

DOI:10.22144/jvn.2017.619

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN DẠ CỎ CỦA BÒ ĐỂ PHÂN GIẢI BỘT BÃ MÍA TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro*

Võ Văn Song Toàn¹, Đỗ Thị Cẩm Hương¹, Hồ Quảng Đồ² và Trần Nhân Dũng¹

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 25/07/2016

Ngày chấp nhận: 24/02/2017

Title:

Isolation, selection and identification of bacteria from cattle rumen fluid for sugarcane bagasse degradation in *in vitro*

Từ khóa:

A. xylooxidans, *B. subtilis*, phân giải bã mía, dạ cỏ bò, *in vitro*

Keywords:

A. xylooxidans, *B. subtilis*, sugarcane baggase degradation, cattle rumen, *in vitro*

ABSTRACT

To select and identify the ruminal bacteria that are able to degrade sugarcane bagasse powder in *in vitro* condition, sixty-two strains of bacteria isolated from cattle rumen fluid were used to describe characteristics of a colony appearance, a morphologic cell as well as selection of bacteria for degradation of sugarcane bagasse based on activity of endoglucanase and exoglucanase. As a result, three strains of bacteria including of the strain BM49 with high endoglucanase activity and two bacterial strains BM13 and BM21 with both of high endoglucanase and exoglucanase activity were mixed in the ratio 1:1:1. Beside, the result recorded that a suspension of 6% (v/v) of three bacteria strains (BM13, BM21 and BM49) with 10⁷ CFU/mL was incubated with sugarcane bagasse substrate in *in vitro* condition for 3 days at 38°C, the yields of sugarcane bagasse degradation were high. The digestion rates of neutral detergent fiber (NDF) and crude fiber (CF) were 45.1% (w/w) and 42.6% (w/w), respectively. Nucleotides sequences of 16S rRNA gene from three strains of bacteria including of BM13, BM21, BM49 were tested by method of maximum likelihood tree after amplifying by a pair of primers 8F and 1492R and sequenced by automated sequencing machines ABI3130. The analysis results highlighted that three strains of bacteria BM13, BM21, BM49 were similar to *Achromobacter xylooxidans* BL6, *Bacillus subtilis* S2O, *Uncultured Bacillus* sp. Filt.171 with the max identity of 91%, 94% and 94%, respectively.

TÓM TẮT

Nhằm tuyển chọn và định danh vi khuẩn dạ cỏ bò có khả năng phân giải bột bã mía ở điều kiện *in vitro*, 62 chủng vi khuẩn phân lập từ dạ cỏ bò đã được mô tả đặc điểm khuẩn lạc và tế bào đồng thời được sử dụng tuyển chọn vi khuẩn để phân giải bột bã mía dựa vào hoạt tính endoglucanase và exoglucanase. Kết quả đã tuyển chọn được tổ hợp ba chủng vi khuẩn dạ cỏ gồm chủng vi khuẩn BM49 có hoạt tính endoglucanase mạnh và hai chủng vi khuẩn BM13, BM21 có cả hoạt tính exoglucanase và endoglucanase mạnh phối hợp với nhau theo tỷ lệ 1:1:1. Việc bổ sung 6% (v/v) dịch 3 vi khuẩn này với mật số 10⁷ tế bào/mL, ủ 3 ngày ở 38°C trong điều kiện *in vitro* cho thấy hiệu quả phân giải bột bã mía cao với tỷ lệ tiêu hóa xơ trung tính và xơ thô lần lượt là 45,1 và 42,6% (w/w). Trình tự vùng gen 16S rDNA của 3 chủng vi khuẩn BM13, BM21, BM49 được phân tích phá hệ theo phương pháp maximum likelihood tree sau khi được khuếch đại với cặp mồi 8F và 1492R bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động ABI3130 cho kết quả lần lượt tương đồng với các chủng vi khuẩn *Achromobacter xylooxidans* BL6, *Bacillus subtilis* S2O, *Uncultured Bacillus* sp. Filt.171 ở mức 91%, 94% và 94%.

Trích dẫn: Võ Văn Song Toàn, Đỗ Thị Cẩm Hương, Hồ Quảng Đồ và Trần Nhân Dũng, 2017. Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn dạ cỏ của bò để phân giải bột bã mía trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 48b: 71-80.

1 GIỚI THIỆU

Thế kỷ 21 và trong tương lai, lĩnh vực Công nghệ sinh học tiếp tục đóng vai trò rất quan trọng đối với nhiều nền kinh tế (Wohlgemuth, 2009). Một trong những sản phẩm của công nghệ sinh học là dạng thức ăn bổ sung probiotic. Ngày nay, mặc dù xu thế sử dụng dạng thức ăn này đã và đang tăng lên qua đó cải thiện sức khỏe vật nuôi nhưng những thông tin cần thiết về sự ảnh hưởng của thức ăn bổ sung probiotic cần được cập nhật và hoàn chỉnh (Gaggia *et al.*, 2010). Bảo tử của một số loài *B. cereus*, *B. licheniformis*, và *B. subtilis* thường được sử dụng như thức ăn bổ sung probiotic để đưa vào đường tiêu hóa (Sanders *et al.*, 2003). Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, nhiều loài *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp cellulase và được phân lập từ dạ cỏ gia súc nhai lại khi được cho ăn bằng cỏ khô (Williams and Wither, 1983). *Bacillus* cùng với một số chủng vi sinh vật khác như *P. eruginosa*, *Streptococcus*, *Penicillin*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* cũng được phân lập từ dạ cỏ động vật nhai lại bò, cừu, dê (Oyeleke and Okusanmi, 2008). Do đó, việc “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn dạ cỏ bò để phân giải bã mía trong điều kiện *in vitro*” là vấn đề cần thiết hiện nay.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

2.1.1 Vật liệu

Khoảng 10 kg bã mía được thu tại 5 vị trí của khu bã mía thải ra từ nhà máy đường Vị Thanh, tỉnh Hậu Giang. Bã mía sau khi thu về được trộn đều, 2 kg bã mía trong tổng số bã mía đó được thu nhận và được rửa bằng nước lọc nhiều lần để loại bỏ đường (thông qua kiểm tra hàm lượng đường khử bằng phương pháp Nelson, 1944). Bã mía sau đó được phơi khô và sấy ở 55°C trong 30 - 45 phút trước khi nghiền thành bột bằng máy nghiền mẫu Retsch Miihle với kích thước lỗ lưới là 0,12 mm và được trữ trong keo thủy tinh ở nhiệt độ 4°C trong suốt thời gian thí nghiệm. Bột bã mía sau đó được dùng làm cơ chất nuôi cấy vi sinh vật trong thí nghiệm.

