



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.044

PHÂN LẬP, NHẬN DIỆN VI KHUẨN PHÂN HỦY TINH BỘT TỪ RÁC HỮU CƠ, RUỘT SÙNG (*Holotrichia parallela*) VÀ TRÙN ĐẤT (*Lubricus terrestris*)

Mai Thi^{1*}, Nguyễn Hữu Hiệp² và Chế Minh Ngũ³

¹Nghiên cứu sinh chuyên ngành Vi sinh vật, Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

³Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Mai Thi (email: maithi75@gmail.com)

ABSTRACT

This research was carried out with the purpose of isolation and selection of promising indigenous starch-degrading bacteria in order to treat starch waste from starch processing factories. For that objective, the traditional techniques and modern molecular techniques were used for the isolation and identification of starch degrading bacterial strains from the organic wastes landfills, guts of *Holotrichia parallela* and *Lubricus terrestris*. The study's result performed that there were 58 bacterial strains isolated on 1% starch agar. Most of the them were rod-shaped, motile, Gram positive, endo-spore forming, positive in catalase as well as Methyl red test. Through the experiment evaluating the ability of starch degradation, 57/58 bacterial trains performed the secretions of amylase enzyme to break down starch in agar medium to form clear zones when dyeing with Lugol's solution. Of these, five promising strains RB8, RB17, SB25, TB6 and TB16 were selected for sequencing 16S rRNA gene and identified as *Bacillus flexus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* and *Bacillus flexus*, respectively.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn bản địa phân hủy tinh bột triển vọng để xử lý chất thải từ các cơ sở chế biến tinh bột. Để hoàn thành mục tiêu đó, các kỹ thuật truyền thống cũng như kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đã được sử dụng để phân lập và định danh các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột từ các bãi rác hữu cơ, ruột sùng (*Holotrichia parallela*) và trùn đất (*Lubricus terrestris*). Kết quả có 58 dòng vi khuẩn đã được phân lập trên môi trường tinh bột 1% và đa số chúng có tế bào hình que, có khả năng chuyển động, Gram dương, tạo bào tử, sinh catalase và sinh acid. Qua thí nghiệm khảo sát khả năng phân hủy tinh bột, có 57/58 dòng tiết ra enzyme amylase để phân hủy tinh bột tạo thành vòng sáng rõ rệt khi nhuộm với dung dịch Lugol. Trong đó, 5 dòng phân hủy tinh bột triển vọng RB8, RB17, TB6, SB16 và SB25 đã được chọn để giải trình tự gene 16S rRNA và định danh theo thứ tự là *Bacillus flexus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* và *Bacillus flexus*.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 19/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Isolation, identification of starch degrading bacteria from organic wastes, guts of *Holotrichia parallela* and *Lubricus terrestris*

Từ khóa:

Bacillus, enzyme amylase, phân hủy tinh bột, ruột sùng và trùn đất, xử lý chất thải

Keywords:

Bacillus, enzyme amylase, guts of *Holotrichia parallela* and *Lubricus terrestris*, starch-degrading, starch waste treatment

Trích dẫn: Mai Thi, Nguyễn Hữu Hiệp và Chế Minh Ngũ, 2019. Phân lập, nhận diện vi khuẩn phân hủy tinh bột từ rác hữu cơ, ruột sùng (*Holotrichia parallela*) và trùn đất (*Lubricus terrestris*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 57-64.

1 GIỚI THIỆU

Chuyển đổi phế phẩm có nguồn gốc thực vật theo hướng an toàn sinh học, rẽ tiền là giải pháp hữu dụng rất cần thiết trong thực tiễn đời sống xã hội hiện nay. Trong ba đại phân tử hữu cơ protein, cellulose và tinh bột thì tinh bột có thái lượng chỉ đứng sau cellulose, nên việc chuyển đổi chất thải tinh bột có trong rác hữu cơ, nước thải của các cơ sở sản xuất bún, bánh pía... được quan tâm thực hiện bằng nhiều biện pháp như xử lý sinh học chất thải tinh bột trước khi thải ra môi trường, chuyển đổi phế phẩm tinh bột thành nhiên liệu (còn) hoặc chế biến các phế phẩm ấy trong chăn nuôi gia súc... làm cho chất thải tinh bột trở nên hữu dụng và không gây ô nhiễm môi trường.

