

## ISOLATION AND SELECTION OF CELLULOSE DEGRADING BACTERIA FROM DRAGON FRUIT GROWING SOIL

Quach Van Cao Thi, Nguyen Lu Khoi Minh, Nguyen Tri Yen Chi\*

Vinh Long University of Technology Education

| ARTICLE INFO       |            | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Received:          | 14/11/2024 | Discarded dragon fruit branches, which are mainly composed of cellulose, decompose very slowly in nature and pose a potential risk of spreading pathogens from decayed branches. Therefore, this study is carried out by isolating and selecting cellulose-degrading bacteria for the decomposition of discarded dragon fruit branches. Sixteen bacterial strains were originated from dragon fruit- growing soil in Vinh Long province. Using the Congo Red staining method, the findings identified that 10/16 isolated bacterial strains exhibited cellulose-degrading activity, with clear zone diameters ranging from $2.0 \pm 0.10$ mm to $9.0 \pm 0.10$ mm. All bacterial strains TL6, TL10, TL12 và TL15 were capable of degrading dragon fruit branches after 15 days on NB and LB media with decomposition efficiency of 15 - 43% and 19 - 38%, respectively. The effects of temperature and pH on the cellulose-degrading activity of isolate TLLH6 were tested and strain TL6 exhibited the strongest cellulose-degrading activity at pH and temperature of 6.5 - 7.5 and 35 - 40 °C, respectively. Strain TL6 was identified as belonging to the <i>Bacillus</i> genus based on morphological and biochemical characteristics along with the results of 16S rRNA gene sequence analysis. These findings offer a crucial foundation for the application of cellulose-degrading bacteria in the treatment of discarded dragon fruit branches. |
| Revised:           | 18/6/2025  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Published:         | 18/6/2025  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| KEYWORDS           |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Bacteria           |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Cellulose          |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Dragon fruit       |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Vinh Long province |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 16S rRNA gene      |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN PHÂN HỦY CELLULOSE TỪ ĐẤT TRỒNG THANH LONG (*Hylocereus costaricensis*) Ở TỈNH VĨNH LONG

Quách Văn Cao Thi, Nguyễn Lữ Khôi Minh, Nguyễn Trí Yến Chi\*

Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

| THÔNG TIN BÀI BÁO |            | TÓM TẮT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ngày nhận bài:    | 14/11/2024 | Cành Thanh long thải bỏ với thành phần chính là cellulose rất chậm phân hủy tự nhiên cũng như nguy cơ lây lan mầm bệnh tiềm ẩn từ những cành hư thối. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có hoạt tính phân giải cellulose để phân hủy cành Thanh long thải bỏ. Kết quả đã phân lập được 16 chủng vi khuẩn từ đất trồng Thanh long ở tỉnh Vĩnh Long. Sử dụng phương pháp nhuộm Congo đỏ, nghiên cứu đã xác định 10/16 chủng vi khuẩn phân lập có khả năng phân hủy cellulose với đường kính vòng phân giải dao động từ $2,0 \pm 0,10$ đến $9,0 \pm 0,10$ mm. Các chủng vi khuẩn TL6, TL10, TL12 và TL15 đều có khả năng phân giải cành Thanh long sau 15 ngày trên môi trường NB và LB với hiệu suất phân giải lần lượt là 15 - 43% và 19 - 38%. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt tính phân giải cellulose cho thấy chủng TL6 thể hiện hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất ở pH và nhiệt độ lần lượt là 6,5 - 7,5 và 35 - 40 °C. Chủng TL6 được xác định thuộc chi <i>Bacillus</i> dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh hóa cùng với kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA. Kết quả nghiên cứu là tiền đề quan trọng để ứng dụng vi khuẩn phân giải cellulose vào trong xử lý cành Thanh long thải bỏ. |
| Ngày hoàn thiện:  | 18/6/2025  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Ngày đăng:        | 18/6/2025  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| TỪ KHÓA           |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Cellulose         |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Gen 16S rRNA      |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Thanh long        |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Vi khuẩn          |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Tỉnh Vĩnh Long    |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11552>

\* Corresponding author. Email: chinty@vlute.edu.vn

## 1. Giới thiệu

Thanh long (*Hylocereus costaricensis*) là loại cây ăn trái dễ trồng, cho năng suất cao, có khả năng chịu hạn và thích nghi với nhiều loại đất canh tác [1]. Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (Bộ NN-PTNT) [2], từ năm 2010-2020, diện tích trồng Thanh long tăng 15,1%/năm, tương ứng 4.600 ha/năm. Trong đó, diện tích trồng Thanh long đạt cao nhất là 65.000 ha vào năm 2020. Đến cuối năm 2023, Việt Nam có 55.000 ha Thanh long và sản lượng trên 1,2 triệu tấn. Hiện tại, thanh long được trồng rộng rãi và tập trung ở các tỉnh Bình Thuận, Long An và Tiền Giang [2]. Theo “Đề án Phát triển cây ăn quả chủ lực đến năm 2025 và tầm nhìn năm 2030” của Bộ NN-PTNT [3], Thanh long được xác định là một trong 14 loại trái cây chủ lực, phấn đấu đến năm 2025, diện tích trồng Thanh long không quá 60.000 ha và đến năm 2030 không quá 65.000 ha và sản lượng duy trì khoảng 1,3-1,5 triệu tấn.