2.1.2 Nguồn vi khuẩn

Dịch dạ cỏ từ 2 con bò được thu tại lò giết mổ gia súc Sơn Quỳnh, xã Minh Đức, huyện Mỏ Cày Nam, tỉnh Bến Tre. Dịch dạ cỏ thu ở 3 vị trí khác nhau trên cùng một dạ cỏ của bò đã bị giết thịt thông qua ống inox vô trùng có 1 đầu nhọn cắm trực tiếp vào dạ cỏ và đầu còn lại nối với ống cao su vô trùng dẫn vào ống falcon vô trùng, bảo quản dịch dạ cỏ trong tối, ôn nhiệt trong quá trình chuyển mẫu về phòng thí nghiệm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát nguyên liệu

Vật chất khô (VCK) bột bã mía được sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi theo Horwitz (2000). Thành phần xơ trung tính (Neutral Detergent Fiber - NDF) được xem như là xơ tổng số của thức ăn. Thành phần hóa học NDF bao gồm: cellulose, hemicellulose, lignin, cutin, khoáng không hòa tan và protein màng và được phân tích theo phương pháp của Van Soest and Wine (1967).

Xơ thô (crude fiber - CF) được thực hiện theo phương pháp của Weende (1983), axit sulfuric được dùng để phân giải các chất hòa tan như carbohydrate, một phần protein hòa tan. Sodium hydroxit cũng được dùng để hòa tan một số chất béo và protid. Ngoài ra, axit và kiềm có thể hòa tan được một phần chất khoáng. Sau khi xử lý với hóa chất, phần còn lại được sấy ở 55°C đến khối lượng không đổi để xác định khối lượng CF bột bã mía. Ngoài ra, ở nhiệt độ cao (550°C), tất cả các chất hữu cơ có trong nguyên liệu bị đốt cháy hoàn toàn; thành phần còn lại được dùng để xác định phần trăm tro có trong nguyên liệu (Horwitz, 2000).

2.2.2 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn dạ cỏ bò

Hai mẫu dịch dạ cỏ trong các ống falcon 50 mL sau khi chuyển về phòng thí nghiệm được để lắng 10 phút để loại bỏ thức ăn thừa, mỗi 15 mL dịch ở mỗi ống được trộn chung với nhau để đồng nhất mẫu dịch dạ cỏ trước khi được dùng để phân lập vi khuẩn trên đĩa petri theo phương pháp của Robert Koch (Brock, 1961) với thành phần dung dịch khoáng của môi trường nuôi cấy dựa theo tác giả Ryckeboer *et al.* (2003) với cơ chất là bột bã mía và ủ 48 giờ ở 38°C trong bình ủ thủy tinh có nắp kín. Ngọn nên được đặt bên trong bình thủy tinh để đốt hết oxy trong bình ủ (sau này gọi là bình ủ kỵ khí). Các khuẩn lạc rời rạc khác nhau về độ nổi, dạng bìa, màu sắc được chọn để tiếp tục cấy ria trong các lần cấy chuyển tiếp theo. Những khuẩn lạc đồng nhất về hình dạng, màu sắc dạng bìa sẽ được quan sát ở vật kính độ phóng đại 100X để xác định độ rỗng của mẫu và mô tả một số đặc điểm của vi khuẩn (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2008); sau đó vi khuẩn được tồn trữ trong dung dịch glycerol 40% ở điều kiện -20°C. Tiếp theo, dựa vào hoạt tính endoglucanase (có khả năng phân giải cơ chất carboxyl methylcellulose - CMC) và exoglucanase (có khả năng phân giải bột bã mía) tạo vòng halo trên cơ chất sau khi được nhuộm với dung dịch congo red 1% (Nguyễn Đức Lượng, 2004, Teather and Wood, 1981) để tuyển chọn những chủng vi khuẩn có hoạt tính endoglucanase và exoglucanase mạnh.

2.2.3 *Đánh giá khả năng phân giải bột bã mía của vi khuẩn*

Lần lượt mỗi chủng vi khuẩn dạ cỏ trong tổng số 62 chủng vi khuẩn đã phân lập được kích hoạt trong môi trường lỏng với thành phần khoáng theo tác giả Ryckeboer *et al.* (2003) và cơ chất là bột bã mía nuôi cấy ở điều kiện 37°C trong 3 ngày; sau đó rút chuyển 1% (v/v) dịch vi khuẩn mật số 10⁷ tế bào/mL vào môi trường lỏng với cơ chất bột bã mía, ủ ở 38°C, 3 ngày trong bình ủ kỵ khí. Mỗi 20 µL dịch vi khuẩn sau nuôi cấy được chuyển vào giếng thạch cơ chất bã mía với đường kính 5 mm để khảo sát vòng halo; xơ thô (CF- crube fiber) của bã mía sau khi ủ với vi khuẩn được phân tích theo phương pháp của Weende (1983).

2.2.4 *Khảo sát khả năng phối hợp của bốn chủng vi khuẩn để phân giải bột bã mía*

Bốn chủng vi khuẩn BM13, BM21, BM49, BM97 (trong đó BM là cụm từ mô tả vi khuẩn phân lập từ môi trường cơ chất bã mía) lần lượt ký hiệu 1, 2, 3 và 4 được tuyển chọn dựa trên hoạt tính endoglucanase và exoglucanase của chúng; thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 15 nghiệm thức (NT) và 3 lần lặp lại. Vi khuẩn được bổ sung vào các nghiệm thức tương ứng như sau: NT1(1), NT2 (2), NT3 (3), NT4 (4), NT5 (1+2), NT6 (1+3), NT7 (1+4), NT8 (2+3), NT9 (2+4), NT10 (3+4), NT11 (1+2+3), NT12 (1+2+4), NT13 (1+3+4), NT14 (2+3+4), NT15 (1+2+3+4) trong đó, những tổ hợp có bằng hoặc nhiều hơn hai chủng vi khuẩn thì ở các nghiệm thức này có sự phối hợp theo tỷ lệ 1:1 hoặc 1:1:1, hoặc 1:1:1:1; bổ sung 1% (v/v) dịch vi khuẩn mật số 10⁷ tế bào/mL vào môi trường lỏng, ủ ở 38°C, 3 ngày trong bình kỵ khí. 20 µL dịch vi khuẩn sau nuôi cấy được chuyển vào giếng thạch cơ chất bã mía với đường kính 5 mm để khảo sát vòng halo trên sau khi nhuộm với dung dịch Congo Red; lượng xơ bã mía còn lại của mỗi nghiệm thức được dùng để phân tích hàm lượng CF.

2.2.5 *Ảnh hưởng của vi khuẩn dạ cỏ bò phân giải bột bã mía trong điều kiện in vitro*

Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 6 nghiệm thức (NT), 3 lần lặp lại; trong đó nghiệm thức đối chứng (ĐC) không bổ sung vi khuẩn, NT từ 1 đến 5 lần lượt bổ sung 2, 4, 6, 8, 10% (v/v) dịch vi khuẩn với mật số 10⁷ tế bào/mL vào mỗi nghiệm thức. Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp *in vitro* của Tilley và Terry (1963). Cho dung dịch đệm và dịch dạ cỏ vào lọ phun sơn tối màu theo tỷ lệ 4:1. Tổ hợp vi khuẩn BM13:BM21:BM49 được phối trộn theo tỷ lệ 1:1:1 dùng để chủng vào từng nghiệm thức theo mô tả ở

trên; Sau 3 ngày ủ ở 38°C, thu mẫu để đánh giá kết quả thí nghiệm theo các chỉ tiêu CF, NDF.

