

# PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI PROTEIN VÀ CELLULOSE TỪ NGUỒN RÁC THẢI HỮU CƠ TẠI CÁC CHỢ DÂN SINH Ở HUYỆN CHÂU THÀNH TỈNH KIÊN GIANG

Trần Nguyên Chất\*, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Trịnh Thị Kim Bình

Trường Đại học Kiên Giang

\*Email: [tnchat@vnkgu.edu.vn](mailto:tnchat@vnkgu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 10/4/2025; Ngày nhận bài sửa: 17/6/2025; Ngày chấp nhận đăng: 11/7/2025

## TÓM TẮT

Trong những giải pháp xử lý chất thải, việc sử dụng vi khuẩn là một phương pháp thiện với môi trường và hướng đến sự bền vững cho môi trường sinh thái. Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải protein và cellulose từ các nguồn rác thải hữu cơ. Mẫu rác thải hữu cơ được thu từ các chợ trong khu vực huyện Châu Thành, tỉnh Kiên Giang. Kết quả phân lập được 38 dòng vi khuẩn. Trong đó, 9 dòng có khả năng phân giải protein và cellulose. Hai dòng có khả năng phân giải đồng thời protein và cellulose trên đĩa thạch tốt nhất với kích thước phân giải lần lượt ở mỗi dòng là GT5 (18,1 mm và 9,75 mm) và NT4 (15,5 mm và 8 mm). Phân tích dựa trên trình tự 16S rRNA xác định dòng vi khuẩn GT5 có trình tự tương đồng 99,87% với loài *Bacillus cereus* và dòng NT4 tương đồng 99,86% với loài *Proteus mirabilis*.

*Từ khóa:* *Bacillus cereus*, cellulose, protein, *Proteus mirabilis*, rác thải hữu cơ.

## 1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, các nhóm vi khuẩn có khả năng phân giải rác thải hữu cơ và hạn chế mùi hôi rất được quan tâm trên toàn thế giới và có cả Việt Nam. Thành phần rác thải hữu cơ từ các chợ dân sinh, siêu thị, hộ dân, cơ sở kinh doanh dịch vụ ăn uống chứa cellulose và thịt cá dư thừa làm ô nhiễm môi trường sống [1]. Việc phân lập, tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có ích để xử lý rác thải là cần thiết. Đặc biệt, các dòng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme mạnh và thích nghi tốt với điều kiện môi trường chất thải rất quan trọng giúp đa dạng bộ giống vi khuẩn phân giải tinh bột, cellulose và protein [2]. Đây là phương pháp giúp phân giải chất thải hữu cơ hiệu quả, an toàn và bền vững.

Ứng dụng phương pháp sinh học giúp phân giải rác thải hữu cơ thành phân hữu cơ, ứng dụng được cho trồng trọt và cải tạo đất. Hiện nay, có nhiều chế phẩm vi sinh vật đã được thương mại hóa phục vụ phân giải rác thải hữu cơ nhưng chi phí cao, hiệu quả xử lý thấp khi áp dụng ở các địa phương khác. Thành phần rác thải hữu cơ và sự khác nhau về điều kiện môi trường làm các nhóm vi sinh trong các chế phẩm khó đạt được hoạt lực như mong muốn. Đặc biệt, huyện Châu Thành thuộc tỉnh Kiên Giang nằm ở vùng ven biển, chịu ảnh hưởng của điều kiện môi trường biển nên các nhóm vi sinh vật trong các chế phẩm được phân lập ở những nơi khác khó đạt được hoạt tính tối đa. Bên cạnh đó việc phân lập được nguồn vi khuẩn bản địa giúp xử lý tốt được các nguồn phế phẩm thủy sản, nông nghiệp có khối lượng lớn ở đây.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải protein và cellulose mạnh được phân lập từ các mẫu rác thải hữu cơ thu từ: bãi rác, thùng rác các chợ, khu vực dân cư, thức ăn thừa tại quán ăn trên địa khu vực Châu Thành, Kiên Giang. Địa điểm thu mẫu: tại các chợ Tà Niên, Minh Lương, Tắc Câu, Trắc Kha, Thạnh Lộc, Mong Thọ.

## **2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu**

### *2.2.1. Thu mẫu, tăng sinh và phân lập các dòng vi khuẩn phân giải được protein và cellulose từ rác thải hữu cơ*

Thu mỗi điểm ít nhất 3 mẫu: 0,5 kg rác thải rắn, nước rỉ rác ít nhất 50 ml mỗi mẫu. Mẫu rác thải rắn và nước rỉ rác được chứa trong túi nilong chịu nhiệt (đã tiệt trùng), sau đó được trữ trong thùng xốp có đá khô và được vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Xử lý mẫu: Các mẫu rác thải mang về được loại bỏ các thành phần vô cơ như bọ nylon, lọ nhựa, kim loại. Mẫu sau khi phân loại sẽ được nghiền và được tiến hành tăng sinh.

Tăng sinh: Mẫu sau khi xử lý sẽ được tăng sinh trong môi trường Nutrient broth, trong 24 giờ, sau đó được tiến hành phân lập.

### *2.2.2. Phương pháp phân lập các dòng vi khuẩn [3]*

Trải mẫu: Hút 0,1 mL dung dịch mẫu đã tăng sinh, nhỏ lên đĩa petri có chứa môi trường Nutrient agar [4]. Tiến hành trải mẫu bằng cách lấy dụng cụ trải khử trùng trên đèn cồn và chờ nguội. Sau đó, tiến hành trải đều mẫu trên mặt môi trường. Khi bề mặt môi trường khô thì đem vào tủ ủ.