Ở Việt Nam, trong những năm qua, do việc đẩy mạnh sản xuất trái vụ nên cây Thanh long có thể cho thu hoạch quanh năm đã dẫn đến giá trị xuất khẩu Thanh long liên tục tăng từ 57,15 triệu USD năm 2010 lên đến trên 100 triệu USD năm 2011 và vượt mốc 1 tỷ USD từ năm 2017-2020. Đồng thời, Thanh long là sản phẩm chiếm tỷ trọng chủ yếu, trên 30% giá trị xuất khẩu của ngành rau quả liên tục từ năm 2015-2020. Ngoài thị trường chính là Trung Quốc, Thanh long Việt Nam đã xuất khẩu sang các quốc gia như Mỹ, Úc, EU, Canada, Hàn Quốc, Thái Lan, New Zealand, Ấn Độ và Nhật Bản [2]. Ở tỉnh Vĩnh Long, cây Thanh long cũng đang được phát triển do cây có đặc tính dễ trồng, mang lại năng suất cao và thích hợp với điều kiện đất. Việc mở rộng diện tích đã làm cho người trồng Thanh long đang phải đối mặt khó khăn là cành Thanh long thải bỏ với thành phần chính là cellulose rất chậm phân hủy tự nhiên cũng như nguy cơ lây lan mầm bệnh tiềm ẩn từ những cành hư thối. Do đó, việc cần thiết là phải xử lý nguồn phụ phẩm này do đây là một nguồn hữu cơ rất có lợi cho cây trồng.

Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy nhiều nhóm vi sinh vật trong đất có thể phân hủy cellulose [4], [5]. Nghiên cứu của Shareef và cộng sự [6] đã phân lập vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân hủy cellulose từ đất. Khoirunnisa và cộng sự [7] cũng đã phân lập nhiều chủng vi khuẩn có thể phân hủy cellulose cao từ rơm rạ. Ở Việt Nam, nhiều nghiên cứu đã phân lập vi khuẩn phân hủy cellulose từ các nguồn khác nhau như đất trồng lúa [8], bãi rác và xương mùn cưa [9], từ ruột mối [10]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho thấy các phế phẩm nông nghiệp như rơm rạ có thể được xử lý với vi khuẩn phân hủy cellulose để làm phân bón sinh học [11], [12]. Bên cạnh đó, việc sử dụng phân bón sinh học đã được chứng minh giảm được chi phí sản xuất đem lại hiệu quả kinh tế cao, tăng năng suất và chất lượng cho cây trồng, tăng sức chống chịu sâu bệnh, nâng cao độ an toàn của thực phẩm cũng như góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường [13], [14]. Tuy nhiên, nghiên cứu về vi khuẩn phân giải cellulose từ đất trồng Thanh long vẫn chưa có nhiều báo cáo. Cho đến nay, chỉ tìm được báo cáo của Nguyễn Thị Ngọc Trúc [15] là đề cập đến vi khuẩn phân giải cellulose từ cành Thanh long. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện là rất cần thiết nhằm tìm ra các chủng vi khuẩn bản địa có hoạt tính phân giải cellulose trong đất. Kết quả nghiên cứu là tiền đề để ứng dụng vi khuẩn phân giải cellulose vào trong xử lý cành Thanh long thải bỏ.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu và phương pháp thu mẫu phân lập vi khuẩn

Để phân lập vi khuẩn phân giải cellulose, mẫu đất được thu ở những vườn trồng Thanh long ở 2 huyện Long Hồ và Vũng Liêm, tỉnh Vĩnh Long. Mẫu đất được thu ở độ sâu từ 0 - 15 cm xung quanh rễ cây thanh long. Mẫu đất được thu ở 5 vị trí khác nhau trong cùng 1 vườn. Mẫu sau khi chuyển về phòng thí nghiệm được phơi khô, nghiền mịn, sau đó trộn lại và sử dụng để phân lập vi khuẩn.

### 2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn phân giải cellulose

Vi khuẩn phân giải cellulose được phân lập từ mẫu đất dựa theo phương pháp của Maravi và cộng sự [16] và Bhagat và cộng sự [17]. Đầu tiên, mẫu đất (10 g) được đồng nhất với 90 mL nước

cất vô trùng trên máy lắc ở vận tốc 120 vòng/phút trong thời gian 24 giờ. Mẫu sau đó được pha loãng đến nồng độ  $10^{-6}$ . Mẫu ở mỗi độ pha loãng (100  $\mu$ L) được trải lên đĩa chứa môi trường CMC (carboxymethyl cellulose) có thành phần: 1 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,001 g/L NaCl; 10 g/L CMC (pH 7,0) [18]. Các đĩa được ủ 2-3 ngày ở 37 °C cho đến khi khuẩn lạc phát triển. Sau cùng, khuẩn lạc được làm thuần trên môi trường CMC và được trữ trong glycerol (20% v/v) ở -40 °C. Trước khi trữ mẫu, vi khuẩn thuần được kiểm tra đặc điểm hình thái khuẩn lạc và các đặc điểm sinh lý, sinh hóa như nhuộm Gram, nhuộm bào tử, tính di động, phản ứng oxidase và catalase [19].