Để thực hiện được giải pháp nêu trên thì chìa khóa chính là sử dụng hệ enzyme amylase từ loại khuẩn được phân lập và phát triển từ chính nguồn chất thải tinh bột và một số côn trùng bản địa để chuyển đổi tinh bột thành đường glucose. Với lý do tìm kiếm những dòng vi khuẩn phân hủy tinh bột triển vọng, nghiên cứu “Phân lập, nhận diện vi khuẩn phân hủy tinh bột từ rác, ruột Sùng (*Holotrichia parallela*) và Trùn đất (*Lubricus terrestris*)” được thực hiện.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Ba mẫu rác hữu cơ và ba mẫu nước rỉ rác được thu từ mỗi bãi rác ở các huyện Trần Đề, Kế Sách và Ngã Năm thuộc tỉnh Sóc Trăng. Mẫu được lưu trữ trong chai thủy tinh vô trùng, trữ ở 4°C đến khi sử dụng.

Các mẫu sùng gồm 12 con có trọng lượng từ 2,5 g đến 15 g và các mẫu trùn đất gồm 12 con có trọng lượng từ 3 g đến 11 g được thu thập từ những đống rơm đang hoại mục ở huyện Ngã Năm, tỉnh Sóc Trăng. Những mẫu sùng đất và trùn đất được trữ trong thùng có chứa đất mùn hơi ẩm và rơm hoại mục làm thức ăn cho đến khi sử dụng.

Môi trường phân lập vi khuẩn phân hủy tinh bột gồm các thành phần K_2HPO_4 1,9 g/L, KH_2PO_4 0,94 g/L, KCl 1,6 g/L, NaCl 1,43 g/L, NH_4Cl 0,15 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,037 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,017 g/L, yeast extract 0,1 g/L, tinh bột gạo 10 g/L, pH 7,02 và agar 18g/L (Shengwei *et al.*, 2012). Cycloheximide (0,1 g/L) được thêm vào môi trường phân lập để kháng nấm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập vi khuẩn

Mẫu rác và nước rỉ rác được pha loãng với các độ pha loãng 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} và 10^{-5} . Sau đó trải

đều 0,1mL mẫu ở các nồng độ lên môi trường phân lập bằng que trải thủy tinh và ủ hiếu khí ở 30°C trong 72 giờ. Đối với sùng và trùn đất, mẫu được khử trùng bề mặt bằng cồn 70° trong 5 phút sau đó khử trùng bằng H_2O_2 3% trong 5 phút, mổ lấy ít ruột (khoảng một vòng que cấy) trải đều lên môi trường phân lập bằng que trải thủy tinh, ủ ở 30°C trong 72 giờ ở điều kiện hiếu khí. Khi khuẩn lạc phát triển, chọn những khuẩn lạc rời rạc để tách rông bằng phương pháp cấy ria trên môi trường phân lập (Shengwei *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012).

2.2.2 Khảo sát đặc điểm hình thái và sinh hóa của vi khuẩn

Khảo sát đặc điểm hình thái của vi khuẩn bao gồm đặc điểm khuẩn lạc, Gram, kích thước tế bào vi khuẩn (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2002), khả năng tạo bào tử (Nguyễn Lâm Dũng, 2006) và khả năng di động (Nguyễn Lâm Dũng, 2006).

Khảo sát đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn bao gồm khả năng sinh acid và khả năng sử dụng oxy của vi khuẩn (Nguyễn Lâm Dũng, 2006).

2.2.3 Khảo sát khả năng phân hủy tinh bột

Phương pháp giếng thạch được dùng để chọn ra những dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột triển vọng và có nguyên lý như sau: cơ chất tinh bột hòa tan tạo phức màu tím xanh với dung dịch Lugol và khi cơ chất này bị phân hủy bởi enzyme amylase của vi khuẩn thì sẽ tạo nên một vùng phân hủy xung quanh khuẩn lạc (không bắt màu) dễ dàng nhìn thấy bằng mắt thường (Alariya *et al.*, 2013). Khả năng phân hủy tinh bột (E) được đánh giá qua hiệu số giữa đường kính vòng sáng phân hủy (D) và đường kính khuẩn lạc (d) phát triển từ giếng ($E=D-d$). Giá trị E càng lớn thì vi khuẩn phân hủy tinh bột càng mạnh.

