

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN PHÂN GIẢI XENLULO TỪ CÀNH THANH LONG

Nguyễn Thị Ngọc Trúc
Viện Cây ăn quả miền Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu với tiêu đề “Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn phân giải xenlulo từ cành thanh long” được thực hiện với mục đích phân lập và chọn lọc ra những dòng vi khuẩn tiềm năng có khả năng phân giải xenlulo. Có 85 dòng vi khuẩn phân giải xenlulo được phân lập từ 5 tỉnh của Đồng bằng sông Cửu Long. Trong đó, dòng BL18 có khả năng phân hủy CMC cao nhất. Có 11 dòng có khả năng phân hủy giấy lọc “Whatman No.1”. Dòng VL33 đã thể hiện khả năng phân hủy cành thanh long cao nhất (62,57%). Hệ enzyme của VL33 bao gồm 3 enzyme khác nhau, đó là endoglucanase, exoglucanase và β -glucosidase. Trong đó, endoglucanase thể hiện khả năng phân hủy CMC cao nhất ở ngày thứ 4 sau khi ủ, exoglucanase thể hiện khả năng phân hủy xenlulo cao nhất vào ngày thứ 6 sau khi ủ và β -glucosidase thể hiện khả năng phân hủy vào ngày thứ 8 sau khi ủ. Nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh hóa cũng như sinh học phân tử, kết luận dòng VL33 có tên là *Bacillus subtilis*.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, cellulase, cellulose, degrading, pitaya.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thanh long là một trong những loại cây ăn quả quan trọng nhất của Việt Nam. Theo Nguyễn Trịnh Nhất Hằng và ctv (2014) diện tích trồng thanh long cả nước hiện đạt 28700 ha với tổng sản lượng thu được 640 ngàn tấn và đem về nguồn ngoại tệ từ xuất khẩu lên đến 78,9 triệu USD. Thanh long đã và đang đem lại thu nhập cao cho người nông dân ở Bình Thuận, Long An, Tiền Giang và nhiều tỉnh thành khác. Tuy nhiên, cho đến nay, cành thanh long thải bỏ với thành phần chính là xenlulo vẫn còn là vấn đề nan giải cho bà con nông dân bởi nó là nguyên nhân gây ô nhiễm vườn cũng như lây lan mầm bệnh từ những cành hư thối. Mặt khác, đây là một nguồn hữu cơ vô cùng có lợi cho cây trồng nếu được sử dụng đúng cách. Việc sử dụng vi khuẩn phân giải xenlulo đã và đang được các nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam nghiên cứu. Ở Ấn Độ, B.C. Behera và ctv (2014) đã phân lập vi khuẩn phân giải xenlulo từ đất rừng Đước và xác định đó là các loài *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., Ở Trung Quốc, Yan Ling Liang và ctv (2011) cũng đã phân lập được 22 dòng vi khuẩn phân hủy xenlulo. Ở Việt Nam, Hà Thanh Toàn và ctv (2011), Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Diệp (2011), Lê Phạm Tường Anh (2012) cũng đã nghiên cứu vi khuẩn phân giải xenlulo nhưng chưa có nghiên cứu nào về vi khuẩn phân giải xenlulo từ cành thanh long. Do đó, việc nghiên cứu và phân lập các loài vi khuẩn phân hủy cành

thanh long thải bỏ thành phân bón hữu cơ vi sinh là vô cùng cấp thiết cho ngành trồng thanh long hiện nay.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu:

Đề tài được thực hiện tại phòng thí nghiệm Vi sinh, Viện cây Ăn quả Miền Nam. Thời gian thực hiện từ tháng 7 năm 2014 đến tháng 7 năm 2015. Mẫu vật: Vi khuẩn được phân lập từ cành thanh long. Cành thanh long được thu từ 5 tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long: Tiền Giang, Long An, Bến Tre, Bạc Liêu, Vĩnh Long.

2.2. Phương pháp: Phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải xenlulo: theo Cao Ngọc Diệp, 2011

Đánh giá khả năng phân giải bột cành thanh long của các dòng vi khuẩn:

Bột cành thanh long được chuẩn bị sẵn bằng cách xay cành thanh long khô bằng máy xay sinh tố. Chuẩn bị 33 bình tam giác môi trường khoáng (100ml/bình tam giác 300ml), tiến hành cân 1g bột cành thanh long cho vào mỗi bình tam giác và đem hấp khử trùng. Tiến hành chủng vi khuẩn vào bình tam giác và đặt vào máy lắc (150 vòng/phút/37°C/10 ngày). Các dòng vi khuẩn chủng được nuôi trong môi trường CMC trong 3 ngày sau đó chủng với thể tích 1%. Chỉ tiêu theo dõi: Phần trăm trọng lượng bột cành thanh long hao hụt được đo bằng cách lấy sản phẩm sau 10 ngày ủ sấy khô ở 105 °C và tính phần trăm khối

lượng hao hụt bằng công thức:

$\% \text{ khối lượng hao hụt} = (\text{khối lượng ban đầu} - \text{khối lượng lúc sau}) / \text{khối lượng ban đầu} \times 100$

Đánh giá khả năng phân giải cành thanh long khô của các dòng vi khuẩn:

Cành thanh long được chặt thành đoạn ngắn khoảng 3 -5 cm sau đó sấy khô ở 105°C, cân trọng lượng và cho vào bình tam giác đã chuẩn bị sẵn môi trường khoáng. Tiến hành khử trùng các bình tam giác trên và chủng vi khuẩn vào từng nghiệm thức với tỉ lệ 1%. Đặt các bình tam giác đã chủng vi khuẩn vào máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút/30°C/10 ngày. Chỉ tiêu theo dõi: Phần trăm trọng lượng cành thanh long hao hụt được đo bằng cách sấy sản phẩm sau khi ủ ở 105°C. Phần trăm khối lượng hao hụt được tính theo công thức:

$\% \text{ khối lượng hao hụt} = (\text{khối lượng ban đầu} - \text{khối lượng lúc sau}) / \text{khối lượng ban đầu} \times 100$

Đánh giá khả năng phân giải cành thanh long tươi của các dòng vi khuẩn:

Cành thanh long sau khi rửa bỏ, được chặt khúc ngắn từ 3 – 5 cm. Cành sau khi được chặt thành các đoạn ngắn sẽ được cân trọng lượng. Sau đó được cho vào bình 10 lít và tiến hành phun dịch tăng sinh của mỗi chủng vi khuẩn thí nghiệm đã được chuẩn bị trước 3 ngày lên cành thanh long. Bình thí nghiệm được đậy không kín đảm bảo cho không khí được lưu thông ra vào bình. Sau 10 ngày ủ tiến hành lấy chỉ tiêu khối lượng hao hụt. Chỉ tiêu theo dõi: Phần trăm khối lượng cành thanh long hao hụt được đo bằng cách sấy sản phẩm sau phân giải ở 105°C. Phần trăm khối lượng hao hụt được tính theo công thức: $\% \text{ khối lượng hao hụt} = (\text{khối lượng ban đầu} - \text{khối lượng lúc sau}) / \text{khối lượng ban đầu} \times 100$

Khảo sát khả năng tổng hợp endoglucanase, exoglucanase và β -glucosidases của các dòng vi khuẩn phân giải xenlulo.