### 2.3. Phương pháp xác định hoạt tính phân giải cellulose của vi khuẩn phân lập

Khả năng phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn phân lập được xác định theo nghiên cứu [10]. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB lỏng (Tryptic Soy Broth medium, Himedia, India) với thành phần: 1,5 g/L cao nấm men; 1,5 g/L cao thịt; 5,0 g/L pepton; 5,0 g/L NaCl trên máy lắc ở vận tốc 120 vòng/phút trong thời gian 24 giờ. Dịch nuôi vi khuẩn sau đó được ly tâm ở vận tốc 10.000 vòng/phút trong thời gian 5 phút để thu dịch enzyme ngoại bào. Dịch trong sau khi ly tâm được bổ sung vào các giếng được tạo sẵn trên môi trường CMC và sau đó ủ qua đêm ở nhiệt độ 30 °C. Các đĩa sau đó được nhuộm bằng dung dịch Congo đỏ (1 g/L) trong 15 phút và rửa lại với NaCl 1M. Vòng sáng (halo) hay vòng phân giải cellulose xuất hiện xung quanh giếng cho thấy dịch nuôi cấy vi khuẩn chứa enzyme có khả năng phân giải cellulose. Đường kính vòng phân giải cellulose (R) được tính như sau:

$$R = D - d \quad (1)$$

Trong đó, D là đường kính vòng halo (bao gồm đường kính giếng, mm) và d là đường kính của giếng (6 mm).

### 2.4. Đánh giá khả năng phân giải cạnh Thanh long

Bốn chủng vi khuẩn TL6, TL10, TL12 và TL15 có hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất được chọn để đánh giá khả năng phân giải cạnh Thanh long dựa theo phương pháp của Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Diệp [20]. Đầu tiên, vi khuẩn được nuôi tăng sinh qua đêm ở nhiệt độ 30 °C trong môi trường TSB trên máy lắc ở vận tốc 110 vòng/phút. Sinh khối được thu nhận sau khi ly tâm dịch tăng sinh vi khuẩn ở vận tốc 10.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút ở 10 °C. Sinh khối vi khuẩn được hòa tan và rửa lại với nước muối sinh lý 3 lần. Nếu dịch huyền phù vi khuẩn có độ đục tương đương với ống chuẩn MacFarland 0,5 thì mật độ vi khuẩn là  $10^8$  CFU/mL. Sau đó, dịch huyền phù được pha loãng để đạt mật độ  $10^6$  CFU/mL. Cạnh Thanh long được cắt nhỏ thành các đoạn có kích thước 1-2 cm, sau đó sấy khô ở nhiệt độ 105 °C đến trọng lượng không đổi và xay mịn, tiệt trùng rồi cho 1 g vào ống falcon chứa 30 mL môi trường LB (Luria-Bertani: 10 g/L peptone; 5,0 g/L NaCl; 5,0 g/L cao nấm men) hoặc NB (Nutrient Broth: 1,5 g/L cao thịt bò; 5,0 g/L peptone; 5,0 g/L NaCl; 1,5 g/L cao nấm men) bổ sung chủng vi khuẩn ở mật độ  $10^6$  CFU/mL. Cạnh Thanh long sau khi xử lý được sấy khô ở nhiệt độ 105 °C đến trọng lượng không đổi. Khả năng phân giải cạnh Thanh long được đánh giá bằng cách cân khối lượng cơ chất sau 15 ngày chủng vi khuẩn - khối lượng cơ chất ban đầu (chưa xử lý). Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không bổ sung vi khuẩn.

### 2.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt tính phân giải cellulose của vi khuẩn

#### 2.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính phân giải cellulose của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn TL6 có hoạt tính phân giải cạnh Thanh long mạnh nhất được chọn để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng phân giải cellulose. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường NB lỏng trên máy lắc ở vận tốc 120 vòng/phút trong thời gian 24 giờ. Các giá trị nhiệt độ được điều chỉnh trong thời gian lắc là 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C và 55 °C. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng phân giải cellulose được thực hiện tương tự như các bước được trình bày ở mục 2.4 với mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

### 2.5.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính phân giải cellulose của vi khuẩn

Vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose ở nhiệt độ cao nhất ở thí nghiệm trên được chọn để đánh giá ảnh hưởng của pH lên khả năng phân giải cellulose. Tương tự, vi khuẩn cũng được nuôi trong môi trường NB lỏng được điều chỉnh pH là 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 và 9,0. Vi khuẩn sau đó được đặt trên máy lắc ở vận tốc 120 vòng/phút trong thời gian 24 giờ. Ảnh hưởng của pH lên khả năng phân giải cellulose sau đó được thực hiện tương tự như các bước được trình bày ở mục 2.4 với mỗi nghiệm thức cũng được lặp lại 3 lần.