Nhận diện khuẩn lạc sau 24 giờ ủ: Cây chuyển tất cả khuẩn lạc là vi khuẩn vào đĩa môi trường dinh dưỡng mới. Khuẩn lạc được chọn có màu trắng hay vàng không có tơ.

Cây chuyển: Thực hiện cây chuyển đến khi trên đĩa xuất hiện các khuẩn lạc rời rạc, đồng nhất về hình thái và kích thước, xác định độ thuần bằng cách quan sát tế bào đã nhuộm gram bằng kính hiển vi.

### *2.2.3. Khảo sát khả năng phân giải protein và cellulose của các dòng vi khuẩn đã phân lập.*

Khảo sát khả năng phân giải protein: Việc phân giải protein của các dòng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp cấy chấm điểm sinh khối của vi khuẩn trên môi trường thạch Skim milk (SMA) có bổ sung 1% casein. Sau đó, đường kính vòng phân giải casein được xác định bằng thuốc thử Trichloroacetic acid (TCA) 15%. Các dòng vi khuẩn phân giải được protein (sử dụng casein trong sữa) sẽ hình thành một vòng tròn phân giải casein bao quanh khuẩn lạc.

Thí nghiệm khả năng phân giải cellulose và protein được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, các nghiệm thức là các dòng vi khuẩn phân lập được, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần và được đặt ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm.

Đường kính vòng phân giải được tính theo công thức  $V = D - d$ .

Trong đó: D: Đường kính vòng phân giải (mm); d: Đường kính khuẩn lạc (mm).

V càng lớn chứng minh cho việc khả năng phân giải của enzyme càng mạnh, phân nhóm khả năng phân giải như sau: [5]

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

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

$20 \text{ mm} > V \geq 15$  mm: Khả năng phân hủy protein mạnh (++)

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

Khảo sát khả năng phân giải cellulose: Kết quả thủy phân Carboxymethyl cellulose (CMC) tương ứng với mức phân giải cellulose của vi khuẩn. Các dòng vi khuẩn được cấy trải trên môi trường CMC, sau đó giữ ở điều kiện 37 °C trong 48 giờ và sử dụng dung dịch congo red 1% nhuộm trong 20 phút. Cuối cùng mẫu vi khuẩn được rửa bằng NaCl 1M. Các dòng vi khuẩn phân giải được cellulose (sử dụng cellulose trong CMC) sẽ tạo ra một vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc [6].

Đường kính vòng phân giải được tính theo công thức  $V = D - d$ .

Trong đó: D: Đường kính vòng phân giải (mm); d: Đường kính khuẩn lạc (mm)

Chỉ số V càng lớn cho thấy hoạt lực của enzym ngoại bào càng mạnh, phân cấp hoạt lực theo chi tiêu sau:

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

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

20 mm >V ≥ 15 mm: Khả năng phân hủy cellulose mạnh (++)

V ≥ 20 mm: Khả năng phân hủy cellulose rất mạnh (+++).

#### 2.2.4. Định danh bằng phương pháp giải trình tự

Các dòng vi khuẩn có hoạt tính cao nhất được định danh thông qua trình tự đoạn gene mã hoá 16s rRNA bằng phương pháp Sanger.

### 2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu được tổng hợp, xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016, phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả thu mẫu và phân lập

Các dòng vi khuẩn có khả năng đồng hóa và sử dụng nguồn cellulose, protein trong chất thải được phân lập, tuyển chọn để ứng dụng vào xử lý chất thải hữu cơ [7]. Bên cạnh đó vi khuẩn có đặc điểm thích ứng mạnh, phân bố rộng và dễ phát sinh biến dị [8]. Dựa vào môi trường sống mà vi khuẩn được phân thành nhiều loại khác nhau. Từ các mẫu rác hữu cơ thu ở các chợ trong địa bàn huyện Châu Thành, Kiên Giang đã phân lập được 38 dòng vi khuẩn có đặc điểm được mô tả ở Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm các dòng vi khuẩn đã phân lập

STT	Ký hiệu	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào
1	ML1	Trắng đục, trơn, kích thước nhỏ	Que ngắn
2	ML2	Trắng đục, nhẵn, kích thước nhỏ	Cầu đôi
3	ML3	Trắng trong, trơn, kích thước lớn	Liên cầu
4	CL1	Trắng đục, nhẵn, kích thước lớn	Cầu đơn
5	CL2	Trắng đục, nhẵn, kích thước nhỏ	Que dài
6	CL3	Trắng đục, trơn, kích thước nhỏ	Cầu ngắn
7	TN1	Trắng đục, trơn, kích thước nhỏ	Que dài
8	TN2	Trắng đục ngả vàng, trơn	Cầu đơn
9	TN3	Trắng trong có điểm đục ở giữa	Cầu đơn
10	TC1	Trắng đục, nhẵn, kích thước nhỏ	Cầu đơn
11	TC2	Vết trắng hơi trong, nhày	Que dài
12	TC3	Vết trắng đục, nhẵn, kích thước lớn	Que ngắn
13	BA1	Vết trắng đục, kích thước lớn	Elip
14	BA2	Trắng đục, bề mặt có lỗ, trơn	Elip
15	BA3	Vết cam, nhẵn, có kích thước lớn	Que dài
16	BA4	Trắng đục ngả vàng, nhẵn	Que ngắn
17	BA5	Trắng đục, trơn, kích thước nhỏ	Que dài
18	NT1	Trắng đục, trơn, kích thước nhỏ	Cầu đơn
19	NT2	Trắng trong, nhẵn, kích thước nhỏ	Que dài
20	NT3	Trắng trong có điểm đục ở giữa	Cầu đơn
21	NT4	Vết trắng sữa, nhẵn	Que dài
22	NT5	Trắng sữa, trơn, có kích thước lớn	Cầu đơn
23	S1	Trắng đục, nhẵn, có kích thước nhỏ	Que dài
24	S2	Trắng đục, trơn, có kích thước nhỏ	Cầu đơn
25	S3	Trắng sữa, nhẵn, có kích thước lớn	Que dài