2.2.6 *Phân tích phả hệ của vi khuẩn dựa vào trình tự di truyền 16S r DNA*

DNA của vi khuẩn dạ cỏ bò BM13, BM21 và BM49 được trích ly theo phương pháp của Sambrook *et al.* (1989), sau đó được khuếch đại bằng cặp mồi 8F 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' Sambrook *et al.* (1989). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% có bổ sung ethidium bromide (EtBr) và chụp hình gel bằng hệ thống gel Bio-Rad UV 2000 (Hoa Kỳ); giải trình tự bằng hệ thống giải trình tự tự động DNA ABI3130, kết quả giải trình tự được sử dụng để so sánh trình tự trên ngân hàng gen (Genebank) bằng chương trình BLAST N.

Trình tự 3 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM13, BM21, BM49 cùng với trình tự vùng 16S rDNA của một số chủng vi khuẩn được sử dụng để vẽ sơ đồ phả hệ để xác định quan hệ giữa các loài bằng phần mềm Mega 6.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần nguyên liệu bã mía

Phần trăm VCK bột bã mía khoảng 93,7% (Bảng 1). Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu về bột bã mía của Shakweer (2003), Ilindra and Dhake (2008) với VCK lần lượt là 94,6% và 93,3%. Với việc được xử lý bằng dung dịch tẩy trung tính bằng hệ thống phân tích VELP, tỉ lệ NDF của bã mía thu được 89,1% tức là 891 g/kg VCK (Bảng 1), kết quả này cao hơn một ít so với kết quả của Bueno *et al.* (2005) với NDF ban đầu là 880 g/kg VCK nhưng thấp một ít so với kết quả nghiên cứu của Vitti *et al.* (1999) là 889 g/kg DM. Kết quả này cũng cho thấy tỉ lệ NDF trong bã mía rất cao so với tỉ lệ NDF ở những loại thức ăn khác của bò như rom lúa mì là 774 g/kg VCK, bột đậu nành 158 g/kg VCK, hạt bắp 267 g/kg VCK (Bueno *et al.*, 2005). Bên cạnh đó, lượng xơ thô (crude fiber - CF) của bã mía là 69,8%. Kết quả này cao hơn so với kết quả hàm lượng xơ thô bã mía trong nghiên cứu của Hồ Sĩ Tráng (2003) chỉ với 40-50%, và cũng cao hơn so với kết quả của Đào Lệ Hằng (2008) với lượng xơ thô của ngọn, lá mía là 42,9%.

Bảng 1: Thành phần hóa học bã mía

% VCK (w/w)	% NDF (w/w)	% CF (w/w)	% Tro (w/w)
93,7	89,1	69,8	1,69

* Chú thích: VCK: Vật chất khô, NDF: Netral detergent fiber, CF: crube fiber, w/w: khối lượng/khối lượng

3.2 Kết quả phân lập và nhận diện vi khuẩn dạ cỏ bò

Độ nổi khuẩn lạc của vi khuẩn dạ cỏ có 4 dạng: mô, lồi, phẳng và cầu chông; trong đó, khuẩn lạc vi khuẩn dạ cỏ bò dạng mô có 32/62 chủng vi khuẩn (51,6%), dạng lồi có 27/62 mẫu (27,4%), dạng phẳng có 2 mẫu (3,23%) và 1 mẫu vi khuẩn dạ cỏ bò dạng cầu chông (1,61%). Dạng bì của khuẩn lạc vi khuẩn dạ cỏ bò có 3 loại là: Bì nguyên, răng cưa và xẻ thùy. Dạng bì nguyên có 34/62 mẫu (54,8%), dạng bì răng cưa có 23/62 mẫu (37,1%) và dạng xẻ thùy có 5/62 mẫu (8,07%). Màu sắc của khuẩn lạc có 4 loại bao gồm trong, trắng đục, vàng và cam. Dạng màu trắng trong có 5/62 mẫu (8,07%), dạng màu trắng đục có 35/62 mẫu (56,5%), dạng màu vàng có 21/62 mẫu (33,9%) và dạng màu cam có 1/62 mẫu (1,61%). Trong số 62 mẫu vi khuẩn dạ cỏ bò, ta nhận thấy có 38/62 mẫu vi khuẩn dạ cỏ bò không có khả năng chuyển động (61,3%), còn lại 24/62 mẫu (38,7%) vi khuẩn dạ cỏ bò có khả năng chuyển động thể hiện qua khả năng mọc lan rộng quanh vết cấy trên môi trường thạch bán lỏng.

Tế bào vi khuẩn dạ cỏ bò có 3 dạng là: cầu, que ngắn và que dài trong đó tế bào vi khuẩn dạ cỏ bò hình cầu có 10/62 mẫu (16,1%), tế bào vi khuẩn dạ cỏ bò hình que ngắn có 42/62 mẫu (67,7%), 10/62 mẫu que dài (16,1%). Trong số 62 mẫu vi khuẩn dạ

cỏ bò, có 38/62 mẫu vi khuẩn dạ cỏ bò không có khả năng di động (61,3%), còn lại 24/62 mẫu vi khuẩn dạ cỏ bò có khả năng di động thể hiện qua khả năng mọc lan rộng quanh vết cấy trên môi trường thạch bán lỏng (38,7%). Khi tiến hành nhuộm Gram vi khuẩn, kết quả cho thấy 36/62 mẫu vi khuẩn dạ cỏ bò là gram âm (59,7%), còn lại 26/62 chủng vi khuẩn gram dương (40,3%). Kết quả xác định hoạt tính catalase cho thấy 61/62 chủng vi khuẩn đều dương tính với catalase, chỉ duy nhất mẫu BM35 có kết quả âm tính với catalase. Kết quả này chứng tỏ 61 chủng vi khuẩn đều sử dụng oxi trong quá trình sinh trưởng có nghĩa là chúng có khả năng là những chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc, riêng mẫu BM35 có thể là chủng vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt (strict anaerobe).

3.3 Kết quả tuyển chọn vi khuẩn dạ cỏ bò dựa vào hoạt tính endoglucanase và exoglucanase

CMC là cơ chất cellulose thường được dùng để xác định sự hiện diện enzym endoglucanase (Lynd *et al.*, 2002). Ngoài ra, Loa *et al.* (2009) cho rằng để thủy phân hoàn toàn bã mía cũng như các cơ chất cellulose tự nhiên khác, vi khuẩn cần có đầy đủ hệ enzyme cellulase, đặc biệt là enzyme exoglucanases để phá vỡ cấu trúc vùng tinh thể của cellulose. Do đó, cellulose thường được dùng để đánh giá sự hiện diện của enzyme exocellulase và hoạt tính của toàn bộ hệ enzyme cellulase.