### 2.6. Định danh vi khuẩn phân giải cellulose

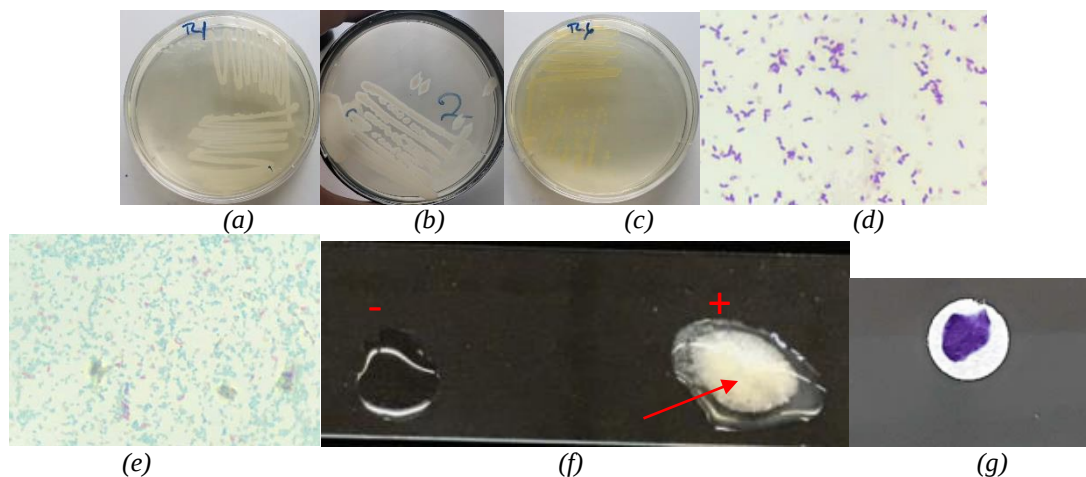
Vi khuẩn phân giải cellulose được định danh bằng trình tự gen 16S rRNA sử dụng phản ứng PCR với cặp mồi 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' và 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' [21]. ADN vi khuẩn được phân lập bằng kit iVAaDNA Extraction P (Thermo Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thành phần phản ứng PCR gồm: 12,5  $\mu$ L iStandard iVAPCR Master Mix; 9,5  $\mu$ L nước cất 2 lần; 0,5  $\mu$ L mồi 27F (25 pmol); 0,5  $\mu$ L mồi 1492R (25 pmol); 2  $\mu$ L ADN mẫu. Chu trình nhiệt được thực hiện như sau: biến tính ban đầu ở 94 °C trong 5 phút, sau đó thực hiện 30 chu kỳ gồm biến tính ở 94 °C trong 1 phút, gắn mồi ở 63 °C trong 1 phút, kéo dài ở 72 °C trong 2 phút và giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm PCR (1.500 bp) được phân tích bằng cách điện di trong gel agarose 1,5% và gửi giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Trình tự được phân tích bằng BLASTn trên NCBI và lập cây phân loại để xác định mối quan hệ di truyền của loài bằng phần mềm MEGA X.

### 2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu và đồ thị thí nghiệm được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và xử lý bằng phần mềm thống kê MiniTab 20.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Phân lập vi khuẩn



**Hình 1.** Kết quả phân lập vi khuẩn từ các mẫu đất trồng thanh long ở tỉnh Vĩnh Long

Chú thích: a, b, c) Khuẩn lạc chủng TL1, TL2 và TL6 phân lập từ đất trồng Thanh long phân lập trên môi trường CMC; d) Kết quả nhuộm Gram chủng TL6 (100X); e) Kết quả nhuộm bào tử chủng TL6 (bào tử màu xanh, 100X); f) Kết quả kiểm tra hoạt tính catalase của chủng TL6 (-: âm tính, +: dương tính có hiện tượng sủi bọt khí, mũi tên); g) Kết quả kiểm tra hoạt tính oxydase của chủng TL6 (đĩa giấy chuyển sang màu tím)

Tổng số 16 chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất trồng Thanh long ở 2 huyện Vũng Liêm và Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long. Kết quả cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn phân lập có màu trắng đục và vàng nhạt, hình dạng khuẩn lạc tròn và không đều, bìa răng cưa và bìa nguyên, độ nổi mô và đường kính khuẩn lạc dao động từ 2-6 mm (Hình 1a, b, và c; Bảng 1). Kết quả kiểm

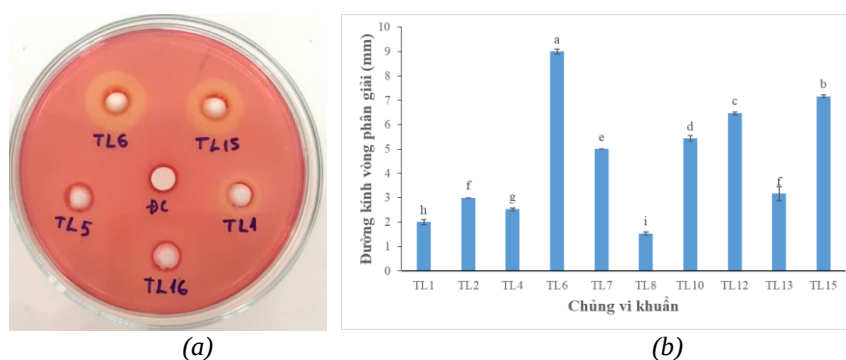
tra cho thấy phần lớn các chủng vi khuẩn phân lập là vi khuẩn Gram dương, có hình que (Hình 1d; Bảng 1). Chúng có khả năng di động và phản ứng dương tính với catalase (Hình 1f) và oxidase (Hình 1g). Như vậy, các đặc điểm vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu tương tự với báo cáo của Nguyễn Thị Thu Thủy [12] đã phân lập vi khuẩn phân giải cellulose của tác giả cũng có viền răng cưa màu sắc có màu trắng đục, hồng và vàng.