STT	Ký hiệu	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào
26	S4	Vàng, tròn, kích thước nhỏ	Que ngắn
27	S5	Vàng, tròn, có kích thước nhỏ	Cầu đơn
28	TK1	Trắng đục, tròn, có kích thước to	Que dài
29	TK2	Trắng đục, tròn, có kích thước nhỏ	Que dài
30	TK3	Trắng đục, nhẵn, bề mặt khô, có kích thước nhỏ	Que dài
31	TK4	Trắng đục, tròn, có kích thước nhỏ	Que dài
32	TK5	Trắng trong, tròn, có kích thước lớn	Que ngắn
33	TK6	Trắng ngả vàng, nhẵn, có kích thước lớn	Que ngắn
34	GT1	Trắng trong, tròn, có kích thước lớn	Cầu đơn
35	GT2	Trắng sữa, tròn, có kích thước lớn	Cầu đôi
36	GT3	Trắng sữa, tròn, có kích thước nhỏ	Cầu đơn
37	GT4	Trắng trong, nhẵn, có kích thước nhỏ	Cầu đơn
38	GT5	Trắng sữa, nhẵn, có kích thước nhỏ	Que ngắn

Các dòng vi khuẩn phân lập được có màu sắc rất đa dạng: trắng trong, trắng sữa, trắng đục, vàng nhạt, phát triển nhanh sau 24 giờ cấy trên môi trường dinh dưỡng. Các chủng vi khuẩn ưa nhiệt có thể tổng hợp enzyme tốt và chuyển hóa các hợp chất hữu cơ trong chất thải [9]. Đây cũng là các đặc điểm cần có của vi khuẩn trong nguyên tắc lựa chọn vi sinh vật xử lý chất thải hữu cơ.

Bên cạnh đó cho thấy sự đa dạng của dòng vi khuẩn tại từng khu vực lấy mẫu. Các dòng vi khuẩn trên có thể sử dụng trong khảo sát khả năng phân giải protein và cellulose.

### 3.2. Khả năng phân giải protein

Từ các dòng phân lập được, tiến hành thí nghiệm khả năng phân giải protein. Sau 48 giờ đã ghi nhận được 18 dòng vi khuẩn có xuất hiện khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy chỉ chứa protein là nguồn carbon duy nhất. Tỷ lệ phân giải của các dòng được ghi nhận tại Bảng 2.

*Bảng 2. Tỷ lệ phân giải protein của các dòng phân lập*

Khả năng phân giải	Đường kính vòng phân giải	Số dòng	Tỷ lệ (%)
Yếu	$V < 10$ mm	5	27,78
Trung bình	$15$ mm $> V \geq 10$ mm	7	38,89
Mạnh	$20$ mm $> V \geq 15$ mm	6	33,33
Rất mạnh	$V \geq 20$ mm	0	0,00

Trong 38 dòng phân lập có 18 dòng có khả năng phân giải protein từ yếu đến mạnh. Có 5 dòng có khả năng phân giải protein yếu, chiếm tỷ lệ thấp nhất (27,78%). Có 7 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải protein trung bình với 38,98%. Thông qua thí nghiệm xác định được 6 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải protein ở mức mạnh chiếm tỷ lệ 33,33%. Không ghi nhận dòng vi khuẩn có vòng phân giải protein rất mạnh trên 20 mm.

Trong số các dòng vi khuẩn phân lập được, đã chọn ra 18 dòng có xuất hiện vòng phân giải protein được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên thạch đĩa. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3 cho thấy trong 38 dòng đã phân lập được có 18 dòng có khả năng phân giải protein. Trong 18 dòng đã xác định hoạt tính enzyme, dòng ML2, GT5 và TK2 có vòng phân giải protein lớn nhất, đường kính vòng phân giải lần lượt là 19,5 mm, 18,1 mm và 18 mm. Dòng BA4 và CL2 có vòng phân giải protein thấp nhất với kích thước lần lượt là 2,30 mm, 5,00 mm. Đường kính phân giải này là kết quả của đường kính halo và đường kính khuẩn lạc được ghi nhận sau 48 giờ theo dõi.

Nhìn chung, kích thước vòng phân giải protein của các mẫu thu tại huyện Châu Thành, Kiên Giang thấp hơn so với công bố trong nghiên cứu trước đó [10]. Có thể thấy trong cùng loại mẫu là nước rỉ rác nhưng có kết quả khác biệt do khác vị trí lấy mẫu và thành phần rác thải hữu cơ.