Bảng 2: Đường kính vòng halo trên cơ chất CMC

vkdc bò	ĐK vòng halo (mm)	vkdc bò	ĐK vòng halo (mm)	vkdc bò	ĐK vòng halo (mm)	vkdc bò	ĐK vòng halo (mm)
BM3	6,7 ^{qrs} ±0,58	BM35	27,3 ^{bcd} ±1,53	BM71	11,3 ^{opq} ±1,15	BM97	30,7 ^b ±3,79
BM5	3,7 st ±1,15	BM41	3,0 st ±0,00	BM73	20,3 ^{ghijk} ±1,15	BM99	20,3 ^{ghijk} ±1,15
BM11	18,3 ^{hijkl} ±1,15	BM43	11,7 ^{nopq} ±1,15	BM75	10,3 ^{opqr} ±1,15	BM103	27,7 ^{bcd} ±6,43
BM13	25,0 ^{cdefg} ±5,29	BM45	23,0±2,00	BM77	3,7 st ±0,58	BM105	30,3 ^{bc} ±5,03
BM15	10,3 ^{opqr} ±1,15	BM47	14,3 ^{lmno} ±1,15	BM79	9,7 ^{opqr} ±1,15	BM107	23,7 ^{defgh} ±1,15
BM17	5,7 ^{rs} ±1,15	BM49	40,3 ^a ±2,31	BM81	14,3 ^{lmno} ±1,15	BM113	18,3 ^{hijkl} ±0,58
BM19	5,7 ^{rs} ±1,15	BM59	25,0 ^{cdefg} ±0,00	BM83	10,3 ^{opqr} ±2,31	BM115	25,7 ^{bcd} ±1,15
BM21	22,3 ^{defghij} ±2,31	BM61	17,7±1,15	BM85	27,0 ^{bcd} ±2,00	BM117	3,3 st ±0,58
BM27	5,0 ^{rst} ±0,00	BM63	5,0 ^{ijklmn} ±0,00	BM87	15,0 ^{klmno} ±0,00	BM119	25,7 ^{bcd} ±0,58
BM31	17,0 ^{ijklmn} ±2,00	BM67	7,7 ^{pqrs} ±1,15	BM93	19,7 ^{ghijkl} ±0,58	BM121	18,3 ^{hijkl} ±1,15
BM33	5,0 ^{rst} ±0,00	BM69	22,0 ^{cdefghij} ±1,00	BM95	12,3 ^{mno} ±0,58	BM123	8,0 ^{pqrs} ±1,00

* Ghi chú: ĐK: đường kính, vkdc bò: vi khuẩn dạ cỏ bò; Các giá trị là trung bình của 3 lần lặp lại, các giá trị cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%, CV = 14,41%

Bảng 3: Đường kính vòng halo trên cơ chất bột bã mía

vkdc bò	ĐK vòng halo (mm)	vkdc bò	ĐK vòng halo (mm)	vkdc bò	ĐK vòng halo (mm)	vkdc bò	ĐK vòng halo (mm)
BM1	16,3 ^{ghi} ±1,15	BM29	35,0 ^a ±7,64	BM57	24,3 ^{cd} ±1,15	BM83	25,7 ^{bcd} ±1,15
BM3	5,0 ^{mno} ±0,00	BM33	17,7 ^{fghi} ±0,58	BM59	15,3 ^{hij} ±0,58	BM85	23,0 ^{def} ±3,46
BM7	18,3 ^{efgh} ±1,15	BM35	2,7 ^{op} ±0,58	BM63	12,3 ^{ijkl} ±1,15	BM89	18,7 ^{efgh} ±0,58
BM9	18,7 ^{efgh} ±0,58	BM37	17,7 ^{fghi} ±0,58	BM65	14,3 ^{hij} ±1,15	BM97	25,0 ^{cd} ±0,00
BM13	31,0 ^{ab} ±1,00	BM45	23,0 ^{def} ±3,46	BM69	17,3 ^{ghi} ±0,58	BM109	7,0 ^{lmno} ±2,00
BM21	29,7 ^{abc} ±3,06	BM51	5,3 ^{mno} ±1,15	BM73	8,3 ^{klmn} ±1,15	BM111	26,3 ^{bcd} ±1,15
BM23	23,7 ^{de} ±1,15	BM53	13,7 ^{hijk} ±1,15	BM75	18,0 ^{fgh} ±1,00	BM113	26,3 ^{bcd} ±1,15
BM27	3,0 ^{nop} ±1,00	BM55	6,3 ^{mno} ±1,15	BM79	21,3 ^{defg} ±0,58	BM117	17,7 ^{fghi} ±1,15
						BM123	10,3 ^{ijklm} ±0,00

* Ghi chú: ĐK: đường kính, vkdc bò: vi khuẩn dạ cỏ bò; Các giá trị là trung bình của 3 lần lặp lại, các giá trị cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% CV = 17,42%

Kết quả cho thấy 44 trong 62 chủng VKDC bò có hoạt tính endoglucanase thể hiện qua khả năng phân giải cơ chất CMC (Bảng 2) và 33 trong 62 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò có hoạt tính exoglucanase thể hiện qua khả năng tạo vòng tròn halo trên cơ chất bột bã mía (Bảng 3).

Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn BM49 có khả năng phân giải CMC mạnh nhất với đường kính vòng halo là 40,3 mm, khác biệt có ý nghĩa với các chủng vi khuẩn khác ở mức 5% (Bảng 2). Hoạt tính endoglucanase của chủng vi khuẩn BM49 cao hơn hoạt tính endoglucanase của chủng vi khuẩn được phân lập từ con sùng với đường kính vòng halo là 26,7 mm (Nguyễn Phú Cường, 2011) và cao hơn hoạt tính endoglucanase của chủng vi khuẩn được phân lập từ bột bã mía đang phân hủy với đường kính vòng halo là 30 mm (Nguyễn Văn Chấn, 2009). Bên cạnh đó, các chủng vi khuẩn BM97, BM105, BM103, BM35, BM85, BM119, BM115, BM13, BM59, BM107, BM45, BM21, BM69 cũng cho thấy có hoạt tính endoglucanase cao với khả năng phân giải cơ chất tạo đường kính vòng halo dao động từ 30,7 mm đến 22 mm. Ngoài ra, chủng vi khuẩn BM97 có khả năng phân giải mạnh CMC với đường kính vòng halo trung bình là 30,7 mm, khác biệt không ý nghĩa thống kê với đường kính vòng halo của một số mẫu BM105, BM103, BM35, BM85, BM119, BM115 nhưng khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức còn lại ở mức ý nghĩa 5%.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM29 (Bảng 3) có khả năng phân giải bã mía mạnh nhất với đường kính vòng halo là 35 mm, tuy khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đường kính vòng halo phân giải bột bã mía của hai chủng vi khuẩn dạ cỏ BM13 và BM21 với đường kính vòng halo lần lượt là 35,3 và 29 mm, nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% với các kết quả đường kính vòng halo được tạo bởi exoglucanase của các chủng vi khuẩn dạ cỏ còn lại.

Kết quả này cũng cho thấy chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM29 có khả năng tạo vòng halo trên cơ chất bã mía lớn hơn nhiều so với kết quả phân giải bột bã mía của chủng vi khuẩn 22 chỉ với đường kính vòng halo là 5 mm (Nguyễn Thị Thanh Trúc, 2011); và cao hơn kết quả phân giải bột xoài của chủng vi khuẩn M12 được phân lập từ ruột mỗi chỉ với đường kính vòng halo là 25 mm được (Nguyễn Phú Cường và *ctv.*, 2011). Bên cạnh đó, các chủng vi khuẩn BM113, BM83, BM111, BM97, BM57, BM23, BM85, BM45, BM79, cũng cho thấy có khả năng tạo đường kính vòng halo dao động từ 26,3 mm đến 23 mm.