Tiến hành khảo sát ở các thời điểm 2, 4, 6, 8, 10 ngày sau khi chủng. Khảo sát hoạt tính hệ enzyme cellulase gồm: endoglucanases, exoglucanases và β -glucosidases (theo Yung-Chung Lo *et al.* (2009)

Định danh vi sinh vật tuyển chọn được thực hiện tại công ty Nam Khoa, TP Hồ Chí Minh với qui trình như sau:

Ly trích ADN của các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải mạnh cơ chất cành thanh long. Tiến hành trên các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải cơ chất cành thanh long. Nuôi vi khuẩn trong ống nghiệm đã chuẩn bị sẵn môi trường LB lỏng và ủ 24 h ở nhiệt độ 30 °C. Chuyển dung dịch nuôi vi khuẩn sang eppendorf 2 ml và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút để thu sinh khối vi khuẩn. Loại bỏ hết dung dịch môi trường nuôi vi khuẩn trong eppendorf, thêm 250 μ l dung dịch TE (pH 8) và làm tan sinh khối vi khuẩn. Sau đó thêm 50 μ l dung dịch SDS 10% để loại bỏ protein vi khuẩn. Bổ sung thêm 5 μ l protein K (10 mg/ml) và ủ tiếp ở 65 °C trong 20 phút (cứ mỗi 5 phút đảo ngược eppendorf một lần) để loại ARN ra khỏi ADN. Thêm 400 μ l CTAB 10%/NaCl 0,7 M và ủ tiếp ở 65°C trong 20 phút. Cho tiếp 600 μ l chloroform – isoamyl alcohol vào eppendorf và lắc đều. Sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Chuyển phần dịch trong bên trên vào eppendorf mới, thêm 1 ml isopropanol vào eppendorf và lắc đều, ủ ở -20°C ít nhất 30 phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút, rót nhẹ để loại bỏ phần nước bên trên, ADN tủa ở đáy eppendorf. Rửa ADN với 1 ml cồn 70%, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 5 phút. Ly tâm chân không ở 45 °C trong 15 phút để loại hết cồn còn lại trong eppendorf. Hòa tan ADN với 30 μ l nước cất hai lần vô trùng, trữ lạnh ở 4°C nếu chưa sử dụng. Sau khi ADN được tinh sạch tiến hành thực hiện phản ứng PCR bằng máy PCR. Khuếch đại ADN bằng kỹ thuật PCR Perkin Elmer PE 9700 (Mỹ) với cặp mồi có trình tự như sau. 27f 5’-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3’; 1492r 5’-GCTACCTTGTACGACTT. Số liệu trong đề tài được xử lý bằng phần mềm Statgraphics XV.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải xenlulo

3.1.1. Kết quả phân lập vi khuẩn phân giải xenlulo trên môi trường chứa CMC

Tám mươi lăm dòng vi khuẩn có khả năng phân giải CMC đã được phân lập từ 15

mẫu canh thanh long hoaï mục từ 5 tỉnh: Bạc Liêu, Bến Tre, Long An, Tiền Giang và Vĩnh

Long. Số lượng các dòng vi khuẩn phân lập ở mỗi tỉnh được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1: Số lượng dòng vi khuẩn thu được ở các địa điểm thu mẫu

Stt	Địa điểm thu mẫu	Số dòng vi khuẩn
1	Tỉnh Bạc Liêu	16
2	Tỉnh Bến Tre	12
3	Tỉnh Long An	25
4	Tỉnh Tiền Giang	6
5	Tỉnh Vĩnh Long	26
Tổng số		85

Kết quả Bảng 1 cho thấy số lượng dòng vi khuẩn phân lập được ở tỉnh Vĩnh Long chiếm tỉ lệ nhiều nhất 30,6%, kế đến là Long An chiếm 29,4%, Bạc Liêu chiếm 18,8%, Bến Tre, 14,1% và thấp nhất là tỉnh Tiền Giang chỉ chiếm 7,1%. Từ kết quả trên cho thấy, cả hai tỉnh Long An và Tiền Giang đều có diện tích trồng thanh long lớn nhưng lại cho tỉ lệ số dòng vi khuẩn phân lập giữa hai tỉnh này lên đến 1:4,2 nguyên nhân dẫn đến tình trạng này cũng có thể do điều kiện thời tiết thu mẫu khác nhau giữa các điểm thu mẫu và điều kiện môi trường giữa các tỉnh. Trong nghiên cứu của Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp (2011) từ 15 mẫu đất thuộc các tỉnh Đồng bằng Sông Cửu long đã phân lập được 59 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải xenlulo, nhưng chỉ có 33 dòng vi khuẩn hiếu khí (chiếm 55,9% số dòng phân lập), kết quả thấp hơn so với đề tài này, với tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều là vi khuẩn hiếu khí (đề tài không thực hiện phân lập các dòng kỵ khí).

Kết quả về hình dạng tế bào, các dòng vi khuẩn được chia 3 dạng chính. Trong đó có 28 dòng vi khuẩn hình cầu chiếm 32,9% (dòng vi khuẩn có kích thước <0,5 µm chiếm 64,3%, 32,1% dòng vi khuẩn có kích thước trung bình từ 0,5-1 µm, dòng vi khuẩn có kích thước >1 µm chiếm 3,6%), 27 dòng vi khuẩn có tế bào hình que ngắn chiếm 31,8% (dòng vi khuẩn có chiều dài <0,5 µm chiếm 11,1%, 88,9% dòng vi khuẩn có kích thước 0,5-0,7 µm) và 30 dòng vi khuẩn hình que chiếm 35,3% (dòng vi khuẩn có chiều dài tế bào từ 0,7-1 µm chiếm tỉ lệ 67,7% và dòng vi khuẩn có chiều dài tế bào ≥1 µm chiếm 33,3%). Khi chia các dòng vi khuẩn theo hình dạng, nhận thấy có sự tương đồng về số lượng các dòng vi khuẩn giữa các nhóm với nhau. Theo kết quả phân lập của Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp (2011) thì tất cả các

dòng phân lập được đều có hình que từ kết quả trên cho thấy sự đa dạng về hình dạng của các dòng vi sinh vật phân giải xenlulo.