Bảng 3. Khả năng phân giải protein

STT	Kí hiệu	Đường kính vòng phân giải (mm)	STT	Kí hiệu	Đường kính vòng phân giải (mm)
1	ML2	19,5 ± 0,07 <sup>a</sup>	10	BA5	17,90 ± 0,12 <sup>ab</sup>
2	CL1	8,30 ± 0,03 <sup>fg</sup>	11	NT4	15,50 ± 0,07 <sup>bcd</sup>
3	CL2	5,00 ± 0,00 <sup>hi</sup>	12	S1	17,10 ± 0,01 <sup>abc</sup>
4	TN2	14,0 ± 0,01 <sup>d</sup>	13	TK1	7,50 ± 0,07 <sup>gh</sup>
5	TC1	10,5 ± 0,07 <sup>ef</sup>	14	TK2	18,00 ± 0,14 <sup>ab</sup>
6	TC3	13,0 ± 0,00 <sup>de</sup>	15	TK4	14,90 ± 0,01 <sup>cd</sup>
7	BA2	14,9 ± 0,01 <sup>cd</sup>	16	TK6	13,50 ± 0,00 <sup>d</sup>
8	BA3	9,50 ± 0,07 <sup>fg</sup>	17	GT1	10,00 ± 0,14 <sup>fg</sup>
9	BA4	2,30 ± 0,04 <sup>i</sup>	18	GT5	18,10 ± 0,01 <sup>ab</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên một cột thì khác biệt có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,05$ .

### 3.3. Khả năng phân giải cellulose

Từ các dòng vi khuẩn đã phân lập, tiến hành thí nghiệm khả năng phân giải protein. Sau 48 giờ đã ghi nhận được 18 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc mọc được trên môi trường có bổ sung CMC. Tỷ lệ phân giải của các dòng được ghi nhận tại Bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ phân giải cellulose của các dòng phân lập

Khả năng phân giải	Đường kính vòng phân giải	Số dòng	Tỷ lệ (%)
Yếu	V < 10 mm	18	100
Trung bình	15 mm > V ≥ 10 mm	0	0,00
Mạnh	20 mm > V ≥ 15 mm	0	0,00
Rất mạnh	V ≥ 20 mm	0	0,00

Kết quả khảo sát cho thấy, khả năng phân giải cellulose của các dòng vi khuẩn đã phân lập là khác nhau. Số dòng vi khuẩn phân giải cellulose yếu chiếm tối đa với tỷ lệ tuyệt đối là 100%. So sánh với nghiên cứu Hoàng Dương Thu Hương và cs (2020) kích thước vòng phân giải cellulose lớn hơn gấp 3 lần so với kích thước phân giải lớn nhất trong nghiên cứu này.

Từ các dòng vi khuẩn đã phân lập, có 18 dòng xuất hiện vòng phân giải cellulose. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Khả năng phân giải cellulose

STT	Kí hiệu	Đường kính vòng phân giải (mm)	STT	Kí hiệu	Đường kính vòng phân giải (mm)
1	CL1	5,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	10	NT5	0,90 ± 0,06 <sup>d</sup>
2	CL2	0,50 ± 0,01 <sup>d</sup>	11	BA1	1,10 ± 0,06 <sup>d</sup>
3	TN2	1,25 ± 0,04 <sup>d</sup>	12	BA2	1,00 ± 0,00 <sup>d</sup>
4	TN3	5,50 ± 0,07 <sup>bc</sup>	13	TK3	1,50 ± 0,07 <sup>d</sup>
5	TC1	0,80 ± 0,03 <sup>d</sup>	14	TK6	3,75 ± 0,01 <sup>bc</sup>
6	TC2	3,85 ± 0,01 <sup>bc</sup>	15	GT5	9,75 ± 0,18 <sup>a</sup>
7	TC3	5,55 ± 0,01 <sup>b</sup>	16	S2	1,50 ± 0,07 <sup>d</sup>
8	NT3	4,55 ± 0,01 <sup>b</sup>	17	S3	2,50 ± 0,00 <sup>cd</sup>
9	NT4	8,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	18	S5	1,25 ± 0,04 <sup>d</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên một cột thì khác biệt có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,05$ .

Từ bảng kết quả trên cho thấy trong 38 dòng đã phân lập được có 18 dòng phân giải được cellulose. Trong đó có 2 dòng có khả năng phân giải cellulose tốt nhất là GT5 và NT4 với kích thước vòng phân

giải là 9,75 mm và 8,00 mm. Tuy nhiên 2 dòng này được phân loại vào khả năng phân giải yếu (-) với đường kính vòng phân giải nhỏ hơn 10 mm. Kết quả này thấp hơn công bố của Hoàng Dương Thu Hương và cs (2020) trong cùng 1 vật liệu thí nghiệm là nước rỉ rác được thu từ các chợ. Kết quả có sự khác biệt là do ảnh hưởng bởi vị trí, thời gian lấy mẫu và thành phần rác hữu cơ. Bên cạnh đó việc khác nhau về điều kiện sinh trưởng tối ưu của các dòng vi khuẩn phân giải cellulose (nhiệt độ, pH môi trường) cũng ảnh hưởng đến hoạt lực phân giải cellulose của các dòng vi khuẩn đã phân lập.

### 3.4 Định danh sơ bộ các dòng có hoạt tính

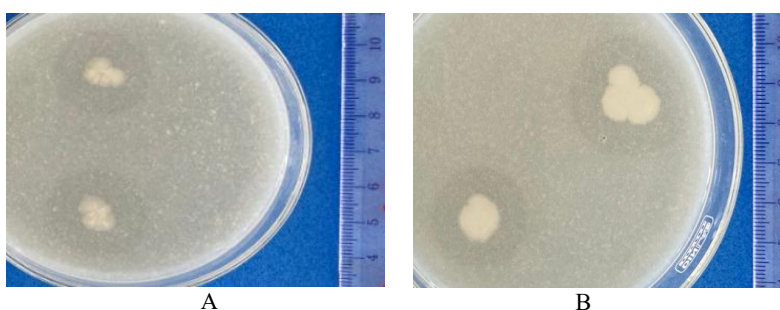
Từ 38 dòng đã phân lập đã xác định được 9 dòng có khả năng phân giải đồng thời protein và cellulose. Các dòng vi khuẩn hiện diện trong mẫu lấy từ các địa điểm khác nhau đa dạng về đặc điểm. Kết quả định danh sơ bộ bằng phương pháp kiểm tra các đặc điểm sinh hoá được ghi nhận tại Bảng 6.