2.2.4 Xác định hoạt tính amylase

a. Thiết lập đường chuẩn glucose

Biểu đồ đường chuẩn glucose được lập dựa vào nồng độ glucose và các giá trị quang phổ (OD) (520 nm) tương ứng bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Phương trình đường chuẩn có dạng $y=ax+b$ với y là giá trị OD và x là nồng độ glucose (mM). Phương trình đường chuẩn dùng để xác định nồng độ đường khử sinh ra bởi sự phân hủy cơ chất tinh bột của enzyme amylase.

b. Xác định hoạt tính amylase

Nuôi vi khuẩn trong bình tam giác chứa môi trường sinh enzyme gồm các thành phần bacteriological peptone 6 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, tinh bột 1 g/L, trên máy lắc 150 vòng/phút trong 60 giờ (Ekunsanmi, 2009). Sau 60 giờ nuôi, trộn đều mẫu bằng máy Vortex và chuyển 10 mL dịch nuôi vi khuẩn vào ống nghiệm khác để

ly tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C; sau đó thu phần dịch bên trên, đó là dịch enzyme amylase thô.

Mẫu đối chứng được xử lý theo các bước: Thêm 1 mL dịch enzyme thô vào 1 mL đệm acetate 50 mM rồi đun nóng ở 100°C trong 10 phút; sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm 1 mL tinh bột 5% và ủ ở 45°C trong 60 phút. Sau khi ủ, hút 0,3 mL hỗn hợp cho vào ống nghiệm khác và thêm vào 0,15 mL thuốc thử đồng, đun sôi 10 phút và làm nguội đến nhiệt độ phòng. Tiếp tục thêm 0,15 mL thuốc thử asenomolybdate và 1 mL nước cất; ủ trong tối 20 phút ở nhiệt độ phòng; sau đó đo quang phổ (OD) ở bước sóng 520 nm. Dựa vào phương trình đường chuẩn để tính ra nồng độ đường khử có trong mẫu đối chứng.

Mẫu thí nghiệm được xử lý theo các bước: Thêm 1 mL dịch enzyme thô ($V_E = 1$ mL) vào 1 mL đệm acetate ($V_{\text{acetate}} = 1$ mL). Tiếp tục thêm 1 mL tinh bột 5% ($V_{\text{ddTB5\%}} = 1$ mL) và ủ ở 45°C trong thời gian (T) 60 phút. Sau khi ủ, hút 0,3 mL hỗn hợp cho vào ống nghiệm khác và thêm vào 0,15 mL thuốc thử đồng, đun sôi 10 phút và làm nguội đến nhiệt độ phòng. Tiếp tục thêm 0,15 mL thuốc thử asenomolybdate và 1 mL nước cất; ủ trong tối 20 phút ở nhiệt độ phòng; sau đó đo quang phổ (OD) ở bước sóng 520 nm. Dựa vào phương trình đường chuẩn để tính nồng độ đường khử sinh ra trong mẫu thí nghiệm.

Nồng độ đường khử sinh ra (X) bởi sự phân hủy tinh bột của endoglucanase là hiệu số giữa nồng độ đường khử trong mẫu thí nghiệm và mẫu đối chứng. Hoạt tính enzyme cellulase được tính theo công thức (Nelson, 1944):

$$U = \left(\frac{X \times V_R}{T \times V_E} \right) \times k$$

Trong đó :

U: hoạt tính enzyme (UI/mL);

X: là nồng độ đường khử sinh ra (mM);

T: là thời gian phản ứng (phút);

V_R : là thể tích hỗn hợp phản ứng (mL) ($V_E + V_{\text{ddTB5\%}} + V_{\text{acetate}}$);

V_E là thể tích enzyme (mL);

K: là hệ số pha loãng enzyme thô.

2.2.5 Khuếch đại đoạn gene 16S rRNA

Chọn những dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột triển vọng để khuếch đại đoạn gene 16S rRNA. Khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) với cặp môi 27F-1492R (Lane, 1991):

27F- 5'-AGAGTTTAGTCCTTGGCTCAG- 3'

1492R- 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT- 3'

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% với μ l chất nhuộm Safeview ($C_{21}H_{28}N_4$).

2.2.6 Giải trình tự đoạn gene 16S rRNA

Sản phẩm PCR được tinh sạch và kiểm tra nồng độ DNA sau khi tinh sạch và được giải trình tự bằng máy ABI PRISM 3130. Kết quả giải trình tự các dòng vi khuẩn được so sánh độ tương đồng với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng chương trình BLASTN để định danh chúng cùng với các đặc điểm hình thái, sinh hóa (Trần Nhân Dũng, 2011).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập

Ba mươi dòng vi khuẩn từ bãi rác đã được phân lập trên môi trường tinh bột 1% và được ký hiệu là RB1, RB2,...RB30. Đồng thời, cũng trên môi trường tinh bột 1%, 14 dòng vi khuẩn đã được phân lập từ ruột con sùng (ký hiệu là SB15, SB16,...SB28) và 14 dòng được phân lập từ ruột con trùn đất (ký hiệu là TB1, TB2,...TB14).