**Bảng 1.** Đặc điểm hình thái và sinh hóa các chủng vi khuẩn phân giải cellulose phân lập từ đất trồng Thanh long

| Chủng vi khuẩn | Đặc điểm hình thái vi khuẩn |           |          |        | Nhuộm Gram | Bào tử | Oxydase | Catalase |
|----------------|-----------------------------|-----------|----------|--------|------------|--------|---------|----------|
|                | Màu sắc                     | Hình dạng | Bia      | Độ nổi |            |        |         |          |
| TL1            | Trắng đục                   | Tròn      | Răng cưa | Mô     | Gram âm    | -      | -       | +        |
| TL2            | Vàng nhạt                   | Không đều | Răng cưa | Mô     | Gram âm    | -      | +       | +        |
| TL3            | Vàng nhạt                   | Tròn      | Răng cưa | Mô     | Gram âm    | -      | -       | -        |
| TL4            | Trắng đục                   | Không đều | Răng cưa | Mô     | Gram âm    | -      | +       | +        |
| TL5            | Vàng nhạt                   | Tròn      | Nguyên   | Mô     | Gram âm    | -      | -       | +        |
| TL6            | Vàng nhạt                   | Tròn      | Răng cưa | Mô     | Gram dương | +      | +       | +        |
| TL7            | Trắng đục                   | Không đều | Nguyên   | Mô     | Gram âm    | -      | -       | +        |
| TL8            | Vàng nhạt                   | Tròn      | Nguyên   | Mô     | Gram âm    | -      | -       | -        |
| TL9            | Vàng nhạt                   | Tròn      | Nguyên   | Mô     | Gram âm    | -      | +       | +        |
| TL10           | Vàng nhạt                   | Tròn      | Nguyên   | Mô     | Gram âm    | -      | +       | +        |
| TL11           | Trắng đục                   | Tròn      | Răng cưa | Mô     | Gram âm    | -      | +       | +        |
| TL12           | Trắng đục                   | Không đều | Răng cưa | Mô     | Gram âm    | -      | -       | +        |
| TL13           | Trắng đục                   | Không đều | Nguyên   | Mô     | Gram dương | +      | +       | +        |
| TL14           | Trắng đục                   | Không đều | Nguyên   | Mô     | Gram dương | +      | +       | -        |
| TL15           | Trắng đục                   | Không đều | Nguyên   | Mô     | Gram âm    | -      | -       | +        |
| TL16           | Trắng đục                   | Tròn      | Răng cưa | Mô     | Gram dương | +      | +       | +        |

+: dương tính; -: âm tính

### 3.2. Hoạt tính phân giải cellulose của vi khuẩn



**Hình 2.** Hoạt tính phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn phân lập:

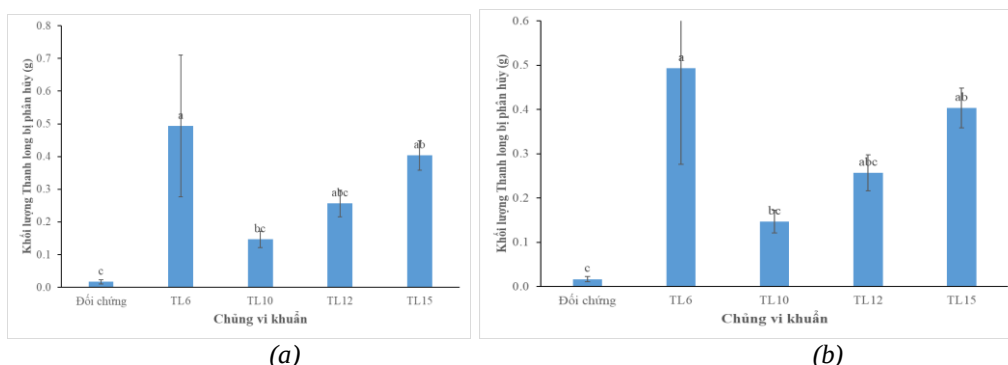
a) Hoạt tính phân giải cellulose được xác định bằng thuốc nhuộm Congo đỏ; b) Sự khác biệt về đường kính phân giải cellulose (trung bình của 3 lần lặp lại  $\pm$  độ lệch chuẩn) của các chủng vi khuẩn (các chữ cái khác nhau trên mỗi cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê,  $p \leq 0,05$ )

Kết quả nhuộm Congo đỏ cho thấy 10/16 chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải cellulose (Hình 2). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy đường kính vòng phân giải cơ chất CMC của các chủng vi khuẩn dao động từ 2-9 mm, trong đó chủng TL6 có đường kính cao nhất là  $9,0 \pm 0,10$  mm, tiếp theo là chủng TL15 có đường kính  $7,17 \pm 0,06$  mm, chủng TL12 ( $6,47 \pm 0,06$  mm) và thấp nhất là chủng TL1 với đường kính vòng phân giải là  $2,0 \pm 0,10$  mm. Như vậy, đường kính vòng phân giải của các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Mai Thị và cộng sự [22] cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập từ sùng (*Holotrichia parallela*) và trùn đất (*Lubricus terrestris*) có vòng phân giải là 22,6 mm và 23,8 mm. Kết quả này có thể do sự khác biệt về chủng vi khuẩn và điều kiện môi trường sống của vi khuẩn.