*Bảng 6. Kết quả thử nghiệm đặc điểm sinh hoá*

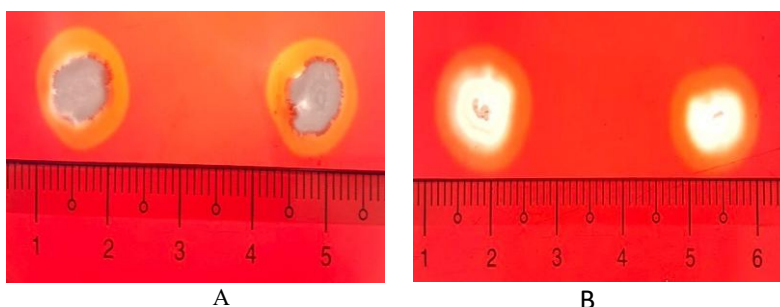
STT	Kí hiệu	Gram	Catalase	Lên men	Methyl red	Di động	Urease
1	CL1	(-)	+	+	-	-	-
2	CL2	(+)	+	+	-	-	-
3	TN2	(-)	+	+	+	-	-
4	TC1	(-)	+	+	+	-	-
5	TC3	(-)	+	-	-	-	-
6	BA2	(-)	+	-	+	-	-
7	NT4	(-)	+	+	+	+	-
8	TK6	(-)	+	-	+	-	-
9	GT5	(+)	+	-	+	+	-

*Ghi chú: (+) gram dương, (-) gram âm, + có hiện diện, - không sự hiện diện*

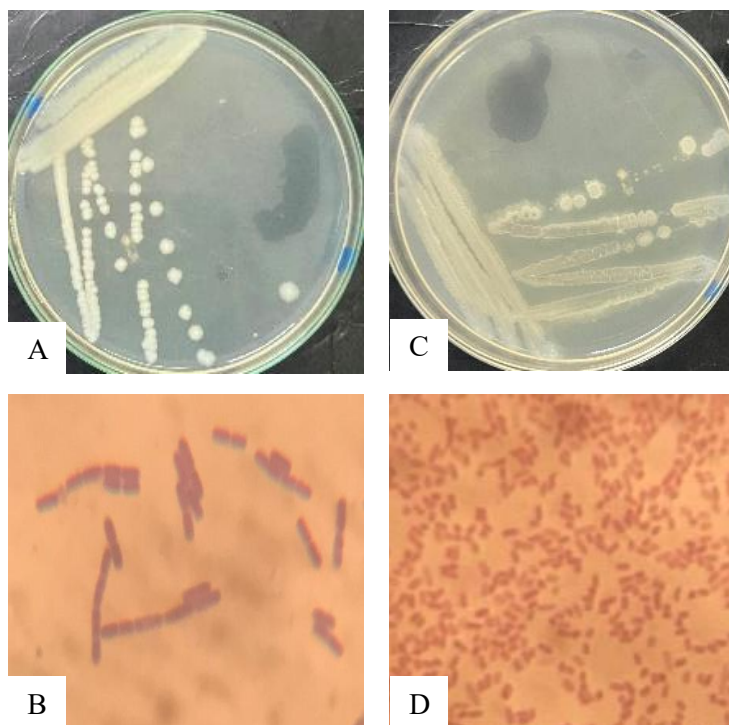
Trong số 9 dòng có khả năng phân giải đồng thời protein và cellulose phân lập được có 2 dòng có chỉ số phân giải tốt nhất. Dòng GT5 được thu tại xã Giục Tượng phân giải cellulose tốt nhất với kích thước vòng phân giải là 9,75 mm và phân giải protein với đường kính vòng phân giải là 18,10 mm. Dòng NT4 được thu tại chợ nhà thờ thuộc xã Mong Thọ B cho khả năng phân giải cellulose với đường kính là 8,00 mm và phân giải protein với kích thước vòng phân giải là 15,5 mm.



*Hình 1. Khả năng phân giải protein dòng NT4 (A) và GT5 (B)*



*Hình 2. Khả năng phân giải cellulose của dòng NT4 (A) và GT5 (B)*



Hình 3. Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào vi khuẩn GT5 và NT4  
A, B: Dòng GT5; C, D: Dòng NT4

Kết quả cho thấy, hai dòng GT5 và NT4 có khả năng chuyển hóa được nguồn cơ chất hữu cơ CMC, casein. Cả hai dòng vi khuẩn GT5 và NT4 đều phát triển tốt ở nhiệt độ phòng. Điều này cho thấy hai dòng vi khuẩn GT5 và NT4 có khả năng ưa nhiệt. Với các đặc tính trên, hai dòng vi khuẩn này có thể sử dụng để phục vụ sản xuất chế phẩm vi sinh vật phục vụ xử lý rác thải có nguồn gốc hữu cơ.

### 3.5 Kết quả giải trình tự gene

Trong số 2 dòng vi khuẩn được xác định là phân giải được cả protein và cellulose, qua thử nghiệm một số đặc điểm sinh lý sinh hóa, hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào, đã xác định được 1 dòng thuộc nhóm vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và 1 dòng thuộc chi vi khuẩn *Proteus*. Phương pháp Sanger được sử dụng để xác định trình tự đoạn gene mã hóa 16S rRNA. Sau khi giải trình tự, đoạn gene mã hóa của 2 dòng được so sánh đối chiếu với dữ liệu nguồn gene trên GeneBank.

