterium* có khả năng thủy phân lòng vũ. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3A): 923-928.
- Nguyễn Huy Hoàng, Nguyễn Thu Hiền, Nguyễn Thị Quỳnh Mai (2010) Phân loại và đánh giá khả năng phân hủy lòng vũ của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. phân lập từ đất ở nơi giết mổ gia cầm. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(4): 1869-1875.
- Kim MK., Sathiyaraj S, Pulla RK, Yang DC (2009) *Brevibacillus panacihumi* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(Pt 5): 1227-1231.
- Lê Thanh Sơn, Nguyễn Tập (2006) Những đặc điểm sinh thái cơ bản của sâm Ngọc Linh. *Tạp chí Dược liệu* 11(4): 145-147.
- Li Y, Ying Y, Ding W (2014) Dynamics of *Panax* ginseng rhizospheric soil microbial community and their metabolic function. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014: 160373.
- Ludwig W and Schleifer KH (2000) Phylogeny of bacteria beyond the 16S-rRNA standard. *ASM News* 65: 752-757.
- Lý Kim Băng, Lê Gia Hy, Tăng Thị Chính, Phan Tuyết Minh, Lê Thanh Xuân, Trần Quang Huy, Đào Ngọc Quang, Phạm Thị Cúc (1999) Sử dụng vi sinh vật có hoạt tính phân giải cellulose cao để nâng cao chất lượng phân hủy rác thải sinh hoạt và nông nghiệp. Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 546-551.
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Mukesh Kumar DJ, Poovai PD, Puneeth Kumar CL, Sushma Saroja Y, Manimaran A, Kalaichelvan PT (2012) Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its Biostoning activity. *Der Pharmacia Lettre* 4 (3): 881-888.
- Kim MK, Srinivasan S, Park MJ, Sathiyaraj G, Kim YJ, Yang DC (2009) *Nocardoides humi* sp. nov., a β -glucosidase – producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int J Sys Evol Microbiol* (2009), 59: 2724–2728.
- Nguyễn Lan Hương, Lê Văn Nhung, Hoàng Đình Hòa (1999) Phân lập và hoạt hóa vi sinh vật ưa nhiệt có hoạt tính xenlulaza cao để bổ sung lại vào khối ủ, rút ngắn chu kỳ xử lý rác thải sinh hoạt. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, Hà nội: 531-536.
- Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007) Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ Nhân sâm. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật: 70-78.
- Saptarni NM, Indriyati M (2014) Isolation off cellulose of corn cobs as a carbon. *Intl J Pharm Pharm Sci*: 215-217.
- Ozaki K, Ito S (1991) Purification and properties of an acid endo-1,4-beta-glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. *J Gen Microbiol* 137(1): 41-48.
- Padaria JC, Sarkar K, Lone SA, Srivastava S (2014) Molecular characterization of cellulose-degrading *Bacillus pumilus* from the soil of tea garden, Darjeeling hills, India. *J Environ Biol* 35(3): 555-561.
- Park SH, Kim HK, Pack MY (1991) Characterization and structure of the cellulase gene of *Bacillus subtilis* BSE616. *Agric Biol Chem* 55(2): 441-448.
- Rajeev K Sukumaran, Reeta Rani Singhania, Ashok Pandey (2005) Microbial cellulases-Production, application and challenges. *J Sci Indust Res* 64: 832-844.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Shakoor S, Aftab S, Rehman A (2013) Characterization of cellulose degrading bacterium, *Bacillus megaterium* S3, isolated from indigenous environment. *Pakistan J Zool* 45(6): 1655-1662.

Tạp chí Công nghệ Sinh học **14**(1): 55-61, 2016

Tabao NSC, Monsalud RG (2010). Characterization and identification of high cellulose producing bacterial strains from philippine mangroves. *Philippine J Syst Biol* 4: 13-20.

Vũ Thị Minh Đức, (2001). Thực tập vi sinh vật học. NXB

Đại học Quốc gia Hà Nội: 28-30.

Xia L, Cen P (1999). Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochem* 34: 909-912.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE CELLULOSE-DEGRADING BACTERIA FROM NGOC LINH GINSENG SOIL IN QUANG NAM PROVINCE

Tran Bao Tram^{1,✉}, Pham Huong Son¹, Nguyen Thi Hien¹, Ngo Thi Hoa¹, Nguyen Thu Hien², Nguyen Huy Hoang²

¹Center for Experimental Biology - NACENTECH

²Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) is an endemic species in Vietnam and was discovered at the Ngoc Linh mountain (Kon Tum/Quảng Nam). Investigations showed that the soil with a thick layer of humus was the ideal condition for growth and development of Ngoc Linh ginseng. Therefore research on microbial flora as well as cellulose-degrading bacteria in ginseng soil may elucidate factors contributing to acclimatized cultivation of this ginseng in Vietnam. From the soil sample with cultivated Ngoc Linh ginseng in Quang Nam, five bacteria strains with cellulose-degrading activities were isolated (QN1, QN2, QN3, QN4, QN5 with respectively hydrolyzed CMC halos diameters of 10, 11, 22, 7, 22 mm) with cellulase activities of 1,31; 1,23; 2,99; 0,99; 2,51 U/ml. The combination of 16S rRNA gene sequences and cultured/biochemical characteristics of the bacteria showed that the five bacteria strains was classified to be *Pseudomonas* sp. QN1; *Pseudomonas* sp. QN4; *Bacillus* sp. QN2; *Bacillus* sp. QN3; *Roseomonas* sp. QN5.

Keywords: Bacteria, cellulose-degradation, Ngoc Linh ginseng, Quang Nam soil, 16S rRNA

✉ Author for correspondence: E-mail: trantram_74@yahoo.com