Tóm lại, qua việc đánh giá hoạt tính endoglucanase và exoglucanase của 62 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò, bước đầu đã chọn ra được 21 chủng vi khuẩn dạ cỏ trong đó có 14 chủng vi khuẩn dạ cỏ có hoạt tính endocellulase mạnh nằm trong nhóm 44 chủng vi khuẩn dạ cỏ có hoạt tính endoglucanase bao gồm BM49, BM97, BM105, BM103, BM35, BM85, BM119, BM115, BM13, BM59, BM107, BM45, BM21 và BM69; bên cạnh 12 chủng vi khuẩn dạ cỏ có exocellulase mạnh trong nhóm 33 chủng vi khuẩn dạ cỏ có hoạt tính exoglucanase bao gồm BM29, BM13, BM21, BM113, BM83, BM111, BM97, BM57, BM85, BM23, BM45 và BM79.

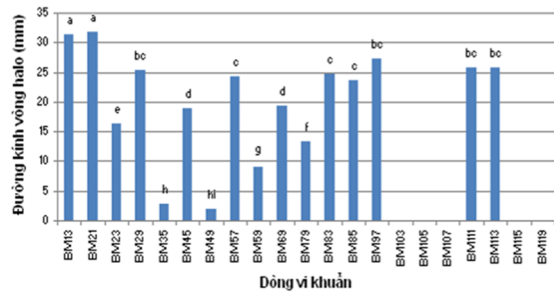
3.4 Kết quả phân giải bã mía của 21 chủng vi khuẩn dạ cỏ

Trong quá trình phân giải xơ bột bã mía được đạt hiệu quả cao cần có những chủng vi sinh vật có hệ endoglucanase và exoglucanase mạnh. Do đó, việc chọn lọc những chủng vi khuẩn dạ cỏ bò có hoạt tính mạnh về endoglucanase và exoglucanase cũng như nghiên cứu sự hỗ trợ nhau trong quá trình phân giải cellulose từ bột bã mía của những chủng vi khuẩn dạ cỏ bò có endoglucanase mạnh để bổ sung cho quá trình phân giải bột bã mía của những chủng vi khuẩn dạ cỏ có exoglucanase mạnh đã được đặt ra.

Kết quả phân tích hoạt tính exoglucanase của 21 chủng vi khuẩn dạ cỏ cho thấy có 16 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò bao gồm BM13, BM21, BM97, BM111, BM113, BM29, BM83, BM57, BM85, BM69, BM45, BM23, BM79, BM59, BM35, BM49 (Hình 1) lần lượt thể hiện khả năng phân giải bột bã mía để tạo đường kính vòng halo từ lớn nhất là 31,7 (chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM13) và nhỏ nhất là 2 mm (chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM49). Bên cạnh bốn chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM97, BM111, BM113 và BM29 lần lượt thể hiện hoạt tính exoglucanase với kết quả đo được đường kính vòng halo phân giải bột bã mía lần lượt là 27,3; 25,7; 25,5; và 25,3 mm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (Hình 1). Tuy nhiên, chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM97 có hoạt tính endoglucanase mạnh nhất trong nhóm 4 chủng vi khuẩn dạ cỏ này thể hiện với đường kính vòng halo phân giải CMC là 30,7 mm (Bảng 2). Ngoài ra, chủng vi khuẩn BM49 cũng cho thấy có hoạt tính endoglucanase mạnh nhất (Bảng 3).

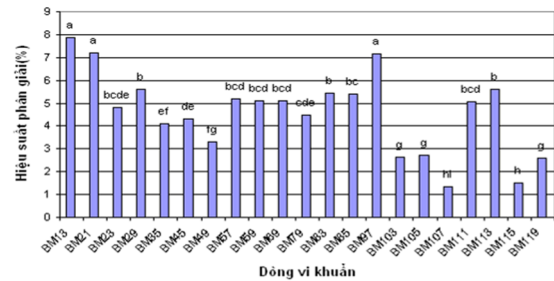
Kết quả phân tích hàm lượng xơ (CF) cho thấy sau 3 ngày nuôi cấy, các chủng vi khuẩn đã phân giải được từ 1,4% đến 7,9 % cơ chất bã mía. Kết quả phân tích (Hình 2) cũng chỉ ra rằng 3 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM13, BM21, BM97 có hiệu suất phân giải bã mía cao nhất lần lượt là 7,9%, 7,2%, 7,2% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với 18 chủng vi khuẩn còn lại. Chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM49 cũng cho thấy có khả năng phân giải bột bã mía thông qua hiệu suất phân giải bột bã mía đạt được khoảng 4,2%. Trong thí nghiệm này cũng có hiện tượng 5 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM103, BM105, BM107, BM115, BM119 mặc dù không tạo đường kính vòng halo trên môi trường bã mía nhưng hiệu suất phân giải bột bã mía vẫn cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với mẫu đối chứng. Hiện tượng này cũng được Varel *et al.* (1995) chỉ ra rằng một số chủng vi khuẩn được phân lập từ dạ cỏ không phát triển khuẩn lạc tốt trên môi trường cellulose nhưng vẫn có khả năng làm giảm hàm lượng cellulose trong môi trường nuôi cấy.

Như vậy, qua việc đánh giá hoạt tính exoglucanase thông qua đường kính vòng halo phân giải bột bã mía và đánh giá hiệu suất phân giải bột bã mía đã chọn được 4 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò, trong đó bao gồm 3 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM13, BM21 và BM97 có exoglucanase và endoglucanase mạnh và 1 chủng vi khuẩn BM49 có hoạt tính endoglucanase mạnh nhất được sử dụng để bố trí thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1: Đường kính vòng halo phân giải bột bã mía*

* Các giá trị là trung bình 3 lần lặp lại, giá trị cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; CV = 4,59%

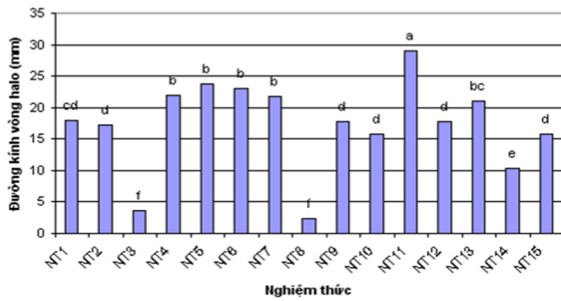


Hình 2: Hiệu suất phân giải bột bã mía**

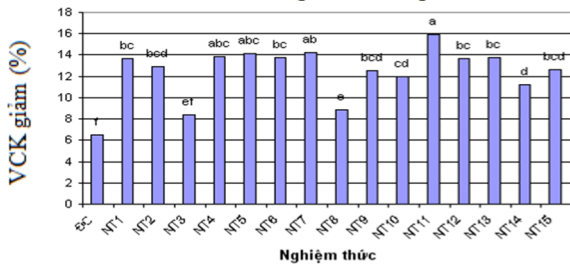
** Các giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, giá trị cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; CV = 7,08%