Từ kết quả định danh bằng giải trình tự cho thấy dòng vi khuẩn NT4 thuộc loài *Proteus mirabilis* với mức độ tương đồng là 99,86%. Đây là trực khuẩn gram âm, kỵ khí tùy ý, dị dưỡng và phân giải protein. Chúng có khả năng trao đổi chất khác nhau và thích nghi được với nhiều điều kiện môi trường, chẳng hạn như nồng độ cao của kim loại nặng hoặc các chất độc hại [11]. Kết quả cũng cho thấy dòng vi khuẩn GT5 thuộc loài *Bacillus cereus* với mức độ tương đồng 99,87% là trực khuẩn gram dương, sinh bào tử, kỵ khí tùy ý, nhiệt độ tăng trưởng được từ 5 °C – 50 °C, nhiệt độ tối ưu 35 °C – 40 °C. *Bacillus cereus* được biết là có khả năng phân giải các loại hợp chất hữu cơ khác nhau [12].

>NT4

```
AAAGCTTGCTTTCTTCTGCTGACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAAACGG
TGGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTCGGACCTTGCCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAG
GTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGCGCAACCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTTG
TAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGTAAGGTAAATACCTTATCAATTGACGTTACCCGCAAGAAGCACCAGCTAAGCTCCGT
GCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGAGGCGGTCAATTAAGTCAGAT
GTGAAAGCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATCTGAAACTGTTGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCATGTGTAGCGG
TGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGTGGCGAAGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTAGAGGTTGTGGTCTTGAACCGTGGCTCTGGAGCTAAC
GCGTTAAATCGACCGCTGGGAGTACGGCCGAAGTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTCTTGCATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGA
GACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAG
CACGTAATGGTGGGAACCTCAAAGGAGACTCCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAG
TAGGGCTACACACGTGCTACAAATGGCAGATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACCTATAAAGTCTGTCGTAGTCCG
GATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGT
ACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCAT
GACTGGGGTGAA
```

>GT5

```
CTATCATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGTAGTAACACG
TGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCA
TGTTTCGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCG
TGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA
CCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAAC
CGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
```

Hình 4. Trình tự đoạn gen mã hóa 16s rRNA của dòng NT4 và GT5

Loài *Proteus mirabilis* có vai trò quan trọng trong việc loại bỏ các chất ô nhiễm hữu cơ có nguồn gốc động vật, đặc biệt là phân, bằng cách phân hủy chất hữu cơ trong môi trường nước hoặc đất. Đặc tính phân giải protein và phân giải nước tiểu của chúng có thể xếp vi khuẩn vào số các loài hoại sinh hiệu quả nhất khi tham gia vào quá trình làm giàu đất được bón phân bằng muối amoniac và do đó tham gia vào chu trình nitơ. Quá trình nitrat hóa hiếu khí và khử nitrat đồng thời dẫn đến loại bỏ nitơ hiệu quả bằng vi khuẩn dị dưỡng này được đề xuất áp dụng trong xử lý chất thải cá. Chúng *P. mirabilis* là loài phân hủy propanil (một loại thuốc diệt cỏ thường được sử dụng) nhanh nhất trong số các hệ vi sinh vật tự nhiên sinh sống ở một hồ nước hoang sơ ở phía đông bắc Georgia, Hoa Kỳ [13]. Trong nghiên cứu của Sanuth và cs (2013) đã xác định được một chủng *P. mirabilis* có hiệu quả nhất trong việc phân hủy  $\epsilon$ -caprolactam trong số các vi khuẩn phân lập từ đất được thu thập từ các bãi rác thải rắn lớn ở Bang Lagos, Nigeria.  $\epsilon$ -Caprolactam là một monome để sản xuất nylon-6, được tìm thấy trong nước thải của các nhà máy sản xuất nylon, gây độc cho thực vật, động vật. Chủng này là một ứng cử viên tiềm năng cho quá trình xử lý sinh học [14].

Chủng *P. mirabilis* được phân lập từ nước biển ven biển ở Trung Quốc loại bỏ hiệu quả các ion  $\text{NH}_4^+$  bằng quá trình oxy hóa. Hơn nữa, chỉ có một lượng vết  $\text{NO}_2^-$  và  $\text{NO}_3^-$  được phát hiện sau khi nuôi cấy vì các ion này đồng thời bị vi khuẩn khử thành nitơ khí ( $\text{N}_2$ ) trong quá trình khử nitrat. Các quá trình và sự phát triển của tế bào bị ức chế khi không có bất kỳ nguồn carbon hữu cơ nào. Chủng này được đề xuất sử dụng để loại bỏ  $\text{NH}_4^+$ -N độc hại [15].

Nghiên cứu của Chen et al. đã phân lập từ bùn, của một nhà máy xử lý nước thải nhuộm ở Đài Loan, một chủng *P. mirabilis* thể hiện khả năng khử màu hiệu quả nhờ enzyme liên quan đến khả năng hấp phụ sinh học của RBN đỏ đậm cũng như thuốc nhuộm BK-5 azo đen đậm [16]. Hơn nữa, Olukanni et al. đã phân lập từ đất bãi rác đô thị gần Lagos, Nigeria, một chủng *P. mirabilis* có khả năng phân hủy thuốc nhuộm azo Reactive Blue 13 thành các sản phẩm không độc hại [17].

Ngoài ra, chủng *P. mirabilis* có khả năng kháng cao với một số kim loại nặng (bao gồm thủy ngân, đồng, kẽm, cadmium, coban, bạc và các loại khác) đã được xác định trong các mẫu nước thải từ Thành phố Casablanca, Ma-rốc, cũng có khả năng kháng naphthalene, anthracene và kháng sinh [18].

