

## ĐẶC ĐIỂM CỦA CHŨNG VI KHUẨN ND153 SINH POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) PHÂN LẬP TỪ ĐẤT RỪNG NGẬP MẶN HUYỆN GIAO THỦY, TỈNH NAM ĐỊNH

Đoàn Văn Thục, Nguyễn Thị Bình

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

### TÓM TẮT

Polyhydroxyalkanoate (PHA) là một dạng polymer sinh học tích lũy trong tế bào của nhiều loài vi sinh vật với vai trò là nguồn dự trữ carbon và năng lượng, thường xảy ra khi môi trường sống dư thừa carbon và thiếu một vài chất dinh dưỡng thiết yếu, ví dụ như nitrogen, oxygen, phosphorus, sulfur, hoặc magnesium. Trong nghiên cứu này, 12 chủng vi khuẩn có khả năng tích lũy PHA đã được phân lập từ đất rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định. Với khả năng sinh trưởng phát triển mạnh và tích lũy nhiều hạt PHA trong tế bào, chủng vi khuẩn ND153 đã được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Chủng ND153 có dạng trực khuẩn, Gram dương, di động, có khả năng hình thành nội bào tử, thuộc nhóm vi sinh vật ưa muối nhẹ, ưa pH trung tính, và ưa ẩm trung bình. Chủng vi khuẩn ND153 có khả năng đồng hóa nhiều nguồn nitrogen và carbon khác nhau. Mẫu PHA từ chủng vi khuẩn ND153 đã được tách chiết và tinh sạch. Kết quả phân tích cấu trúc mẫu polymer tinh sạch bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân cho thấy chủng ND153 tích lũy poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) - dạng polymer điển hình được tích lũy bởi rất nhiều các vi sinh vật trong tự nhiên. Chủng vi khuẩn ND153 có khả năng tích lũy hàm lượng PHB đạt 82% khối lượng tế bào khô sau 30h nuôi cấy trong điều kiện hạn chế  $MgSO_4$ .

**Từ khóa:** *Bacillus*, PHA, phân hủy sinh học, PHB, polymer sinh học

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhu cầu sử dụng polymer trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng ngày càng gia tăng, tuy nhiên nguồn dầu mỏ - nguyên liệu chính để sản xuất các loại polymer này đang có nguy cơ cạn kiệt và giá thành ngày càng tăng cao. Thêm vào đó, những plastic có nguồn gốc từ dầu mỏ không có khả năng tự phân hủy nên chúng là một trong những nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường. Giải pháp đang được quan tâm hiện nay là phát triển và sử dụng các plastic có khả năng tự phân hủy (thường được gọi là polymer sinh học) (Salehizadch, Van Loosdrecht, 2004).

Trong số các polymer sinh học đang được nghiên cứu sử dụng thì polyhydroxyalkanoate (PHA) được quan tâm nghiên cứu nhiều nhất. PHA là nhóm polymer sinh học có khả năng phân hủy tự nhiên và có nhiều tính chất tương tự các plastic tổng hợp. Chúng là polymer của các đơn phân hydroxyalkanoate, được tích lũy trong tế bào như là nguồn dự trữ carbon và năng lượng bởi rất nhiều vi sinh vật, thường diễn ra trong điều kiện thiếu một vài chất dinh dưỡng như oxygen, nitrogen, phosphorus, sulfur, hoặc magnesium, và dư thừa carbon (Lec 1996; Sudesh *et al.*, 2000). Nhiều chủng vi sinh vật có khả năng tích lũy hàm lượng PHA lên tới 90%

khối lượng khô của tế bào (Thuoc, 2009).