3.1.1 Đặc điểm hình thái và sinh hóa

Đa số các dòng vi khuẩn có dạng tròn (82,76%), màu trắng sữa (39,65%), bìa nguyên (74,14%), độ nổi lồi (50%) và đường kính khuẩn lạc dao động từ 0,5-2,5 mm.

Tế bào của 58 dòng vi khuẩn đều có dạng que trong đó dạng que ngắn chiếm đa số (89,66%) so với số ít dòng có tế bào que dài (10,34%). Tất cả các dòng vi khuẩn đều có khả năng di động khi nuôi trong môi trường thạch LB (Luria Broth agar). Chiều dài của tế bào vi khuẩn dao động trong khoảng 0,87-3,74 μ m và chiều dài ngang dao động trong khoảng 0,52-15 μ m. Số tế bào vi khuẩn có Gram dương là 36 dòng (62,07%) và số tế bào Gram âm là 22 dòng (37,93%). Có 36 dòng có khả năng tạo nội bào tử và những dòng này đều có tế bào dạng que và Gram dương.

Tất cả 58 dòng vi khuẩn đều có phản ứng dương tính với thuốc thử H_2O_2 , tức đều có khả năng sinh catalase. Trong khi, số dòng vi khuẩn sinh acid, tức làm đổi màu Methyl red thì ít hơn với 41 dòng.

3.1.2 Khả năng phân hủy tinh bột của các dòng vi khuẩn

c. Phân lập từ rác

Tất cả 30 dòng vi khuẩn phân lập từ rác đều tạo vòng sáng xung quanh khuẩn lạc trên môi trường tinh bột 1% (sau 72 giờ ủ ở 30°C) khi nhuộm với

dung dịch Lugol (Hình 1). Khả năng phân hủy tinh bột (E) của các dòng vi khuẩn dao động trong khoảng 1,57 đến 23,5 mm. Dòng RB8 phân hủy tinh bột mạnh nhất với giá trị E 23,5 mm; kế đến là dòng RB17 tương ứng với E 21,47 mm (Bảng 1). Hoạt

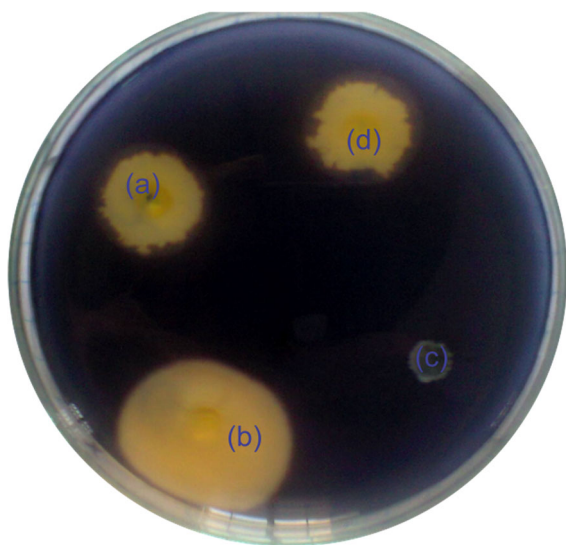
tính enzyme amylase của RB8 và RB17 tương ứng là 22,2 và 15,6 UI/mL (Bảng 2). Dựa theo khả năng phân hủy tinh bột, hai dòng này đã được chọn để giải trình tự đoạn gene 16S rRNA và định danh.

Bảng 1: Khả năng phân hủy tinh bột của 30 dòng vi khuẩn

Dòng	Khả năng phân hủy E (mm)	Dòng	Khả năng phân hủy E (mm)
RB8	23,50 ^a	RB27	10,27 ^{hi}
RB17	21,47 ^b	RB5	9,90 ^{ij}
RB30	20,50 ^c	RB18	9,87 ^{ij}
RB29	20,43 ^c	RB12	9,87 ^{ij}
RB24	20,10 ^c	RB10	9,73 ^{ij}
RB23	16,63 ^d	RB1	9,27 ^{ik}
RB22	16,63 ^d	RB11	8,97 ^k
RB21	16,37 ^d	RB26	8,10 ^l
RB25	15,20 ^e	RB14	7,77 ^l
RB28	13,57 ^f	RB16	6,90 ^m
RB3	13,50 ^f	RB20	6,87 ^m
RB2	13,37 ^f	RB19	6,83 ^m
RB9	11,90 ^g	RB15	6,43 ^m
RB13	10,77 ^h	RB7	2,90 ⁿ
RB6	10,30 ^{hi}	RB4	1,57 ^o