Người ta đã chứng minh rằng chủng *Bacillus cereus* có khả năng phân hủy thuốc nhuộm dệt hoạt tính Novacron Super Black G, cũng như các hợp chất thơm khác như anthracene. Chất thải tinh bột là chất ô nhiễm hữu cơ có tác động tiêu cực đến môi trường. *Bacillus cereus* BX16, một dòng mới phân lập có khả năng tiêu hóa hoàn toàn tinh bột, đã được tách và tinh chế bằng chất thải thực phẩm [19].

Dòng *B. cereus* có hiệu quả phân hủy chất thải vô tơm và được sử dụng để lên men quy mô lớn. Hoạt tính cao của các dòng vi khuẩn phân lập trong việc phân hủy chất thải vô tơm cho thấy khả năng ứng dụng rộng rãi của các vi khuẩn này để chiết xuất chitin từ chất thải giàu chitin theo hướng thân thiện với môi trường [20]. Nghiên cứu của Đinh Hồng Duyên và cộng sự, từ phụ phẩm quả vải hoa mục đã tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* và *Bacillus toyonensis*. Thử nghiệm chế phẩm từ hai dòng này cho thấy độ hoại mục đạt 57 - 59% sau 35 ngày ủ [21].

Qua các nghiên cứu trên cho thấy 2 loài *Proteus mirabilis* và *Bacillus cereus* có triển vọng trong việc ứng dụng vào sản xuất các sản phẩm có chứa vi khuẩn có khả năng phân hủy tốt rác thải hữu cơ và giảm việc ô nhiễm không khí từ rác thải góp phần hạn chế rác thải tồn đọng và giảm ô nhiễm môi trường và sản xuất phân bón hữu cơ.

Gen 16S rDNA đã được giải trình tự và xây dựng cây phát sinh loài cho trong nghiên cứu của Ishag et al. cũng cho thấy ba loài vi khuẩn là *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429 và *Bacillus safensis* FO-36b. Chúng có khả năng tự phân hủy sinh học thuốc trừ sâu của *B. safensis* FO-36b. Các chủng này được phát hiện có hiệu quả và sống tự nhiên trong môi trường bị ô nhiễm nặng bởi thuốc trừ sâu, do đó, chúng có thể có tiềm năng loại bỏ thuốc trừ sâu khỏi đất bị ô nhiễm, đặc biệt là đất tại các cửa hàng thuốc trừ sâu và bãi chôn lấp ở các nước đang phát triển [22].

Các nhóm vi sinh vật bản địa sống trong đất và mọi sinh vật sống, có khả năng phân hủy sinh học, thăm thấu sinh học, cố định đạm, phục hồi độ phì nhiêu của đất và cũng như trong sản xuất hormone tăng trưởng thực vật [23]. Việc bổ sung huyền phù vi sinh vật bản địa vào đất làm thay đổi các đặc tính lý hóa, sinh học và enzyme của đất. Hoạt động của enzyme như cellulase, protease và urease đã được đánh giá cao hơn ở đất được cải tạo bằng vi sinh vật bản địa [24].

#### 4. KẾT LUẬN

Tổng số 38 dòng vi khuẩn đã được phân lập từ mẫu rác thải hữu cơ khu vực huyện Châu Thành, tỉnh Kiên Giang. Có 9 dòng có khả năng phân giải đồng thời protein và cellulose. Hai dòng có hoạt tính mạnh phân giải đồng thời protein và cellulose là GT5 và NT4 lần lượt tương đồng 99,87% với loài *Bacillus cereus* và 99,86% với loài *Proteus mirabilis* khi phân tích trình tự 16S rRNA. Hai dòng này trên thế giới được ứng dụng nhiều trong phân giải rác thải hữu cơ rất hiệu quả và còn có khả năng phân giải trong điều kiện có kim loại nặng và một số loại thuốc nhuộm màu độc hại. Với việc chống chịu tốt, khả năng phân giải cellulose và protein như vậy giúp hai chủng vừa phân lập được có tiềm năng lớn trong việc sản xuất các chế phẩm phân giải rác thải hữu cơ.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. V. Dũng và cộng sự, “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy protein và cellulose từ các nguồn rác thải hữu cơ được thu tại thành phố Cần Thơ,” *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, tập 57, số chuyên đề Môi trường và Biến đổi khí hậu, tr. 34–41, 2021, doi: <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2021.027>
- [2] H. T. Toàn, M. T. Thảo, N. T. Phương, T. L. K. Ngân, B. T. Vinh, và C. N. Điệp, “Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose, tinh bột và protein trong nước rỉ từ bãi rác ở Cần Thơ,” *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, số 10, tr. 195-202, 2008.
- [3] T. L. Thước, *Phương pháp phân tích vi sinh vật*. Hà Nội: Nhà xuất bản Giáo dục, 2006.
- [4] R. M. Atlas, *Handbook of microbiological media*, 4<sup>th</sup> ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2010, p.1203.