Kể từ khi poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) được tìm ra vào năm 1926 (Lemoigne 1926), cho đến nay đã có hơn 150 loại PHA được phân lập từ hơn 300 vi sinh vật (Valappil *et al.*, 2007). PHA có thể là polymer của một loại monomer hoặc của hai hoặc nhiều loại monomer. PHA được chia thành hai nhóm phụ thuộc vào số lượng các nguyên tử carbon có trong các đơn phân monomer: những PHA dạng mạch ngắn (sc1-PHAs) có khoảng 3-5 nguyên tử carbon trong một monomer, những PHA dạng mạch trung bình (mc1-PHAs) có khoảng 6-16 nguyên tử carbon trong một monomer. PHA mạch ngắn có tính chất giống với các loại plastic thông thường như giòn và cứng, trong khi đó các PHA mạch trung bình có tính mềm dẻo, nhiệt độ sôi và nhiệt độ kết tinh thấp (Philip *et al.*, 2007). Với lịch sử nghiên cứu và phát triển gần 100 năm, rất nhiều các sản phẩm từ PHA đã được thương mại hóa, hiện nay có hàng trăm công ty thương mại lớn nhỏ trên khắp thế giới tham gia vào lĩnh vực này (Chen, 2010).

Ứng dụng chính của PHA là thay thế các polymer có nguồn gốc từ dầu mỏ đang được sử dụng để sản xuất bao bì. Ngoài ra PHA là nguyên liệu để sản xuất các loại đồ dùng một lần như tã lót cho trẻ em, chai lọ đựng mỹ phẩm, các sản phẩm có độ bền cao như vỏ

máy vi tính, vỏ đựng lớp ô tô dự trữ... Đặc biệt hơn, do không gây phản ứng thay loại khi được cấy ghép vào cơ thể nên polymer sinh học có những ứng dụng quan trọng trong ngành y tế. Các sản phẩm như chỉ khâu phẫu thuật, đĩa xương, ống ghép mạch, van tim... là những ví dụ điển hình (Philip *et al.*, 2007).

Những nghiên cứu về PHA cũng đã được tiến hành ở Việt Nam trong thời gian gần đây, hướng nghiên cứu chủ yếu tập trung vào PHB. Lê Ý Thủy Trâm và đồng tác giả (2006) đã phân lập được chủng *Methylobacterium* sp. có khả năng tích lũy PHB với hàm lượng PHB tích lũy cực đại trong tế bào là 31,4% sau 4 ngày nuôi cấy. Bùi Thị Thanh Mai và đồng tác giả (2010) đã phân lập được chủng vi khuẩn V23-N1.1 từ xoài cát có khả năng sinh tổng hợp PHB, sơ bộ định loại đã xác định được chủng vi khuẩn này thuộc loài *Bacillus cereus*, và hàm lượng PHB cực đại do chủng này tích lũy là 58% khối lượng tế bào khô.

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành phân lập, tuyển chọn, và nghiên cứu chủng vi khuẩn có khả năng tích lũy PHA từ đất rừng ngập mặn ở Việt Nam. Đây là những nghiên cứu tiên đề làm nền tảng cho việc phát triển sản xuất và ứng dụng PHA ở Việt Nam.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Đối tượng

20 mẫu đất được thu thập từ rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định. Các mẫu đất đựng trong các túi kín và được giữ trong đá lạnh sau đó chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập.

### Các loại môi trường sử dụng

Môi trường phân lập vi khuẩn (g/l): NaCl, 30; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2,5; KBr, 0,06; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2; Peptonc, 2; Cao nấm men, 2; Glucose, 20. Môi trường thu sinh khối (kí hiệu là HM) (g/l): NaCl, 30; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,09; KCl, 0,5; KBr, 0,06; Peptonc, 5; Cao nấm men, 10; Glucose, 1. Môi trường sản xuất PHA (ký hiệu là MA) (g/l): NaCl, 30; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,36; KCl, 2; KBr, 0,24; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; Cao nấm men, 2; NH<sub>4</sub>Cl, 2; Glucose, 20. Các thành phần của môi trường được hòa tan trong 1000ml nước cất, pH của môi trường được điều chỉnh đến 7,0 bằng dung dịch 5M NaOH và 5M HCl, môi trường đặc được bổ sung 2% agar.

### Phân lập, giữ giống vi khuẩn

Phân lập vi khuẩn theo các bước cơ bản tham

khảo từ tài liệu của Nguyễn Thành Đạt và Mai Thị Hằng (2000). Giữ giống vi khuẩn bằng các phương pháp: giữ trong 4°C và cấy truyền định kỳ 1,5 tháng/lần, đông khô sinh khối tế bào và giữ ở -80°C; bảo quản sinh khối tế bào trong 15% glycerol ở -80°C.