CV (%) = 3,73

Ghi chú: Giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$)



Hình 1: Vòng sáng phân hủy tinh bột

Vòng sáng thể hiện khả năng phân hủy bột của các dòng vi khuẩn RB8 (b), RB17 (a), RB30 (d) và dòng vi khuẩn không có khả năng phân hủy tinh bột (c)

Bảng 2: Hoạt tính enzyme amylase của hai dòng triển vọng

STT	Vi khuẩn	Hoạt tính amylase (UI/mL)
1	RB8	22,2
2	RB17	15,6

d. Phân lập từ ruột sùng và ruột trùn

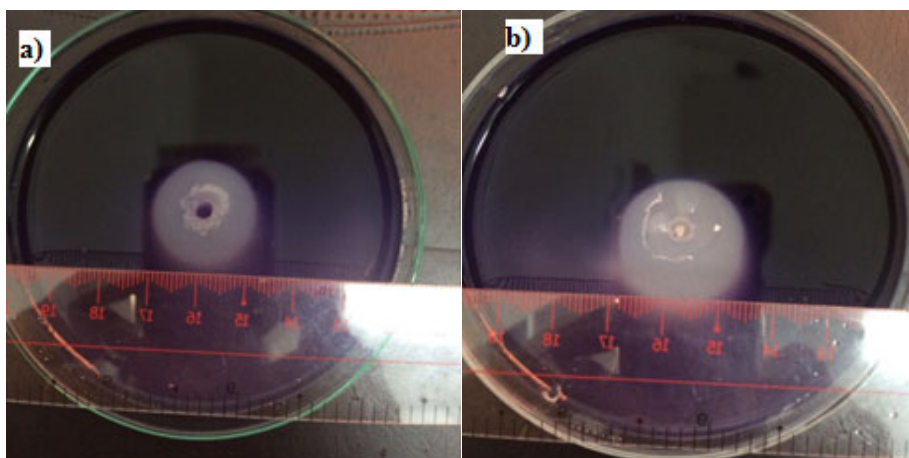
Dựa vào vòng sáng phân hủy khi nhuộm với dung dịch Lugol (Hình 2), có 27 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột với giá trị E dao động từ 5,7 mm đến 23,4 mm. Ba dòng SB25, TB6 và SB16 có vòng sáng phân hủy tinh bột lớn nhất với giá trị E tương ứng là 23,4 mm, 21,7 mm và 21,57 mm (Bảng 3). Khi khảo sát hoạt tính enzyme amylase, mặc dù dòng SB25 có vòng sáng phân hủy tinh bột lớn nhất nhưng hoạt tính enzyme amylase lại thấp nhất với 13,64 UI/mL, trong khi hoạt tính amylase cao nhất được ghi nhận ở dòng TB6 (Bảng 4). Sự khác biệt đó có thể do thành phần dinh dưỡng của môi trường phân lập và môi trường xác định hoạt tính enzyme amylase là khác nhau.

Bảng 3: Khả năng phân hủy tinh bột của 27 dòng vi khuẩn

Dòng	Khả năng phân hủy E (mm)	Dòng	Khả năng phân hủy E(mm)
SB25	23,43 ^a	TB4	13,27 ^f
TB6	21,70 ^b	TB14	12,97 ^g
SB16	21,57 ^b	SB21	12,97 ^g
TB5	21,23 ^b	SB22	11,70 ^g
TB2	18,77 ^c	TB7	11,60 ^h
TB3	18,10 ^{cd}	SB24	10,63 ^h
TB11	17,87 ^d	TB8	10,37 ⁱ
TB9	17,77 ^d	SB23	9,37 ⁱ
TB12	16,10 ^e	SB20	8,70 ^j
TB1	15,73 ^e	SB26	8,23 ^{jk}
TB13	15,50 ^e	SB17	8,23 ^k
TB10	14,70 ^e	SB19	6,50 ^l
SB27	14,70 ^f	SB15	5,70 ^m
SB28	14,10 ^f		

CV (%) = 3,25

Ghi chú: Giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$)