- [5] N. T. T. Thủy, N. T. Long, T.T. Đức, “Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose để sản xuất phân hữu cơ vi sinh”, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, vol. 127, no. 3A, pp. 117-127, 2018, doi: <https://doi.org/10.26459/hueuni-jard.v127i3A.4413>
- [6] V. V. P. Quê, C. N. Điệp, “Phân lập và nhận diện vi khuẩn cellulose”, *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, số 18a, tr. 177-184, tháng 5/2011.
- [7] Đ. Q. Hải, T. T. T. Thủy, “Phân lập, tuyển chọn và định danh một số chủng vi sinh vật có lợi và bước đầu ứng dụng trong xử lý chất thải rắn hữu cơ làm phân bón hữu cơ sinh học”, *Tạp chí khoa học và công nghệ Đại học Đà Nẵng*, vol. 20, no. 5, pp. 56-61, 2022, doi: <https://jst-ud.vn/jst-ud/article/view/7693>
- [8] L. X. Phương, *Giáo trình Vi sinh vật học môi trường*. Hà Nội: NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, 2008.
- [9] T. V. Cường (chủ biên), *Giáo trình Vi sinh vật học môi trường*. Hà Nội: NXB Bách khoa Hà Nội, 2018, 368tr.
- [10] H. D. T. Hương, P. T. Hạnh, “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn phân giải protein từ lò giết mổ gia súc ở Thừa Thiên Huế”, *Tạp chí khoa học và công nghệ trường Đại học Khoa học Đại học Huế*, vol. 15, no. 2, pp. 169-180, 2020.
- [11] D. Dominika, “Significance and Roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments”, *Microbial Ecology*, vol. 72, pp. 741-758, 2016, doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>
- [12] M. Hossen et al., “Biodegradation of reactive textile dye novacron super black G by free cells of newly isolated *Alcaligenes faecalis* AZ26 and *Bacillus* spp obtained from textile effluents”, *Heliyon*, vol. 5, no. 7, art. no. e02068, Jul. 019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02068>
- [13] S.S. Mishra et al., “Simultaneous nitrification and denitrification by novel heterotrophs in remediation of fish processing effluents”, *Basic Microbiology*, vol. 55 no. 6, pp. 772-779, Jun. 2015, doi: <https://doi.org/10.1002/jobm.201400783>
- [14] H. A. Sanuth et al., “ε-Caprolactam utilization by *Proteus* sp. and *Bordetella* sp. isolated from solid waste dumpsites in Lagos State, Nigeria, first report”, *Indian J Microbiol*, vol. 53, pp. 221-226, Jan. 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0356-5>
- [15] W. W. Zhang et al., “Isolation and characterization of a heterotrophic nitrifier *Proteus mirabilis* strain V7 and its potential application in NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N removal”, *Annals of Microbiology*, vol. 64, pp. 1231-1238, 2014, doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0764-0>
- [16] K. C. Chen et al., “Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, no. 1, pp. 686-690, Jul. 1999, doi: <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900689>
- [17] O.D. Olukanni et al., “Decolorization and biodegradation of Reactive Blue 13 by *Proteus mirabilis* LAG”, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 184, no. 1-3, pp. 290-298, Dec. 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.035>
- [18] B. K. Filali et al., “Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics”, *International Journal of Current Curr Microbiol*, vol. 41, pp. 151-156, Sep. 2000, doi: <https://doi.org/10.1007/s0028400>
- [19] X. Hongwei et al., “Degradation of organic compounds by a novel *Bacillus cereus* BX16 in starch waste”, *Process Biochemistry*, vol. 144 (2024) 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.05.016>
- [20] S. Iryna et al., “Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 36 no. 8, pp. 1123-1126, Aug. 2009, doi: <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0587-y>
- [21] Đ. H. Duyên, V. T. Hải, và N. T. Bình, “Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân huỷ phế phụ phẩm sau thu hoạch quả vải”, *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, số 53, tr. 61-70, tháng 11/2027, doi: <http://dx.doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.158>

- [22] A. E. S. A. Ishag et al., “Molecular identification of indigenous bacteria isolated from pesticides heavily contaminated soils”, *African Journal of Biotechnology*, vol. 19 no. 8, pp. 556-563, Aug. 2020, doi: <https://doi.org/10.5897/AJB2019.17027>
- [23] B.L. Kumar, D.V.R.S. Gopal, “Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment”, *Biotechnology*, vol. 5, pp. 867-876, Apr. 2015, doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0293-6>
- [24] T. Sumathi et al., “Impact of indigenous microorganisms on soil microbial and enzyme activities”, *Archives of Applied Science Research*, vol. 4 no. 2, pp. 1065-1073, 2012.

## ABSTRACT

### ISOLATION, SELECTION AND IDENTIFICATION OF OF BACTERIA WITH CELLULOSE AND PROTEIN-DEGRADING POTENTIAL FROM ORGANIC WASTE IN CHAU THANH – KIEN GIANG

Tran Nguyen Chat\*, Nguyen Thi Bich Ngoc, Trinh Thi Kim Binh

*Kien Giang University, 320A - Highway 61 - Chau Thanh Town, An Giang Province*

\*Email: [tnchat@vnkgu.edu.vn](mailto:tnchat@vnkgu.edu.vn)

Using bacteria is one of the environmentally friendly waste treatment methods for ensuring the sustainability of the ecological environment. This study aimed to isolate bacteria with cellulose- and protein- degrading potential from organic waste sources. Organic waste samples were collected from markets in Chau Thanh district, Kien Giang province. The results showed that 38 bacterial strains were isolated. Of these, 9 strains were capable of decomposing protein and cellulose. The two strains with the best ability to simultaneously decompose protein and cellulose on agar plates were GT5 (18.1 mm and 9.75 mm) and NT4 (15.5 mm and 8.00 mm), respectively. Molecular identification of two strains based on 16S rRNA sequence showed that GT5 was 99.87% homogeneous to *Bacillus cereus*; NT4 was 99.86% homogeneous to *Proteus mirabilis*.

*Keywords:* *Bacillus cereus*, cellulose, protein, *Proteus mirabilis*, organic waste.