Dựa theo đặc điểm vách tế bào thì đa số các dòng vi khuẩn thu được đều là Gram dương (97,6%), trừ hai dòng BTG6 và VL5 là vi khuẩn Gram âm (2,4%) kết quả trên cho thấy tỉ lệ vi khuẩn phân giải xenlulo có vách tế bào thuộc dạng Gram âm chiếm tỉ lệ thấp hơn so với dạng Gram dương. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong các nghiên cứu của Yung-Chung Loa *et al.* (2009) khi phân lập được 9 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải xenlulo trong đó có 7 dòng vi khuẩn có tế bào thuộc Gram dương, 2 dòng vi khuẩn thuộc Gram âm và trong nghiên cứu của B.C. Behera *et al.* (2014) cho số lượng dòng vi khuẩn Gram âm là 7/15 tổng số dòng phân lập được. Tương tự, kết quả thử catalase cho thấy đa số các dòng phân lập được đều cho kết quả dương tính (96,5%), trừ LA23, LA36 và VL34 cho kết quả âm tính (3,5%). Khi khảo sát khả năng di động thì tất cả các dòng phân lập được đều có khả năng di động trong khi trong nghiên cứu của B.C. Behera *et al.* (2014) thì chỉ có 53,3% dòng phân lập được là có khả năng di động. Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn phân lập được trên đất vườn nên khả năng xuất hiện nguồn nước chảy để chúng phát tán là rất thấp vì thế hầu hết chúng đều có khả năng di động để có thể di chuyển đến nơi có cơ chất. Trong khi nghiên cứu của B.C. Behera *et al.* (2014) được thực hiện trên đất rừng ngập mặn, nơi thường xuyên có thủy triều lên xuống vì thế đây là điều kiện thuận lợi cho các dòng vi khuẩn không có khả năng di động di chuyển đến nơi có cơ chất nhờ vào dòng chảy của thủy triều. Kết quả quan sát mô tả hình dạng kích thước khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phân lập được rất đa dạng cụ thể

về hình dạng khuẩn lạc thì được chia làm 3 dạng là tròn (56,4%), dạng không đều (42,4%) và dạng cuộn xoắn chỉ xuất hiện trên một dòng chiếm tỉ lệ 1,2%. Về dạng bìa cũng được chia làm 3 dạng (nguyên, phân thùy và dạng gợn sóng), độ nổi và màu sắc cũng được chia thành nhiều dạng ví dụ màu sắc thì có 4 loại và độ nổi được chia làm 3 loại trong đó các dòng có khả năng mọc khuẩn lạc vào môi trường cho hoạt tính phân giải rất mạnh.

3.1.2. Kết quả đánh giá khả năng phân giải CMC của các dòng vi khuẩn

Có 85 dòng vi khuẩn được phân lập từ 15 mẫu cành thanh long thối (chiếm 81% tổng số dòng phân lập được) có khả năng phân giải CMC thông qua vòng phân giải (vòng halo) xung quanh khuẩn lạc trên môi trường cơ chất

CMC khi nhuộm với Lugol. Vòng halo được đo sau khi cấy vi khuẩn ở điều kiện hiếu khí ở 37°C trong 48 h cấy một số dòng có khả năng phân giải mạnh thể hiện ở đường kính phân giải lên đến 3,4 cm cho hoạt tính phân giải từ 5,66 đến 85,29%, điều đó chứng tỏ rằng có nhiều dòng phân lập được có khả năng phân giải CMC và thể hiện khả năng sinh cellulase mạnh (Bảng 2). Khả năng sinh cellulase được thể hiện rõ nhất qua kết quả khảo sát dòng BL18 cho phần trăm phân giải CMC lên đến 85,16%. Kết quả khảo sát tương tự của Behera *et al.* (2014), Hatami *et al.* (2008) chỉ cho kết quả cao nhất là 52,4% thấp hơn nhiều so với các dòng được phân lập từ đề tài. Tuy nhiên, kết quả này thấp hơn kết quả khảo sát của Gupta *et al.* (2012) cho % phân giải CMC lên đến 90%.

Bảng 2: Khả năng phân giải CMC của các dòng vi khuẩn phân lập được từ cành thanh long hoai mục

Stt	Dòng vi khuẩn	Tỷ lệ hao hụt khối lượng (%)	Stt	Dòng vi khuẩn	Hoạt tính phân giải (%)	Stt	Dòng vi khuẩn	Hoạt tính phân giải (%)
1	BL18	85,16	29	LA34	83,71	57	TG9	72,22
2	BL24	80,29	30	LA32	81,95	58	TG38A	71,10
3	BL20	73,87	31	LA41	81,27	59	TG15	16,67
4	BL22	70,87	32	LA36	77,97	60	VL27	82,58
5	BL40	65,71	33	LA23	71,75	61	VL33	80,77
6	BL15	55,85	34	LA26	71,10	62	VL37	78,54
7	BL31	59,37	35	LA25	58,15	63	VL1	78,26
8	BL16	48,68	36	LA6	53,27	64	VL24	77,97
9	BLG3	44,44	37	LA27	31,51	65	VL11	66,67
10	BL42	35,06	38	LA13	28,57	66	VL34	66,67
11	BL12	16,67	39	LA12	20,63	67	VL16	57,26
12	BLG1	16,67	40	LA14	20,63	68	VL21	54,55
13	BL3	12,28	41	LA37	20,63	69	VL2	48,45
14	BL10	12,28	42	LA1	16,67	70	VL5	48,45
15	BLG2	12,28	43	LA3	16,67	71	VL26	35,06
16	BL19	5,66	44	LA38	16,67	72	VL29	31,51
17	BT27	75,85	45	LA4	12,28	73	VL19	25,37
18	BTG8	70,06	46	LA35	12,28	74	VL3	16,67
19	BTG2	63,50	47	LA39	12,28	75	VL4	16,67
20	BTG6	63,50	48	LA2	5,66	76	VL13	16,67
21	BTG5	60,63	49	LA11	5,66	77	VL18	16,67
22	BTG3	57,26	50	LA17	5,66	78	VL20	16,67
23	BT7	55,75	51	LA24	5,66	79	VL39	16,67
24	BT9	55,75	52	LA40	5,66	80	VL8	12,28
25	BT16	50,00	53	LAG1	5,66	81	VL14	12,28
26	BT16	50,00	54	TG2B	82,94	82	VL31	12,28
27	BT19	20,63	55	TG12A	82,94	83	VL36	12,28
28	BTG5	16,67	56	TG1A	77,97	84	VL12	5,66
						85	VL35	5,66