3.5 Kết quả phối hợp bốn chủng vi khuẩn

Kết quả cho thấy NT1 (BM13), NT2 (BM21), NT3 (BM49) và NT4 (BM97) tạo đường kính vòng halo nhỏ so với một số nghiệm thức có phối hợp các chủng vi khuẩn với nhau như NT5 (BM13 và BM21), NT6 (BM13 và BM49), NT7 (BM13 và BM97) có đường kính vòng halo lần lượt là 23,7 mm; 23 mm; 21,7 mm (Hình 3); tổ hợp BM13, BM21 và BM49 (NT11) có đường kính vòng halo lớn nhất 29 mm và khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ở mức 5%; cho thấy có thể có sự tương tác tích cực hoặc ức chế giữa các chủng vi khuẩn với nhau. BM13 và BM21 có khả năng sinh exoglucanase mạnh phối hợp với BM49 có khả năng sinh endoglucanase mạnh nên phối hợp 3 chủng vi khuẩn BM13, BM21 và BM49 sinh enzyme phân giải bã mía mạnh nhất; kết quả (Hình 4) cho thấy NT11 lượng VCK mất đi nhiều nhất là 15,9%, mặc dù khác biệt không ý nghĩa với NT4, NT5, NT6, NT7 nhưng khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức còn lại ở mức 5%. Theo Trần Cừ (1979) hoạt động kết hợp của endoglucanase và exoglucanase sẽ dẫn đến thay đổi đặc điểm bề mặt của phân tử cellulose từ đó sẽ làm cho tỷ lệ phân giải thay đổi nhanh chóng.



Hình 3: Đường kính vòng halo*



Hình 4: VCK giảm**

Các giá trị trung bình 3 lần lặp lại, giá trị cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; *CV = 6,22%; **CV = 5,73%

3.6 Phân giải bã mía của vi khuẩn dạ cỏ bò ở điều kiện in vitro

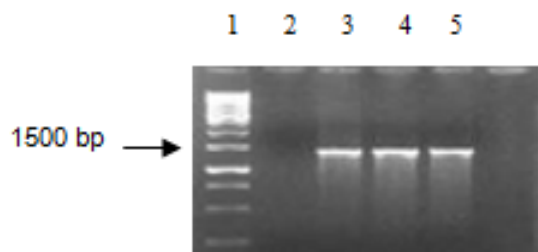
Kết quả (Bảng 4) cho thấy NT3 (6% v/v tổ hợp

Bảng 4: Tỷ lệ tiêu hóa NDF và CF

	Tỷ lệ bổ sung tổ hợp vi khuẩn dạ cỏ bò (BM13:BM21:BM49 = 1:1:1) (%)					
	0	2	4	6	8	10
NDF (%)	39,3 ^c ±2,75	39,9 ^{bc} ±0,43	40,1 ^{bc} ±0,85	45,1 ^a ±1,97	43,9 ^{ab} ±0,89	42,4 ^{abc} ±0,82
CF (%)	35 ^{bc} ±2,86	33,1 ^c ±0,76	35,6 ^{bc} ±1,68	42,6 ^a ±1,14	39,4 ^{ab} ±2,03	37,7 ^{abc} ±1,58

* Các giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, giá trị cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; CV_{NDF} = 3,61%; CV_{CF} = 4,87%

3.7 Kết quả điện di sản phẩm PCR



Hình 5: Điện di sản phẩm PCR với cặp mồi 8F và 1492R

* Giếng 1 = thang 1kb; Giếng 2 = đối chứng âm; Giếng 3: BM13; Giếng 4: BM21; Giếng 5: BM49

Để nhận diện các chủng vi khuẩn đã được tuyển chọn, các chủng vi khuẩn được ly trích DNA theo phương pháp của Sambrook *et al.* (1989) và cặp mồi 8F và 1492R (Turner *et al.*, 1999) để khuếch

3 chủng vi khuẩn BM13:BM21:BM49 theo tỷ lệ 1:1:1) cho tỷ lệ tiêu hóa NDF, CF cao nhất lần lượt là 45,1 và 42,6% (m/m) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với nghiệm thức đối chứng (ĐC), NT1, NT2. Gall và Huhtanen (1951) cho biết đối với quá trình tiêu hóa nhai lại, điều quan trọng không chỉ là tỷ lệ các loài vi khuẩn trong dạ cỏ mà là số lượng của chúng hay tổng số vi khuẩn. Vì thế, có thể ở NT3 đạt được tốt nhất về tỷ lệ các loài vi khuẩn trong dạ cỏ và cả tổng số vi khuẩn nên cho kết quả tỷ lệ tiêu hóa cao nhất. NT4 và NT5 mặc dù được bổ sung lượng vi khuẩn lớn hơn nhưng có thể đã làm ảnh hưởng đến cân bằng hệ vi sinh vật trong dạ cỏ nên khả năng tiêu hóa kém hơn NT3. Theo Bryant và Burkey (1953) cho biết hệ vi sinh vật dạ cỏ là một hệ thống được cân bằng tốt, sự biến đổi tổng số của hệ này ít phụ thuộc vào đặc tính thức ăn nhưng quan hệ nhiều đến mức độ pha loãng chất chứa dịch dạ cỏ sau khi ăn, đặc điểm nuôi dưỡng và tốc độ sinh sản giữa những nhóm vi sinh vật.

Kết quả cho thấy với việc bổ sung 6% v/v dịch vi khuẩn tổ hợp 3 chủng vi khuẩn BM13, BM21 và BM49 với mật số 10^7 tế bào/mL thì khả năng tiêu hóa thức ăn ở bò tốt nhất, vì vậy có thể ứng dụng tổ hợp 3 chủng vi khuẩn này bổ sung vào khẩu phần thức ăn xơ của bò nhằm giúp bò cải thiện khả năng tiêu hóa chất xơ hiệu quả.

đại vùng 16S rDNA của 3 chủng vi khuẩn BM13, BM21, BM49 (Hình 5). Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và được giải mã trình tự nucleotide.

3.8 Kết quả giải trình tự

Kết quả giải trình tự vùng 16S rDNA của 3 chủng vi khuẩn BM13, BM21, BM49 và được so sánh với ngân hàng gen NCBI bước đầu xác định được 3 chủng vi khuẩn này lần lượt tương đồng với *Achromobacter xylosoxidans* BL6, *Bacillus subtilis* S20, *Uncultured Bacillus* sp. Filt.171 lần lượt với mức đồng hình là 91% , 94% và 94%.

Theo Brenner *et al.* (2005b), vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* có tế bào hình que, Gram âm (-), catalase dương tính và có khả năng phát triển trong môi trường kỵ khí (anaerobic). Điều này phù hợp với một số đặc điểm tế bào của chủng BM13. Bên cạnh đó, *Achromobacter xylosoxidans* cũng có khả năng phân giải

hemicellulose và cellulose, sau 14 ngày nuôi trong môi trường nuôi cấy làm giảm 67,3% hàm lượng cellulose và 73,5% hàm lượng hemicellulose, hoạt động tốt ở pH 5 - 6 (Yang *et al.*, 2011).