Hình 2: Vòng sáng phân hủy tinh bột

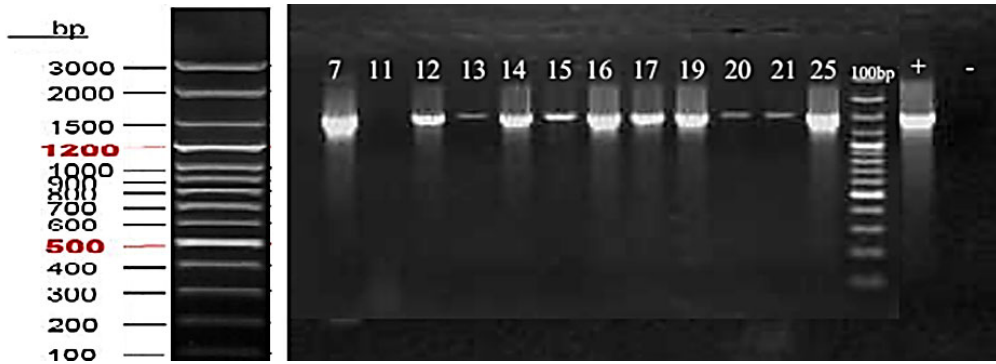
Vòng sáng phân hủy tinh bột của hai dòng vi khuẩn SB16 (a) và TB6 (b)

Bảng 4: Hoạt tính enzyme amylase các dòng vi khuẩn

Vi khuẩn	Hoạt tính amylase (UI/mL)
TB6	33,71
SB16	22,92
SB25	13,64

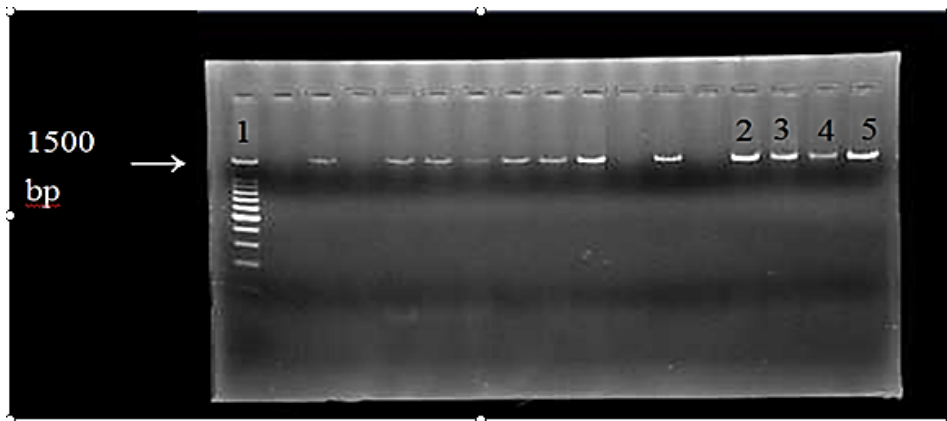
3.1.3 Kết quả giải trình tự và định danh

Giếng 20 (dòng RB8) và giếng 21 (dòng RB17) ở Hình 3 và giếng 2 (dòng SB25), giếng 3 (dòng TB6) và giếng 4 (dòng TB16) ở Hình 4 đều có band ở vị trí khoảng 1500 bp nghĩa là quá trình PCR đã khuếch đại được đoạn gene 16S rRNA của các dòng vi khuẩn này và sản phẩm của quá trình PCR đã được dùng để giải trình tự.



Hình 3: Phổ điện di sản phẩm PCR của hai dòng RB8 và RB17

Phổ điện di bao gồm thang chuẩn 3000 bp, Đối chứng dương (giếng +), đối chứng âm (giếng -), dòng RB8 (giếng 20) và dòng RB17 (giếng 21)



Hình 4: Phổ điện di sản phẩm PCR của ba dòng SB25, TB6 và TB16

Phổ điện di bao gồm thang chuẩn 1500 bp (giếng 1), đối chứng dương (giếng 5), các dòng vi khuẩn SB25 (giếng 2), TB6 (giếng 3) và TB16 (giếng 4)