Kết quả trong Bảng 2 cho thấy có đến 54,2% số dòng vi khuẩn cho hoạt tính phân giải <math>< 50\%</math>, 12,9% có khả năng phân giải từ 50% đến dưới 60% và có 32,9% số dòng vi khuẩn có khả năng phân giải $\geq 60\%$. Kết quả cho thấy trung bình số dòng vi khuẩn có khả năng phân giải CMC $\geq 60\%$ của đề tài thấp hơn nghiên cứu của Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp (2011) khi có đến 63,6% số dòng vi khuẩn có khả năng phân giải CMC $\geq 60\%$. Các dòng vi khuẩn BL18, BL20, BL22, BL24, BL40, BTG2, BTG5, BTG6, BTG8, BT27, LA23, LA26, LA32, LA34, LA36, LA41, TG1A, TG2B, TG9, TG12A, TG38A, VL1, VL11, VL24, VL27, VL33, VL34 và VL37 cho % phân giải từ 60,63-85,16% được chọn để thực hiện các khảo sát khả năng phân giải cơ chất bột thanh long trên môi trường thạch.

3.1.3. Kết quả đánh giá khả năng phân giải giấy lọc Whatman No.1 của các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải cơ chất bột cành thanh long trên môi trường thạch

Kết quả khảo sát sau 7 ngày ủ, cho thấy giấy lọc trong các nghiệm thức có chủng vi khuẩn bị nhũn ra và lắng xuống trong khi nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn giấy lọc chỉ bào mòn nhẹ xung quanh phần rìa giấy do tác động cơ học của máy lắc. Sau khi đánh giá khối lượng hao hụt có 11/16 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải giấy lọc. Các dòng có khả năng phân giải mạnh cơ chất CMC nhưng không có khả năng phân giải giấy lọc, chứng tỏ tế bào chỉ có khả năng tạo ra enzyme endoglucanase và enzyme này chưa đủ để phân giải hệ xenlulo mà cần một hệ enzyme cellulase và 10 dòng vi khuẩn (BL18, BTG2, BTG8, LA32, LA34, LA41, VL1, VL24, VL33 và LA26) có khả năng đáp ứng được yêu cầu trên khi cho khả năng phân giải giấy lọc từ 54,6 - 62,5% cao hơn kết quả do Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp (2011) khi khảo sát khả năng phân giải giấy photocopy cho kết quả cao nhất là 61,33%, Wen-Jing Lu *et al.* (2005) cho kết quả cao nhất đạt 26,3%, Bichet-Hebe *et al.* (1999) báo cáo rằng tỉ lệ phân giải giấy đạt cao nhất 60% sau 10 ngày ủ với hỗn hợp vi khuẩn phân giải xenlulo. Tuy nhiên, kết quả của đề tài vẫn còn thấp hơn so với nghiên cứu của Pratima Gupta *et al.* (2011) khi cho kết quả phân giải giấy lên đến 65,7%. Kết quả cho thấy không có khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức có bổ xung các

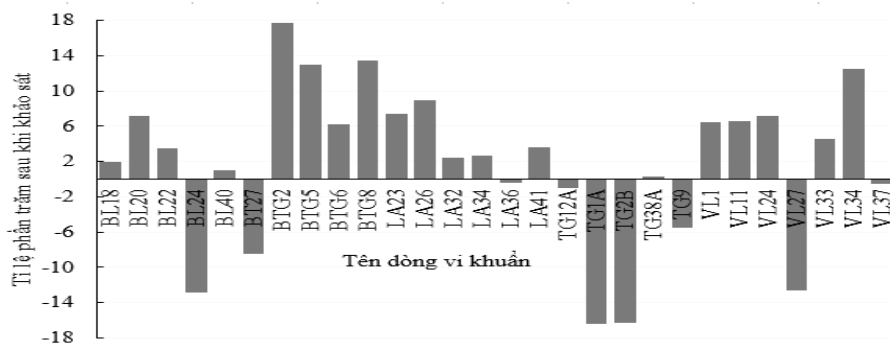
dòng vi khuẩn nêu trên nhưng khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Mười dòng vi khuẩn BL18, BTG2, BTG8, LA32, LA34, LA41, VL1, VL24, VL33 và LA26 được sử dụng để tiến hành thí nghiệm tiếp theo khảo sát khả năng phân giải bột cành thanh long.

3.2. Kết quả đánh giá khả năng phân giải cành thanh long của vi sinh vật

3.2.1. Kết quả đánh giá khả năng phân giải cành thanh long của vi sinh vật trên môi trường thạch

Hai mươi tám dòng vi khuẩn đã qua khảo sát khả năng phân giải CMC được tiến hành khảo sát khả năng phân giải cơ chất bột cành thanh long trên môi trường thạch. Phương pháp khảo sát được tiến hành tương tự như phương pháp khảo sát khả năng phân giải cơ chất CMC. Tuy nhiên, môi trường thực hiện khảo sát được thay CMC bằng bột cành thanh long. Sau khi các dòng vi khuẩn được cấy lên môi trường cơ chất thanh long đem ủ sau 48 h và tiến hành nhuộm với Lugol. Kết quả khảo sát được ghi nhận trong Bảng 2 cho thấy một số dòng vi khuẩn có khả năng phân giải tốt trên cơ chất CMC nhưng trên môi trường cơ chất bột cành thanh long lại cho kết quả đối lập với kết quả khảo sát ở phần trước. Các dòng vi khuẩn: BL24, BT27, LA36, TG12A, TG9, VL27, VL37, TG1A, TG2B trên môi trường cơ chất CMC cho phần trăm phân giải cao nhưng trên cơ chất bột cành thanh long lại cho khả năng phân giải giảm. Trong khi các dòng vi khuẩn BL18, BL20, BL22, BL40, BTG2, BTG5, BTG6, BTG8, LA23, LA26, LA32, LA34, LA41, TG38A, VL1, VL11, VL24, VL33, VL34 có phần trăm phân giải thấp hơn trên môi trường CMC nhưng lại cho % phân giải trên cơ chất bột cành thanh long cao hơn. Điều này có thể giải thích rằng có thể một số dòng vi khuẩn có thể chỉ có khả năng sinh một loại enzyme nhất định, nên khi trên môi trường CMC cho hoạt tính mạnh nhưng khi được nuôi cấy trên môi trường cơ chất bột cành thanh long nên các dòng này chỉ có khả năng phân giải một phần trong khi một số dòng khác có thể có một phức hệ enzyme có khả năng phân giải nhiều cơ chất có trong thành phần bột cành thanh long nên cho khả năng phân giải cao hơn. Điển hình là dòng vi khuẩn BTG8 tăng 13,44%, các dòng vi khuẩn BL18, VL24, VL33

có tỉ lệ tăng trên 5%, trong khi dòng TG1A các dòng khác có sự tăng giảm không đáng kể. giảm đến 16,43%, dòng VL27 giảm 12,57%