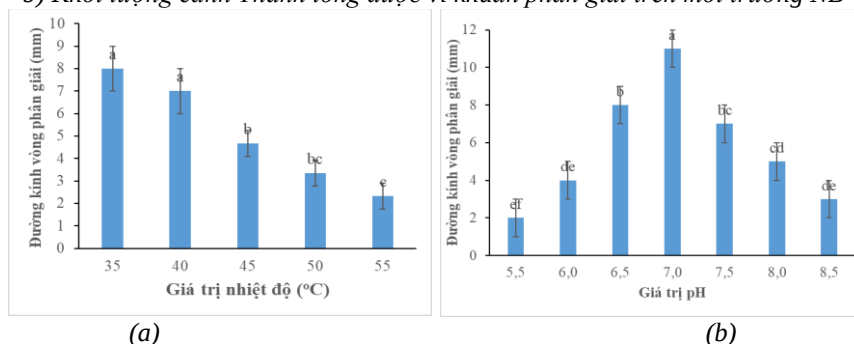
### 3.3. Khả năng phân giải cành Thanh long của các chủng vi khuẩn trên môi trường LB và NB

Trên môi trường LB, kết quả khảo sát cho thấy chủng TL6 có khả năng phân giải cành Thanh long cao nhất (0,37 g) với hiệu quả xử lý là 37%, kế đến là các chủng TL10 và TL15 với 0,32 g (32%) và 0,24 g (24%). Chủng TL12 có khả năng phân giải cành Thanh long thấp nhất (0,19 g, 19%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại (Hình 3a). Trong khi đó, trên môi trường NB cũng cho thấy chủng TL6 có khả năng phân giải cành Thanh long cao nhất (0,43 g) với hiệu quả xử lý là 43%, kế đến là các chủng TL15 và TL12 với kết quả lần lượt là 0,40 g (40%) và 0,26 g (26%). Chủng TL10 có khả năng phân giải cành Thanh long thấp nhất (0,15 g, 15%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại (Hình 3b). Như vậy, tỷ lệ phân giải cành Thanh long của các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này là thấp hơn nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Trúc [15] cho thấy các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cành Thanh long trên 75%. Sự khác biệt này có thể do sự khác biệt về điều kiện và thành phần môi trường nuôi cấy được sử dụng để đánh giá cũng như sự khác nhau về chủng vi khuẩn.

### 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt tính phân giải cellulose của vi khuẩn



**Hình 3.** Khả năng phân giải cành Thanh long trên 2 môi trường LB và NB của các chủng vi khuẩn phân lập  
 Chủ thích: a) Khối lượng cành Thanh long được vi khuẩn phân giải trên môi trường LB;  
 b) Khối lượng cành Thanh long được vi khuẩn phân giải trên môi trường NB



**Hình 4.** Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính phân giải cellulose của chủng TL6:

- a) Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính phân giải cellulose của chủng TL6;  
 b) Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính phân giải cellulose của chủng TL6

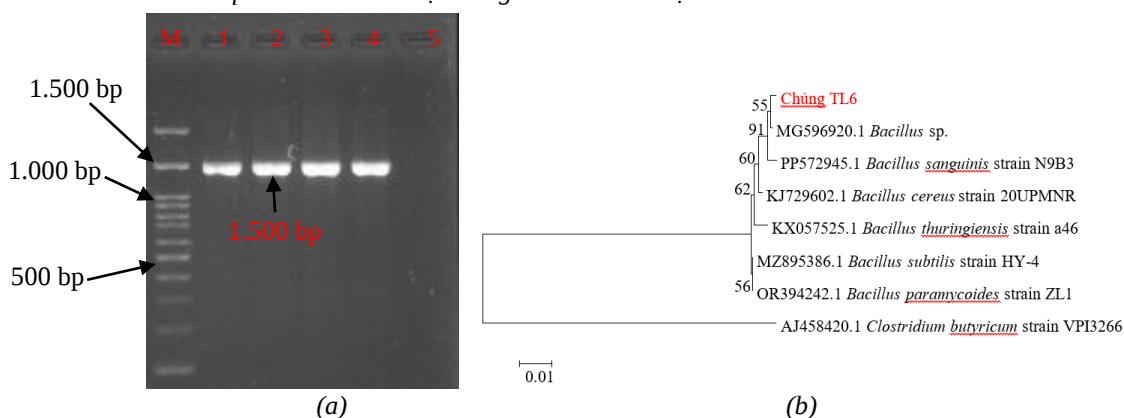
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính phân giải cellulose của chủng vi khuẩn TL6 cho thấy vi khuẩn có hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất ở nhiệt độ 35 °C và 40 °C. Trong khi ở nhiệt độ 45 °C, 50 °C và 55 °C thì hoạt tính phân giải của chủng vi khuẩn giảm (Hình 4a). Đối với ảnh hưởng của pH, kết quả khảo sát cho thấy chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải cellulose ở pH dao động 5,0 - 8,5, cụ thể chủng vi khuẩn thể hiện hoạt tính phân giải cellulose cao nhất ở pH 6,5 - 7,5 với đường kính vòng halo là 9 mm, trong khi ở pH 4,0 và pH 8,0 thì chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải cellulose thấp nhất. Ngoài ra, chủng vi khuẩn không thể hiện hoạt tính phân giải cellulose ở pH 4,0; 4,5; 5,0 và 9,0 (Hình 4b).