Dòng RB8 có độ tương đồng 96% với vi khuẩn *Bacillus flexus* gene 16S rRNA khi so sánh trình tự gene 16S rRNA của dòng này với trình tự gene 16S rRNA trên ngân hàng dữ liệu NCBI (Bảng 5). Theo Zhao *et al.* (2008) và Pal *et al.* (2014), *Bacillus flexus* là một loài vi khuẩn Gram dương, hình que, di động, sử dụng được O₂ và có khả năng tạo nội bào tử. Quá trình khảo sát của luận án cũng cho thấy dòng RB8 là vi khuẩn Gram dương, hình que (dài), di động và có thể sống trong môi trường hiếu khí. Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy *Bacillus flexus* là vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột và có tiềm năng ứng dụng cao. Theo nghiên cứu của Zhao *et al.*, (2008), *Bacillus flexus* là loài vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột rất tốt trong môi trường kiềm. Năm 2013, (Chen *et al.*, 2013) đã nghiên cứu sử dụng *Bacillus flexus* để xử lý nước thải có nồng độ COD cao với kết quả 81,04% COD được loại bỏ.

Dòng RB17 có độ tương đồng 99% với vi khuẩn *Bacillus subtilis* strain NG3-5 16S (Bảng 5). Kết quả này phù hợp với các đặc điểm hình thái và sinh hóa

của dòng RB17 như Gram dương, hiếu khí, que dài, di động và tạo nội bào tử (Bergey *et al.*, 1957). Khả năng phân hủy tinh bột của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* đã được tìm thấy ở nhiều nghiên cứu như: Panneerselvam và Elavarasi (2015) phân lập được dòng *Bacillus subtilis* từ đất có khả năng sinh enzyme α -amylase phân hủy tinh bột; Năm 2012, Vijayalakshmi *et al.* cũng đã phân lập được dòng *Bacillus subtilis* KC3 từ đất có khả năng phân hủy tinh bột mạnh cũng như khả năng sản sinh α -amylase cao với hoạt tính 25 UI/mL.

Dòng TB6 tương đồng với *Bacillus megaterium* (gene for 16S rRNA) với độ đồng hình là 97% (Bảng 5). Kết quả này phù hợp với các đặc điểm hình thái và sinh hóa của dòng TB6 như Gram dương, hiếu khí, que dài, di động và tạo nội bào tử (Bergey *et al.*, 1957). Bên cạnh đó, *Bacillus megaterium* là một loài vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột trong quá trình sinh trưởng của chúng nhờ hệ enzyme amylase (David *et al.*, 1987). Enzyme α -amylase từ loài *Bacillus megaterium* cũng đã được nghiên cứu sử dụng trong thương mại (Brumm *et al.*, 1991). Ngoài

ra, dòng *Bacillus megaterium* sensu stricto có khả năng tổng hợp enzyme β -amylase và được dùng cùng các vi khuẩn khác để xử lý nước thải từ các cơ sở chế biến, sản xuất sản phẩm có liên quan đến tinh bột (Mary *et al.*, 1980).

Dòng SB16 tương đồng với *Bacillus cereus* strain FORC 024 với độ đồng hình là 95% (Bảng 5). Kết quả này phù hợp với các đặc điểm hình thái và sinh hóa của dòng SB16 như Gram dương, hiếu khí, que dài, di động và tạo nội bào tử (Bergey *et al.*, 1957). Trong khi đó, *Bacillus cereus* là loài vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột (Sanjoy *et al.*, 2009) và còn được dùng để sản xuất amylase sử dụng trong công nghiệp (Sivakumar *et al.*, 2012).

Dòng SB25 có độ tương đồng 96% với vi khuẩn *Bacillus flexus* gene 16S rRNA khi so sánh trình tự gene 16S rRNA của dòng này với trình tự gene 16S rRNA trên ngân hàng dữ liệu NCBI (Bảng 5). Theo Zhao *et al.* (2008) và Pal *et al.* (2014), *Bacillus flexus* là một loài vi khuẩn Gram dương, hình que, di động, sử dụng được O₂ và có khả năng tạo nội bào tử. Quá trình khảo sát của luận án cũng cho thấy dòng SB25 là vi khuẩn Gram dương, hình que (dài), di động và có thể sống trong môi trường hiếu khí. Khả năng phân hủy tinh bột của loài *Bacillus flexus* đã được thảo luận như trên.