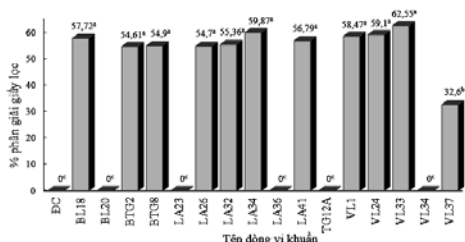
Hình 1. Biểu đồ sự chênh lệch phần trăm phân giải sau khi khảo sát khả năng phân giải cơ chất bột cành thanh long so với cơ chất CMC

Bảng 3: Khả năng phân giải cơ chất bột cành thanh long của các dòng vi khuẩn

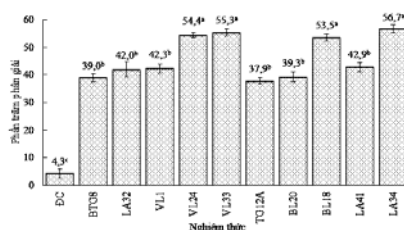
Stt	Tên	Tỷ lệ hao hụt khối lượng (%)	Stt	Tên	Tỷ lệ hao hụt khối lượng (%)
1	BL18	87,07	15	LA36	77,61
2	BL20	81,01	16	LA41	84,85
3	BL22	74,38	17	TG12A	81,93
4	BL24	67,38	18	TG1A	61,54
5	BL40	66,67	19	TG2B	66,67
6	BT27	67,38	20	TG38A	71,35
7	BTG2	81,17	21	TG9	66,67
8	BTG5	73,60	22	VL1	84,70
9	BTG6	69,70	23	VL11	73,22
10	BTG8	83,50	24	VL24	85,15
11	LA23	79,17	25	VL27	70,01
12	LA26	80,75	26	VL33	85,29
13	LA32	84,38	27	VL34	79,17
14	LA34	86,37	28	VL37	78,04

Bảng 3 cho thấy có đến 57,1% số dòng vi khuẩn cho khả năng phân giải lớn hơn 75%, 42,9% số dòng vi khuẩn cho % phân giải thấp hơn 75% trong đó có đến 6 dòng vi khuẩn cho kết quả giảm trong khảo sát này là dòng: BL24, BT27, TG1A, TG2B, TG9 và VL27, ba dòng vi khuẩn cho % phân giải giảm là VL37, LA36 và TG12A nhưng vẫn duy trì khả năng phân giải trên 75% mặc dù đã giảm hơn so với kết

quả khảo sát trên cơ chất CMC. Các dòng BL18, BL20, BTG2, BTG8, LA23, LA26, LA32, LA34, LA36, LA41, TG12A, VL1, VL24, VL33, VL34 và VL37 cho khả năng phân giải bột cành thanh long trên môi trường thạch $\geq 75\%$ được chọn để thực hiện khảo sát khả năng phân giải giấy lọc Whatman No 1.



Hình 2. Biểu đồ khả năng phân giải giấy lọc Whatman No.1 (%) sau 7 ngày ủ với các dòng vi khuẩn



Hình 3. Biểu đồ tỉ lệ khối lượng hao hụt bột cành thanh long sau 10 ngày ủ

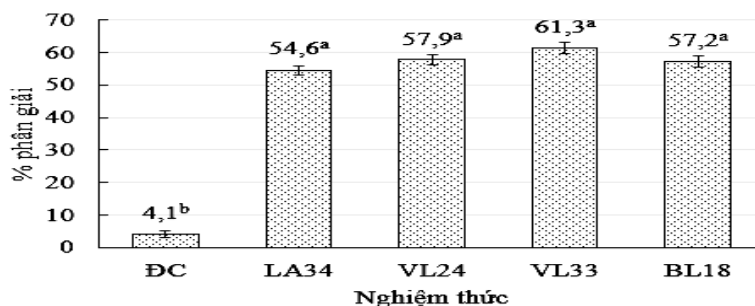
3.2.2. Kết quả đánh giá khả năng phân giải bột cành thanh long trên môi trường lỏng

Từ kết quả tính khối lượng hao hụt nhận thấy dòng VL24, VL33, LA34 và BL18 cho % hao hụt từ 53,03% đến 58,20% khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại. Kết quả này tương đối cao hơn so với kết quả khảo sát hiệu quả của vi khuẩn phân giải xenlulo sau 20 ngày ủ trong xử lý rác hữu cơ của Hà Thanh Toàn và ctv (2008) với phần trăm hao hụt trọng lượng là 42,18%. Kết quả này cũng cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Lê Phạm Thị Tường Anh và ctv (2012) khi khảo sát khả năng thủy phân bã mía của hai dòng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* và *Chryseobacterium* sp cho phần trăm phân giải lần lượt là 48,8% và 57,4%. Tuy nhiên, theo nghiên cứu trên tác giả chỉ thực

hiện ủ bã mía trong 4 ngày.

3.2.3. Đánh giá khả năng phân giải cành thanh long khô

Bốn dòng vi khuẩn BL18, LA34, VL24 và VL33 được chọn từ thí nghiệm 2 được sử dụng để thực hiện thí nghiệm này. Các dòng vi khuẩn được tăng sinh, chuẩn bị môi trường khoáng có bổ sung các đoạn cành thanh long đã được sấy khô và cho vào môi trường. Sau đó, đem hấp khử trùng và tiến hành chủng các dòng vi khuẩn đã được tăng sinh theo tỷ lệ 1% sau khi các bình tăng sinh đã nguội, các bình được chủng vi khuẩn được đặt vào máy lắc với thông số 150 vòng/phút/10 ngày/37°C. Sau đó được lấy ra lọc bỏ phần dịch bằng giấy lọc, sấy sản phẩm lọc ở 150°C, cân khối lượng và tính khối lượng hao hụt.