### 3.5. Định danh vi khuẩn phân giải cellulose sử dụng trình tự gen 16S rRNA

Kết quả điện di cho thấy 4 chủng đại diện (các chủng có hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất chọn từ mẫu đất trồng Thanh long) đều khuếch đại được gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR với kích thước sản phẩm PCR là 1.500 bp (Hình 5). Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng TL6 (chủng này được chọn do có khả năng phân giải cành Thanh long mạnh nhất trên 2 môi trường LB và NB) có chiều dài là 939 nucleotide, tương đồng 98,82% với vi khuẩn *Bacillus* sp. (MG596920.1) và *B. cereus* chủng 20UPMNR (KJ729602.1), tương đồng 98,31% với *B. sanguinis* chủng N9B3 (PP572945.1), 99,03% với *B. thuringiensis* chủng a46 (KX057525.1), 98,61% với *B. subtilis* chủng HY-4 (MZ895386.1) và *B. paramycoides* chủng ZL1 (OR394242.1) trên GenBank (Hình 5). Cây phả hệ cho thấy chủng TL6 thuộc cùng nhóm với các loài vi khuẩn *Bacillus* (Hình 6). Như vậy, qua cây phả hệ, giải trình tự gen và kết hợp với các đặc điểm sinh lý, sinh hóa đã khẳng định chủng vi khuẩn TL6 phân lập thuộc giống *Bacillus*.

| Description                                                                                                                             | Scientific Name                               | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain JSB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>    | <a href="#">Bacillus sp. (in: firmicutes)</a> | 1670      | 1670        | 99%         | 0.0     | 98.62%     | 1049     | <a href="#">MG596917.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain JSB10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>   | <a href="#">Bacillus sp. (in: firmicutes)</a> | 1668      | 1668        | 99%         | 0.0     | 98.82%     | 1057     | <a href="#">MG596920.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain MNB1 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> | <a href="#">Bacillus sp. (in: firmicutes)</a> | 1664      | 1664        | 98%         | 0.0     | 98.82%     | 1456     | <a href="#">MK490781.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain LMRE66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>  | <a href="#">Bacillus sp. (in: firmicutes)</a> | 1664      | 1664        | 98%         | 0.0     | 98.82%     | 1402     | <a href="#">MK571700.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain YIM38-YJ5_10-40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>     | <a href="#">Bacillus cereus</a>               | 1664      | 1664        | 99%         | 0.0     | 98.52%     | 1059     | <a href="#">MZ674049.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain 20UPMNR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>             | <a href="#">Bacillus cereus</a>               | 1664      | 1664        | 98%         | 0.0     | 98.82%     | 1499     | <a href="#">KJ729602.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain MNB1 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> | <a href="#">Bacillus sp. (in: firmicutes)</a> | 1664      | 1664        | 98%         | 0.0     | 98.82%     | 1457     | <a href="#">MK490785.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain MNB2 29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> | <a href="#">Bacillus sp. (in: firmicutes)</a> | 1664      | 1664        | 98%         | 0.0     | 98.82%     | 1461     | <a href="#">MK480030.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain SKV-VPMM-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>          | <a href="#">Bacillus cereus</a>               | 1661      | 1661        | 99%         | 0.0     | 98.62%     | 1215     | <a href="#">MZ771291.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain CGNE-67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>             | <a href="#">Bacillus cereus</a>               | 1661      | 1661        | 99%         | 0.0     | 98.31%     | 1267     | <a href="#">OL697787.1</a> |

Hình 5. Kết quả so sánh trình tự chủng TL6 với trình tự của vi khuẩn *Bacillus* trên GenBank



Hình 6. a) Kết quả khuếch đại gen 16S rRNA của vi khuẩn phân giải cellulose bằng kỹ thuật PCR (M: thang chuẩn; Giếng 1-5: thứ tự các chủng vi khuẩn TL6, TL10, TL12 và TL15; Giếng 5: đối chứng âm; b) Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn phân giải cellulose