Bảng 5: Kết quả so sánh trình tự với dữ liệu NCBI

Dòng vi khuẩn	Kết quả so sánh với dữ liệu NCBI	Đoạn gene giải trình tự (NU)	Mức độ đồng hình (%)	Accession number
RB8	<i>Bacillus flexus</i> gene for 16S rRNA	1377	96	LC189347.1
RB17	<i>Bacillus subtilis</i> strain NG3-5 16S	1286	99	KR999939.1
TB6	<i>Bacillus megaterium</i> gene for 16S rRNA	1298	97	LC085342.1
SB16	<i>Bacillus cereus</i> strain FORC 024	1251	95	CP012691.1
SB25	<i>Bacillus flexus</i> strain NB4-9 16S	1653	98	KR999917.1

4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 58 dòng vi khuẩn từ các mẫu rác, con sùng và trùn đất thu ở tỉnh Sóc Trăng trên môi trường tinh bột 1%. Trong đó có 57 dòng vi khuẩn có khả năng tiết ra enzyme amylase phân hủy tinh bột. Các dòng phân hủy tinh bột triển vọng RB8, RB17, TB6, SB16 và SB25 đã được giải trình tự gene 16S rRNA và định danh tương ứng là *Bacillus flexus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* và *Bacillus flexus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alariya, S.S., S. Sethi, S. Gupta and B.L. Gupta., 2013. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. Archives of Applied Science Research, 5(1): 15-24.

Bergey, D. H., R.E. Buchanan. and N.E. Gibbons., 1957. American Society for Microbiology. Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins. Pp 613- 653.

Brumm, P.J., R.E. Hebeda. and W.M. Teague, 1991. Purification and characterization of the commercialized, cloned *Bacillus megaterium* α -amylase. Part I: Purification and hydrolytic properties. Starch-Stärke, 43(8): 315-319.

Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp. 2002. Giáo trình thực tập Vi sinh vật đại cương. Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học., Trường Đại học Cần Thơ, trang 11-45.

Chen, K., J. Yang. and H. Zhao, 2013. Isolation and characterization of a *Bacillus* strain for alkaline

waste water treatment. Academic Journals, 7(44): 5119-5125.

David, M.H., H. Günther. and H.H. Röper, 1987. Catalytic properties of *Bacillus megaterium* amylase, Biosynthesis Nutrient Biomedical, 39: 436-440.

Ekunsanmi, T.J., 2009. Laboratory production and assay of amylase by fungi and bacteria, UW: Washington County, 1-8.

Kumar, M., D.J. Poovai, P.C.L. Kumar, S.Y. Saroja, A. Manimaran and P.T Kalaichelvan, 2012. Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its biostoning activity. Der Pharmacia Letter, 4: 881-888.

Lane, D. J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In the Nucleic acid techniques in bacterial systematics. In: E. Stackebrandt, M. Goodfellow and D. J. Lane (Editors). John Wiley and Sons. New York. 175 pages.

Mary, T., G. Priest. and J. Stark, 1980. Characterization of an extracellular β -amylase from *Bacillus megaterium* sensu stricto. Journal of General Microbiology, 118: 67-72.

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

Nguyễn Lâm Dũng và Đinh Thúy Hằng, 2006. Phương pháp thực nghiệm dùng để định tên các loài vi khuẩn, truy cập ngày 25/11/2014. Từ trang web: <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/puongphapthucnghiem-dinhntenvk.htm>.

- PalPal, K.C., N.K. Kartick, Mondal, S. Naba, Chatterjee, Soumendranath, T.S. Ghosh and J.K. Tuhin; Datta and Jayanta, 2014. Characterization of fluoride-tolerant halophilic *Bacillus flexus* NM25 (HQ875778) isolated from fluoride-affected soil in Birbhum District, West Bengal, India. *Environmental Monitoring & Assessment*, 186: 698-699.
- Panneerselvam, T. and S. Elavarasi, 2015. Isolation of amylase producing *Bacillus subtilis* from soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4: 543-552.
- Sanjoy, D., P.K. Surendran. and T. T. Nirmala, T., 2009. PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. *The Indian Journal of Medical Research*, 12: 9 316-320.
- Sivakumar, T., T. Shankar., P. Vijayabaskar., J. Muthukumar. and E. Nagendrakannan, 2012. Amylase production using *Bacillus cereus* isolated from a vermicompost site. *International Journal of Microbiological Research*, 3: 117-123.
- Trần Nhân Dũng., 2011. Sổ tay Thực hành sinh học phân tử. Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Vijayalakshmi, SK.KS., S. Abha, S. and P. Chander, 2012. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KC3 for amylolytic activity. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(5): 336-34160.
- Zhao, J., X. Lan., J. Su., L. Sun. and E. Rahman, 2008. Isoalation and identification of alkaliphilic *Bacillus flexus* XJU-3 and analysis of its alkaline amylase. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(6): 750-756.