Hình 4: Quá trình lọc sản phẩm sau 10 ngày ủ cành thanh long khô với dòng vi khuẩn VL33

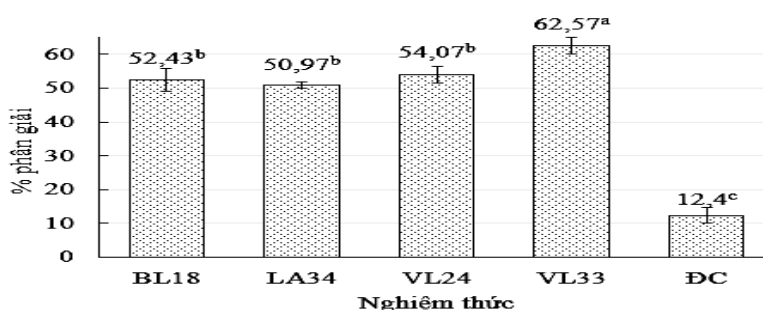
Kết quả thống kê (Hình 5) cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải cành thanh long từ 54,6% - 61,3% khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95% so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn, tuy nhiên các nghiệm thức chủng 4 dòng vi khuẩn BL18, LA34, VL24 và VL33 cho kết quả không có khác biệt ý nghĩa. Các dòng vi khuẩn này được tăng sinh để thực hiện cho thí nghiệm tiếp theo nhằm đánh giá khả năng phân giải cành thanh long tươi.

3.2.4. Kết quả đánh giá khả năng phân giải cành thanh long tươi của 4 dòng vi khuẩn BL18, LA34, VL24 và VL33

Kết quả khảo sát khả năng phân giải cành thanh long tươi của các dòng vi khuẩn khác biệt giữa các nghiệm thức. Kết quả cho thấy nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn sau 10 ngày ủ thì cành thanh long tương đối

nguyên vẹn, chỉ bị phân giải một phần ít ở hai đầu vết cắt mặc dù trong đó vẫn tồn tại một số dòng vi khuẩn. Trong khi nghiệm thức chủng dòng vi khuẩn VL33 cho thấy các đoạn cành thanh long hầu hết đều bị phân rã, chỉ còn lại một số thành phần như là lớp cutin và lõi cành thanh long, vi khuẩn không phân giải được.

Sau khi xử lý số liệu nhận thấy các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Trong khi trong 4 nghiệm thức lại chia làm hai nhóm: nhóm nghiệm thức chủng 3 dòng vi khuẩn BL18, LA34, VL24 cho kết quả không khác biệt ý nghĩa với nhau, tuy nhiên lại cho kết quả khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức chủng dòng vi khuẩn VL33 khi có % khối lượng hao hụt lên đến 62,57±2,35% (hình 5).



Hình 5: Biểu đồ phân trăm phân giải cành thanh long.

Khi so sánh với thí nghiệm trước, thí nghiệm chủng dòng vi khuẩn VL33 cho khả năng phân giải không khác biệt nhiều giữa hai thí nghiệm. Tuy nhiên, các thí nghiệm có chủng vi khuẩn khác cho kết quả thấp hơn so với thí nghiệm phân giải cành thanh long khô. Kết quả này có thể giải thích là do khi khảo sát khả năng phân giải cành thanh long khô các điều kiện được kiểm soát vô trùng nên các dòng vi khuẩn thí nghiệm không chịu sự tác động, cạnh tranh của các dòng vi khuẩn khác và điều kiện môi trường nuôi cấy được tối ưu bằng các khoáng chất nên cho kết quả cao. Trong khi thí nghiệm phân giải cành thanh long tươi các dòng vi khuẩn được phun trực tiếp vào cành thanh long tươi nên các dòng vi khuẩn tồn tại trên bề mặt của cành thanh long tác động đến các dòng vi khuẩn thí nghiệm nên kết quả phân giải thấp hơn, riêng dòng vi khuẩn VL33 lại cho kết quả tốt hơn chứng tỏ khả năng cạnh tranh của dòng vi khuẩn này so với các vi sinh vật khác tốt hơn. Đây cũng là đặc điểm có lợi cho các nghiên cứu sau này khi đánh giá khả năng kháng nấm bệnh đốm trắng trên thanh long. Riêng thí nghiệm đối chứng trong thí nghiệm này cho kết quả cao hơn thí nghiệm trước do trong thí nghiệm này cành thanh long không được thanh trùng nên còn những dòng vi khuẩn có khả năng phân giải xenlulo tồn tại, tuy nhiên khả năng phân giải của các dòng này không cao so với các dòng vi khuẩn sử dụng thí nghiệm.

3.3. Khả năng tổng hợp enzyme endoglucanase, enzyme exoglucanase, enzyme β -glucosidase của dòng vi khuẩn VL33

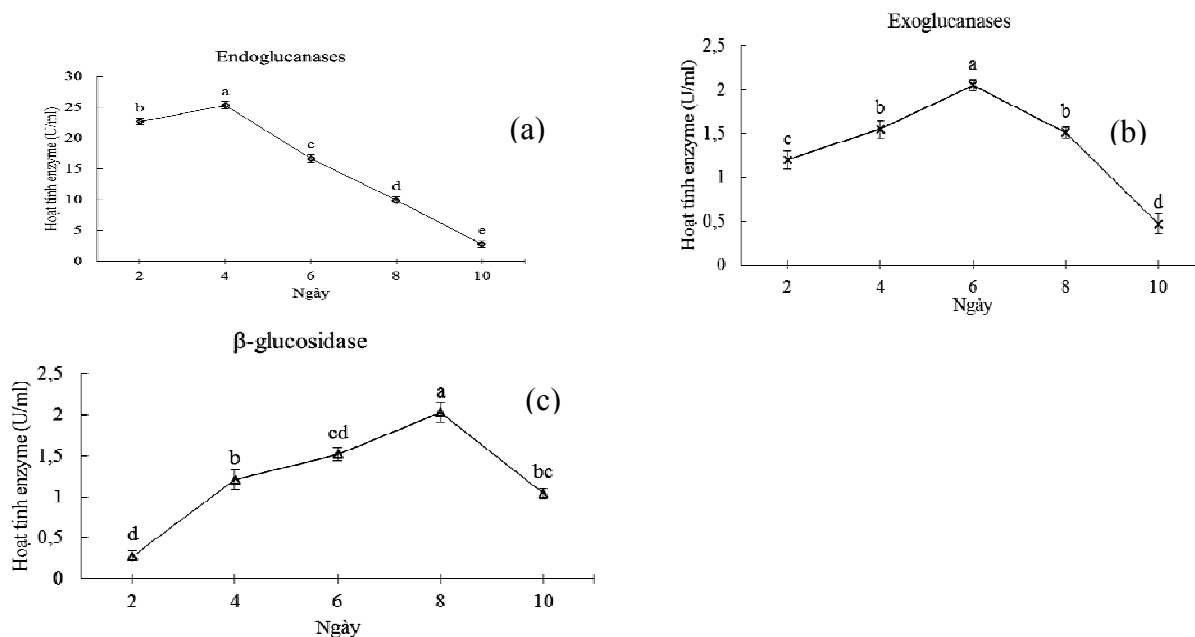
Dòng vi khuẩn VL33 được khảo sát có các đặc điểm tương đồng với các dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Với các đặc điểm này có thể dòng VL33 có khả năng sinh được một phức hệ enzyme

cellulase tương tự như một số báo cáo về khả năng sinh enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Enzyme cellulase đem khảo sát được thu từ bình nuôi cấy sau mỗi hai ngày. Kết quả đánh giá khảo sát hệ enzyme cho thấy dòng vi khuẩn VL33 có khả năng sinh 3 loại enzyme chính trong hệ enzyme cellulase.