## 4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 10/16 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose, trong đó chủng TL6 thể hiện hoạt tính phân giải mạnh nhất. Các chủng vi khuẩn TL6, TL10, TL12 và TL15 đều có khả năng phân giải cành Thanh long trên môi trường NB và LB sau 15 ngày với hiệu suất hiệu quả phân giải lần lượt là 15-43% và 19-38%. Nghiên cứu cho thấy giá trị pH và nhiệt độ thích hợp cho chủng vi khuẩn TL6 thể hiện hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất lần lượt là 6,5 - 7,5 và 35 - 40 °C. Dựa vào các đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân tích phả hệ dựa trên trình tự gen 16S rRNA đã xác định chủng TL6 thuộc giống *Bacillus* sp. Nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn phân lập được để phân hủy cành Thanh long thải bỏ. Tuy nhiên, cần đánh giá thêm ảnh hưởng của nguồn carbon cũng như nguồn nitơ lên hoạt tính phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] R. Al-Qthanin, A. M. M. E. Salih, F. M. A. Alhafidh, S. A. M. Almoghran, G. A. Alshehri, and N. H. Alahmari, "Assessing the suitability of pitaya plant varieties for cultivation in the arid climate of Saudi Arabia," *Heliyon*, vol. 10, no. 1, 2024, Art. no. e21651.
- [2] T. Nguyen, "Do not increase dragon fruit area, prioritize improving quality," (In Vietnamese), 2024. [Online]. Available: <https://nongnghiepmoitruong.vn/tri-thuc-nong-dan/khong-tang-dien-tich-thanh-long-uu-tien-nang-chat-luong-d379142.html>. [Accessed Nov. 04, 2024].
- [3] Minister of Agriculture and Rural Development, *Decision No. 4085/QĐ-BNN-TT dated October 27, 2022 to approve a plan on developing key fruit trees by 2025 and 2030*, (In Vietnamese), 2022.
- [4] T. Bhatia, D. Bose, D. Sharma, and D. Patel, "A Review on Cellulose Degrading Microbes and its Applications," *Industrial Biotechnology*, vol. 20, no. 1, pp. 26-39, 2024.
- [5] R. Datta, "Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review," *Heliyon*, vol. 10, no. 1, 2024, Art. no. e24022.
- [6] I. Shareef, S. M. Gopinath, M. Satheesh, and S. X. Christopher, "Isolation and identification of cellulose degrading microbes," *International Journal of Web Engineering and Technology*, vol. 4, no. 8, pp. 6798-6793, 2015.
- [7] N. S. Khoirunnisa, S. Anwar, and D. A. Santosa, "Isolation and selection of cellulolytic bacteria from rice straw for consortium of microbial fuel cell," *Biodiversitas*, vol. 21, no. 4, pp. 1686-1696, 2020.
- [8] H. D. Tran, V. H. Huynh, D. D. Tran, and T. C. Nguyen, "Isolation of cellulose-degrading microbes for rice straw decomposition," (in Vietnamese), *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 60, no. 6, pp. 32-36, 2018.
- [9] T. T. T. Nguyen, T. L. Nguyen, and T. D. Tran, "Isolation, screening and identification of microorganisms capable of degrading cellulose to microbial organic fertilizer," (in Vietnamese), *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, vol. 127, no. 3A, pp. 117-127, 2018.
- [10] T. P. Ngo, H. V. Duong, and N. D. Cao, "Cellulose degrading ability of bacterial strains isolated from gut of termites in Vinh Long province-Vietnam," *Chemical Engineering Transactions*, vol. 88, pp. 1315-1320, 2021.
- [11] E. Simo, L. Fonseca, C. Uchima, J. Cota, G. H. Goldman, M. Saloheimo, V. Sacon, and M. Siika-aho, "Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries," *Biotechnol for Biofuels*, vol. 10, 2017, Art. no. 30.
- [12] Q. H. Dang, and T. T. T. Nguyen, "Isolation, screening and identification of effective microbial strains to make bio-organic fertilizer from organic solid waste," (in Vietnamese), *The University of Danang - Journal of Science and Technology*, vol. 20, no. 5, pp. 56-61, 2022.
- [13] D. Bhardwaj, M. W. Ansari, R. K. Sahoo, and N. Tuteja, "Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity," *Microbial cell factories*, vol. 13, no. 66, pp. 1-10, 2014.
- [14] P. Chaudhary, S. Singh, A. Chaudhary, A. Sharma, and G. Kumar, "Overview of biofertilizers in crop production and stress management for sustainable agriculture," *Frontiers in Plant Science*, vol. 13, pp. 1-21, 2022.
- [15] T. N. T. Nguyen, "Isolation, screening and identification the cellulose degrading bacteria from pitaya clades," (in Vietnamese), *Vietnam Academy of Agricultural Sciences*, 2015.
- [16] P. Maravi and A. Kumar, "Isolation, screening and identification of cellulolytic bacteria from soil," *Biotechnology Journal International*, vol. 24, no. 1, pp. 1-8, 2020.
- [17] S. A. Bhagat and S. S. Kokitkar, "Isolation and identification of bacteria with cellulose-degrading potential from soil and optimization of cellulase production," *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, vol. 9, no. 6, pp. 154-161, 2021.
- [18] H. T. D. Nguyen, T. P. Ngo, T. B. N. Pham, and T. V. Bui, "Determination of carboxymethyl cellulose and cellulose degrading ability of microorganisms isolated from gut of termites collected in Mang Thit district, Vinh Long province, Vietnam," (in Vietnamese), *CTU Journal of Science*, vol. 58, Special issue on Natural Sciences, pp. 186-191, 2022.
- [19] J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Wiliam, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edition, Lippincott William and Wilkins, Baltimore, USA, 1994.
- [20] V. P. Q. Vo and N. D. Cao, "Isolation and identification of cellulolytic bacteria," *CTU University Journal of Science*, vol. 2011, no. 18a, pp. 177-184, 2011.
- [21] H. Heuer, M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, and E. M. Wellington, "Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 8, pp. 3233-3241, 1997.
- [22] T. Mai, H. H. Nguyen, and N. T. Duong, "Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from *Holotrichia parallela* and *Lubricus terrestris*," (in Vietnamese), *CTU Journal of Science*, vol. 2017, no. 50, pp. 81-90, 2017.