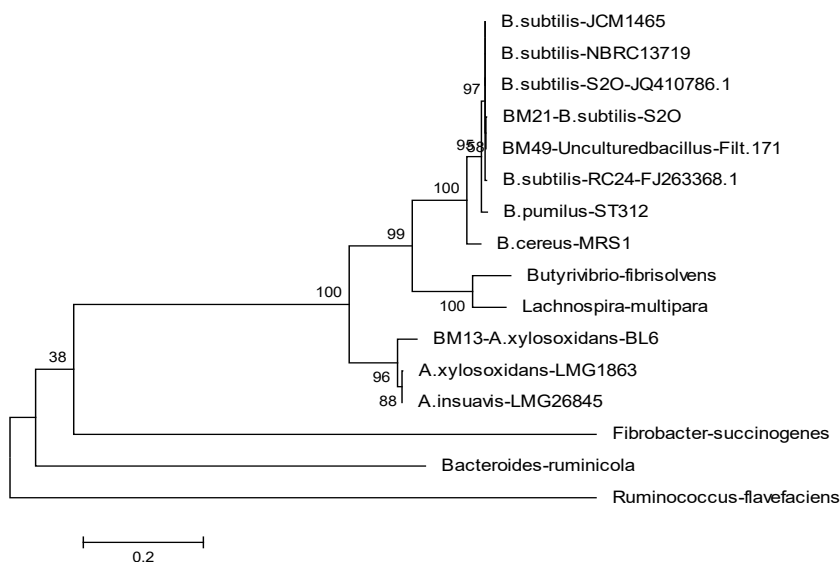
Bacillus subtilis là vi khuẩn hình que, Gram dương, di động bằng chiên mao (flagellum) và có khả năng sống trong môi trường kỵ khí (Nakano and Zuber, 1998; Perez *et al.*, 2000). Những đặc điểm này phù hợp với kết quả mô tả tế bào chủng vi khuẩn BM21 và BM49 và điều kiện nuôi cấy của hai chủng vi khuẩn dạ cỏ này. Tuy nhiên, *Bacillus* khi phát triển trên môi trường thạch đĩa có bìa răng cưa (Nguyễn Lâm Dũng và *ctv.*, 1997). Trong hai chủng vi khuẩn này, chỉ có chủng vi khuẩn BM21 có bìa răng cưa nên khả năng chủng vi khuẩn BM21 tương đồng với *B. subtilis*. Bên cạnh đó, *B. subtilis* cũng đã được phân lập từ dạ cỏ trâu, bò (Sivers *et al.*, 1977; Microbial, 1999) và từ ruột cá (Ray *et al.*, 2007) và có khả năng sinh tổng hợp cellulase trong điều kiện từ 36 - 50°C (Lương Đức Phẩm, 1998) và nhiệt độ tối ưu của quá trình này là 40°C (Shabeb *et al.*, 2010).

Mặc dù chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM49 có đặc điểm tế bào (như vi khuẩn hình que ngắn, Gram dương, có khả năng di động và có khả năng được nuôi cấy trong bình ủ kỵ khí) tương đồng với chủng vi khuẩn *Bacillus*, nhưng khuẩn lạc có dạng tròn, mô và bìa nguyên. Bên cạnh đó, kết quả so sánh trình tự vùng 16S rDNA của chủng vi khuẩn BM49 với kho dữ liệu trên ngân hàng gen của NCBI bằng phần mềm BlastN đã cho thấy chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM49 tương đồng với *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* và *Uncultured Bacillus* sp. Như vậy, với đặc điểm khuẩn lạc không tương

đồng với đặc điểm khuẩn lạc của chủng *Bacillus* nhưng kết quả phân tích rDNA đã cho thấy chủng vi khuẩn dạ cỏ BM49 có trình tự di truyền vùng 16S gần với chủng *Bacillus* nên có nhiều khả năng chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM49 được phân lập từ dạ cỏ và được nuôi cấy trong bình ủ kỵ khí ở điều kiện nhiệt độ 38°C với cơ chất là bột bã mía tương đồng với chủng vi khuẩn *Uncultured Bacillus* sp. Filt.171 ở mức độ 94%.

3.9 Kết quả phân tích phả hệ

Trình tự 3 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò BM13, BM21, BM49 cùng với trình tự vùng 16S rDNA của 5 chủng vi khuẩn dạ cỏ phân giải cellulose cao bao gồm *Bacteroides ruminicola*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvans* và *Lachnospira multipara* (Kamra, 2005), 6 trình tự vùng 16S rDNA của 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* và 2 trình tự vùng 16S rDNA của 2 chủng vi khuẩn *A. xylosoxidans* từ kho dữ liệu NCBI được sử dụng vẽ sơ đồ phả hệ để xác định quan hệ giữa các loài bằng phần mềm Mega 6.0 thông qua phương pháp Test maximum likelihood tree. Kết quả cho thấy 2 chủng vi khuẩn BM21 và BM49 có quan hệ rất gần với các chủng vi khuẩn *Bacillus* thông qua việc phân tích trình tự di truyền 16S rDNA với chỉ số Bootstrap là 100%, nhưng lại có quan hệ xa với một số chủng vi khuẩn dạ cỏ như *Fibrobacter succinogenes*, *Bacteroides ruminicola*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvans* và *Lachnospira multipara* (Hình 6). Bên cạnh đó chủng vi khuẩn BM13 cũng có quan hệ gần với hai chủng vi khuẩn *A. xylosoxidans* kèm theo độ tin cậy cao với chỉ số Bootstrap đầu nhánh là 96%.



Hình 6: Giản đồ phả hệ mô tả tương quan di truyền giữa các chủng vi khuẩn

* Các chỉ số CI = 0,2, chỉ số bootstrap được ghi trên đầu các nhánh trong giản đồ

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết quả

Tổ hợp 6% (v/v) của 3 chủng vi khuẩn BM13, BM2 và BM49 được phối trộn theo tỷ lệ 1:1:1 đã được tuyển chọn từ 62 chủng vi khuẩn dạ cỏ bò đã cho thấy có khả năng phân giải bã mía hiệu quả trong điều kiện *in vitro*.

Kết quả phân tích trình tự vùng 16S rDNA của 3 chủng vi khuẩn BM13, BM21, BM49 bằng phần mềm BlastN cùng với phân tích quan hệ di truyền bằng phương pháp Test maximum likelihood tree đã cho thấy chúng lần lượt tương đồng với các chủng vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* BL6, *Bacillus subtilis* S2O, *Uncultured Bacillus* sp. Filt.171 ở các mức đồng hình là 91% , 94% và 94%.