Thanh sai số thể hiện sai số chuẩn giữa ba lần lặp lại của mỗi thí nghiệm, các chữ cái thể hiện sự khác biệt ý nghĩa. Đối với enzyme endoglucanases (Hình 6a) cho thấy dòng vi khuẩn VL33 cho hoạt tính enzyme giữa các ngày khảo sát khác biệt có ý nghĩa, hoạt tính cao nhất vào ngày thứ 4 với kết quả là $25,393 \pm 0,89$ U/ml và hoạt tính enzyme giảm dần cho đến ngày thứ 10 chỉ còn $2,81 \pm 0,79$ U/ml. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp (2011), khi khảo sát hoạt tính endoglucanase mạnh vào ngày thứ 4 nuôi cấy, Arun *et al.* (2007) khảo sát trên hai dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CY5 và *Bacillus circulans* TP3 cũng cho hoạt tính enzyme (cellulase nói chung) cao nhất vào ngày thứ 4 sau khi ủ (*Bacillus subtilis* CY5 hoạt tính cellulase >30 U/ml, *Bacillus circulans* TP3 hoạt tính enzyme >25 U/ml), Saraswati Bai *et al.*, (2012) khảo sát hệ enzyme của dòng vi khuẩn phân lập cho thấy hoạt tính cellulase mạnh nhất vào ngày thứ 5 sau khi ủ. Enzyme exoglucanases (Hình 6b) cho hoạt tính phân giải giữa các ngày khảo sát khác biệt có ý nghĩa, hoạt tính mạnh nhất vào ngày thứ 6, tương tự với nghiên cứu của Võ Văn Phước Huệ và Cao Ngọc Điệp (2011) giảm dần đến ngày 10 tuy nhiên hoạt tính enzyme cao hơn, đạt mức $2,05 \pm 0,06$ U/ml và chỉ còn $0,47 \pm 0,11$ U/ml. Enzyme chính thứ 3 trong hệ enzyme cellulase là enzyme β -glucosidase (Hình 6c) kết quả thống kê cho thấy hoạt tính giữa các ngày khảo sát khác biệt

có ý nghĩa, cho thấy hoạt tính của enzyme này mạnh nhất vào ngày thứ 8 đạt $2,03 \pm 0,12$ U/ml, trong khi nghiên cứu của Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp (2011) hoạt tính enzyme đạt cao nhất vào ngày thứ 6 tuy nhiên hoạt tính thấp hơn, hoạt tính enzym trong ngày khảo sát thứ 10 giảm xuống còn $1,04 \pm 0,14$. Từ kết quả khảo sát hệ enzym nhận thấy trong 4 ngày đầu enzyme endoglucanase được sinh ra chủ yếu

góp phần phân cắt ngẫu nhiên các cấu trúc xenlulo của cành thanh long. Sau đó đến ngày thứ 6 enzyme exoglucanase được sản xuất nhiều để phân cắt các sản phẩm ngắn hơn và đường (được giải phóng từ quá trình phân cắt của enzyme endoglucanase) và cuối cùng là enzyme β -glucosidase được sinh ra nhiều vào ngày thứ 8 để phân cắt các sản phẩm từ hai enzyme trước để tạo ra các phân tử đường đơn.



Hình 6: Hoạt tính enzyme cellulase trong môi trường cơ chất bột cành thanh long. (a): enzyme endoglucanase, (b) enzyme exoglucanase, (c): enzyme β -glucosidase

3.4. Kết quả định danh vi sinh vật tuyển chọn

Kết quả giải trình tự gen 16S rARN với chiều dài là 481 nu. Trình tự gen 16S rARN được Blast trên ngân hàng dữ liệu NCBI cho kết quả đồng hình 100% với dòng *Bacillus subtilis*. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Yu *et al.* (2012) khi cho rằng *Bacillus subtilis* được phân lập từ đất, xác bã hữu cơ, và phân động vật. Kết quả khảo sát các đặc điểm sinh hóa vi khuẩn có tế bào hình que, Gram dương, có bào tử, hiếu khí, dương tính với thuốc thử catalase và có khả năng di động kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Bharat Pokhrel *et al.* (2014), Shafaat *et al.* (2011). Bên cạnh đó Kinsella *et al.* (2010) cũng báo cáo rằng các dòng *Bacillus subtilis* có khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh do có khả năng sinh ra chất kháng sinh. Kết quả này cũng

góp phần giải thích khả năng phân giải cành thanh long tươi của dòng VL33 không sụt giảm so với các dòng vi khuẩn khác cùng thí nghiệm. Nhiều nghiên cứu cũng chứng minh rằng *Bacillus subtilis* có khả năng sinh nhiều enzyme ngoại bào chẳng hạn như amylase (Shafaat *et al.*, 2011, Shinsaku Hayashida *et al.*, 1988), cellulase (Dinesh Choudhary, 2013, Yin *et al.*, 2010, Arun *et al.*, 2007), β -mannanase và xylanase (Chartchai *et al.*, 1999). Đặc biệt Yu *et al.*, (2012) cho rằng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng sản xuất ra 4 loại enzyme CMCCase, FPCCase, Avicelase và xylanase và β -glucosidase cho khả năng phân giải nhiều loại cơ chất khác kể cả tinh thể xenlulo. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả khảo sát hệ enzyme cellulase của dòng vi khuẩn VL33 cho kết quả bao gồm 3 loại enzyme chính của hệ enzyme cellulase.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đề tài đã phân lập được 85 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải xenlulo từ cành thanh long đang phân hủy tại 5 tỉnh: Bạc Liêu, Bến Tre, Long An, Tiền Giang và Vĩnh Long. Trong đó có hai mươi tám dòng vi khuẩn (BL18, BL20, BL22, BL24, BL40, BTG2, BTG5, BTG6, BTG8, BT27, LA23, LA26, LA32, LA34, LA36, LA41, TG1A, TG2B, TG9, TG12A, TG38A, VL1, VL11, VL24, VL27, VL33, VL34 và VL37) có khả năng phân giải CMC trên môi trường thạch trên 60%. Các dòng vi khuẩn BL18, BL20, BTG2, BTG8, LA23, LA26, LA32, LA34, LA36, LA41, TG12A, VL1, VL24, VL33, VL34 và VL37) cho khả năng phân giải cơ chất bột cành thanh long trên 75%. Các dòng vi khuẩn BL18, BTG2, BTG8, LA32, LA34, LA41, VL1, VL24, VL33 và LA26 cho kết quả phân giải giấy lọc Whatman No.1 từ 54,6-62,5%. Dòng vi khuẩn VL24, VL33, LA34 và BL18 cho khả năng phân giải bột cành thanh long trong môi trường lỏng từ 53,03-58,20%. Dòng vi khuẩn VL33 cho khả năng phân giải cành thanh long tươi trong điều kiện phòng thí nghiệm lên đến 62,57%. Dòng vi khuẩn VL33 có khả năng sinh ra ba loại enzyme chính của hệ enzyme cellulase là endoglucanase, exoglucanase và β -glucosidase. Kết quả định danh dựa trên trình tự 16S rARN cho thấy dòng vi khuẩn VL33 đồng hình 100% với vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