4.2 Đề xuất

Nghiên cứu sự ổn định di truyền của các chủng vi khuẩn BM13, BM21, BM49 trong quá trình bảo quản trước khi nghiên cứu tạo chế phẩm vi khuẩn dạng bột sử dụng như men tiêu hóa chất xơ để thử nghiệm nuôi bò ở hộ gia đình và nông trang.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến lãnh đạo Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử, Phòng thí nghiệm Chăn nuôi Tiên tiến - Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng đã tạo điều kiện cho nhóm nghiên cứu triển khai thí nghiệm đúng tiến độ; tác giả cũng xin gửi lời cảm ơn đến Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ và cán bộ phản biện đã góp ý cho bài báo được hoàn thiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Brenner, Don J., P. De Vos, G. M. Garrity, M. Goodfellow, N.R. Krieg, F.A. Rainey and Karl-Heinz Schleifer, 2005b. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd edition. volume 2. Springer. USA. 1136 pp

Brock, T.D., 1961. *Milestones in Microbiology*. Hall International, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 275 pages.

Bryant, M.P., Burkey, L.A., 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science*. 36: 205-217.

Bueno, I.C.S., Cabral Filho, S.L.S., Gobbo, S.P., Louvandini, H., Vitti, D.M.S.S. and Abdalla, A.L., 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. *Animal feed science and technology*. 123-124: 95-105.

Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2008. Bài giảng thực hành vi sinh vật đại cương. Nhà xuất bản Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ, 54 trang.

Đào Lê Hằng, 2008. Phương pháp chủ động thức ăn xanh ngoài cỏ cho gia súc. Nhà xuất bản Hà Nội. Hà Nội, 203 trang.

Gaggia, F., Mattarelli, P. and Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*. 141: S15-S28.

Gall, L.S. and Huhtanen, C.N., 1951. Rumen Organisms. *Journal of Dairy Science*. 34: 353-362.

Hồ Sĩ Tráng, 2006. Cơ sở hóa học gỗ và cellulose tập 1. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội, 584 trang.

Horwitz, W., 2000. The scientific association Dedicated to analytical Excellence: Official methods of analysis. AOAC International, Washington D.C., USA. 255-275.

Ilindra, A. and Dhake, J.D., 2008. Microcrystalline cellulose from bagasse and rice straw. *Indian Journal of Chemical Technology*. 15: 497-499.

Kamra, D.N., 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current science*. 89(1): 124-135.

Loa, Y. C, G. D. Saratalea, W. M. Chenb, M. D. Baic, J. S. Changa. 2009. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 417- 425.

Lương Đức Phẩm, 1998. Công nghệ vi sinh vật. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội, 358 trang.

Lynd, L.R, Weimer, P.J., van Zyl, W.H. and Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(3): 506-577.

Microbial, O.C., 1999. Formation of organic acids by strain of *Bacillus mesentericus* and *Bacillus subtilis* isolated from the rumen of cattle. *Mikrobiology*. 39: 31-33.

Nakano, M.M. and Zuber, P., 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" *Bacillus subtilis*. *Annual Review Microbiology*. 52: 165-190.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. 153: 375-380.

Nguyễn Đức Lượng, 2004. Công nghệ enzyme. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Thành phố Hồ Chí Minh, 534 trang.

Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyển và Phạm Văn Ty, 1997. Vi sinh vật học. Tái bản lần thứ tư. Nhà xuất bản Giáo dục. Hà Nội, 408 trang.

Nguyễn Phú Cường, 2011. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân giải cellulose từ hệ tiêu hóa của con mồi. Đề tài nghiên cứu khoa học sinh viên cấp Trường 2010. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

Nguyễn Thị Thanh Trúc. 2011. Tuyển chọn và khảo sát điều kiện nuôi cấy các dòng vi khuẩn hiệu khí có khả năng thủy phân bã mía. Luận văn tốt

- ngành Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
- Nguyễn Văn Chấn, 2009. Phân lập một số chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose trong bột bã mía đang phân giải. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
- Oyeleke, S.B. and Okusanmi, T.A., 2008. Isolation and characterization of cellulose hydrolysing microorganism from the rumen of ruminants. *Academic Journals*. 7(10): 1503-1504.
- Perez, A.R., Abanes-De Mello, A. and Pogliano, K., 2000. SpoIIB Localizes to Active Sites of Septal Biogenesis and Spatially Regulates Septal Thinning during Engulfment in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 182(4): 1096-1108.
- Ray, A.K., Bairagi, A., Ghosh, K.S. and Sen, S.K., 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 37(1): 47-53.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., and Swings, J., 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 127-137.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1626 pages.
- Sanders, M.E., Morelli, L. and Tompkins, T.A., 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 101-110.
- Shabeb, M.S.A., Younis, M.A.M, Hezayen, F.F., Nour-Eldein, M.A., 2010. Production of cellulase on Low-Cost Medium by *Bacillus subtilis* KO Strain. *World Applied Sciences Journal*. 8(1): 35-42.
- Shakweer, I.M., 2003. Effect of biological treatments of rice straw and sugarcane bagasse on their digestibility, nutritive value, ruminal activity and some blood parameters in rams. *Egyptian Journal Nutrition and Feeds*. 6: 925-940.
- Sivers, V.S., Topchii, M.P. and Kovalevskaia, T.M., 1977. Formation of organic acids by strain of *Bacillus mesentericus* and *Bacillus subtilis* isolated from the rumen of cattle. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii*. 39(1): 31-33.
- Teather, R.M. and Wood, P.J., 1981. Use the Congo Red-Polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from Bovine rumen. *Applied Environment Microbiology*. 43(4): 777-780.
- Tilley, J.M.A. and Terry, R.A., 1963. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*. 18: 104-111.
- Trần Cừ, 1979. Sinh lý và hóa sinh tiêu hóa của động vật nhai lại. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội. Hà Nội, 270 trang.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P. and Palmer, J.D., 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46(4): 327-338.
- Van Soest, P.J. and Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. 50: 50-55.
- Varel, V.H., Yen, J.T. and Kreikemeier, K.K., 1995. Addition of cellulolytic clostridia to the bovine rumen and pig intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1116-1119.
- Vitti, M.S.S., Abdalla, A.L., Filho, J. C.S., del Mastro, N.L., Mauricio, R., Owen, E. and Mould, F., 1999. Misleading relationships between in situ rumen dry matter disappearance, chemical analyses and in vitro gas production and digestibility, of sugarcane bagasse treated with varying levels of electron irradiation and ammonia. *Animal Feed Science and Technology*. 79(1-2): 145-153.
- Weende, 1983. Fiwe extraction unit for determining raw fiber content. Velp Scientifica. USMATE, Italy, 30 pages. .
- Williams, A.G. and Wither, S.E., 1983. *Bacillus* spp. in the rumen ecosystem. Hemicellulose depolymerases and glycoside hydrolases of *Bacillus* sp. and rumen isolates grown under anaerobic conditions. *Journal of Applied Bacteriology*. 55(2): 283-292.
- Wohlgemuth, R., 2009. The locks and keys to industrial biotechnology. *New Biotechnology*. 25(4): 204-213.
- Yang, H.Y., Wu, H., Wang, X.F., Cui, Z.J. and Li, Y.H., 2011. Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases. *Bioresource Technology*. 102(3): 3546-3550.