4.2. Đề nghị

Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy vi khuẩn VL33 để đạt hoạt tính phân giải xenlulo cao. Khảo sát khả năng kháng nấm *Neoscytalidium dimiditatum* của các dòng vi khuẩn phân lập. Khảo sát khả năng phân giải cành thanh long của dòng vi khuẩn VL33 trong điều kiện ngoài đồng và ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học xử lý cành thanh long thải bỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arun K. RAY, Abhinanda Bairagi, Keka Sarkar Ghosh, and Sukanta K. Sen, 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.
2. Behera B.C., Parida S., Dutta S.K., Thatoi H.N., 2014. Isolation and identification of xenlulo degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi River Delta and their cellulase production ability. *American Journal of Microbiological Research*, 2(1): 41-46.
3. Bharat Pokhrel, Binod Bashyal, Rubin Thapa Magar, 2014. Production, purification and characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* isolated from soil. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 2(5): 31-37.
4. Bichet-Hebe I., Pourcher A. M., Sutra L., Comel C., and Moguedet G., 1999. Detection of a whitening fluorescent agent as an indicator of white paper biodegradation: a new approach to study the kinetics of xenlulo hydrolysis by mixed cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 101-109.
5. Cao Ngọc Điệp, 2011. Vi sinh vật. NXB Đại Học Cần Thơ.
6. Chartchai Khanongnuch, Saisamorn Lumyong, Toshihiko Ooi and Shinichi Kinoshita, 1999. A non-cellulase producing strain of *Bacillus subtilis* and its potential use in pulp biobleaching. *Biotechnology Letters*, 21: 61-63. Dinesh Choudhary, 2013. Characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* N15. Master thesis. Thapar University. Punjab, India.
7. Hà Thanh Toàn, Cao Ngọc Điệp, Trần Lê Kim Ngân, Nguyễn Thu Phương, Mai Thu Thảo, Bùi Thế Vinh. 2008. Phân lập vi khuẩn phân giải xenlulo, tinh bột và protein trong nước rỉ từ bãi rác ở Thành phố Cần Thơ. Tạp chí Nông Nghiệp 10 (2008). Nhà Xuất Bản Đại Học Cần Thơ.
8. Hatami S., Alikhani H.A., Besharati H., Salehrastin N., Afrousheh M. and Yazdani Jahromi Z., 2008. Investigation on aerobic cellulolytic bacteria in some of north forest and farming soils. *American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental*, 3(5): 713-716.
9. Kinsella K, Schulthess CP, Morris TF, Stuart JD., 2010. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 42:1009-1192.

10. Lê Phạm Tường Anh. 2012. Nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật phân giải xenlulo giúp xử lý bã mía để nuôi trồng nấm Linh chi. Luận văn Thạc sỹ ngành Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ.
11. Nguyen Trinh Nhat Hang, Nguyen Van Hoa, Nguyen Minh Chau and Woo Nang Chang, (2014). Research strategies to increase sustainable production of dragon fruit and passion fruit. Workshop on increasing production and market access for tropical fruit in southeast asia. 2014: 91-95.
12. Pratima Gupta, Kalpana Samant and Avinash Sahu, 2012. Isolation of cellulose degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*, 2012: 1-10. Shafaat S, Akram M, Rehman A., 2011. Isolation and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus subtilis*. *African Journal Microbiology*, 5: 3334-3338.
13. Shinsaku Hayashida, Yuji Teramoto, And Takehiro Inoue, 1988. Production and characteristics of raw-potato-starch-digesting α -Amylase from *Bacillus subtilis* 65. *Applied and environmental microbiology*, 54(6): 1516-1522.
14. Tittsler, R.P. and Sandholzer L. A., 1936. The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility. *Journal of Bacteriology*, 31: 575-580.
15. Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Điệp, 2011. Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. *Tạp chí Khoa học*, 18a: 177-184.
16. Wen-Jing Lu, Hong-Tao Wang, Shi-Jian Yang, Zhi-Chao Wang, and Yong-Feng Nie, 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51: 353-360.
17. Yin LJ, Lin HH, and Xiao ZR, (2010). Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Marine Science and Technology*, 18: 466-471.
18. Yu-Kyoung Kim, Shin-Chan Lee, Young-Yun Cho, Hyun-Jeong Oh and Young Hwan Ko, 2012. Isolation of Cellulolytic *Bacillus subtilis* Strains from Agricultural Environments. *International Scholarly Research Microbiology*, 2012: 1-9.
19. Yung-Chung Lo, Ganesh D. Saratale, Wen-Ming Chen, Ming-Der Bai, Jo-Shu Chang, 2009. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 417-425.
20. Yang Ling Liang, Zheng Zhang, Min Wu and Jia Xun Feng, 2014. Isolation, screening and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of china and optimization of cellulose production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *BioMed Research International* Volume 2014 (2014), Article ID 512497.

ABSTRACT

Isolation, screening and identification the cellulose degrading bacteria from pitaya clades

Nguyen Thi Ngoc Truc

The study was carried out to aim at isolating and selecting the potential cellulose degrading bacteria. There were 85 clones of cellulose degrading bacteria were isolated, which were collected from 5 provinces in Mekong Delta. Clone BL18 exhibited its highest CMC degrading capacity. There were 11 clones have ability degrading filter paper "Whatman No.1". Clone VL33 showed the highest capacity in pitaya clades degrading (62.57%). The enzyme system of VL33 clone included 3 different enzymes viz. endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase. Endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase showed the highest degrading CMC capacity at 4th day, 6th day and 8th day, respectively. By study of morphology characteristics combined with biochemical characteristic and molecular biology, the clone VL33 was identified as *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, cellulase, cellulose, degrading, pitaya.

Người phản biện: PGS. TS. Phạm Văn Toàn