### Tuyển chọn chủng vi khuẩn có tích lũy PHA

Cấy chuyển vi khuẩn từ hộp petri giữ giống sang hộp petri chứa môi trường HM đặc có bổ sung 0,5µg/ml dung dịch thuốc nhuộm Nile blue A tan trong DMSO (Dimethylsulfoxide). Sau 24-48h khi vi khuẩn đã mọc tốt, soi các hộp petri này dưới tia UV bước sóng 254 nm, giữ lại các chủng vi khuẩn phát huỳnh quang màu vàng cam sáng (Spiekermann *et al.*, 1999). Để khẳng định thêm kết quả tuyển chọn, tiến hành làm tiêu bản cắt lớp và quan sát các hạt PHA tích lũy trong tế bào chủng tuyển chọn dưới kính hiển vi điện tử (HVĐT) truyền qua (TEM).

### Mô tả hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào chủng vi khuẩn tuyển chọn

Cấy vi khuẩn theo hình dích đặc trên môi trường HM đặc, ủ ở 35°C trong 24h để vi khuẩn mọc thành khuẩn lạc. Quan sát, lựa chọn các khuẩn lạc mọc riêng rẽ để mô tả hình dạng, màu sắc khuẩn lạc. Làm tiêu bản giọt ép, tiêu bản nhuộm đơn, tiêu bản nhuộm Gram, quan sát và mô tả đặc điểm hình thái tế bào của chủng vi khuẩn tuyển chọn trên kính hiển vi quang học. Hình dạng và kích thước tế bào của chủng vi khuẩn tuyển chọn được xác định nhờ ảnh chụp từ kính hiển vi điện tử quét (SEM).

### Tách chiết, tinh sạch, xác định công thức phân tử của loại PHA tích lũy trong tế bào chủng vi khuẩn tuyển chọn

Nuôi cấy chủng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường MA lỏng ở 35°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sau 24-30h thu toàn bộ dịch nuôi cấy, li tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút, giữ lại sinh khối tế bào, rửa sinh khối bằng nước cất rồi đông khô sinh khối bằng máy đông khô Plexy Dry (Mỹ). Tách chiết và tinh sạch PHA bằng dung dịch chloroform trong hệ thống Soxhlet (Verlinden *et al.*, 2007). Mẫu PHA tinh sạch được gửi tới Phòng Phân tích cấu trúc, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam để xác định công thức phân tử bằng máy cộng hưởng từ hạt nhân (Bruker ARX500, Bruker, Sikerstrifen, Germany).

### Nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng và điều kiện môi trường đến sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn tuyển chọn

Cấy chủng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường

HM đặc ở 35°C trong 24h, cấy chuyển sang môi trường HM lỏng, nuôi lắc với tốc độ 180 vòng/phút ở 35°C trong 13h. Giống vi khuẩn được bổ sung với tỷ lệ 5% (v/v) vào các môi trường thí nghiệm để thử ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl, nguồn carbon và nguồn nitrogen. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình, xử lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Office Excel.

**Động thái sinh trưởng của chủng vi khuẩn tuyển chọn khi nuôi cấy trên môi trường có nguồn carbon khác nhau**

Nuôi cấy chủng vi khuẩn tuyển chọn trong bình tam giác chứa môi trường HM lỏng có nồng độ 4% NaCl, pH 7,0 với 2 nguồn carbon khác nhau là glucose và ri đường. Đặt các bình tam giác trong máy lắc với tốc độ 180 vòng/phút ở 35°C, thu mẫu ở các thời điểm 0h, 12h, 18h, 24h, 30h, 36h. Xác định khối lượng tế bào khô (CDW) và hàm lượng PHB (wt%) tích lũy trong tế bào theo phương pháp của (Law and Stepecky, 1961). PHB tinh sạch được dùng để xây dựng đồ thị chuẩn.

**Nuôi cấy hai pha, xác định sự ảnh hưởng của một số nguồn dinh dưỡng đến hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào chủng vi khuẩn tuyển chọn**

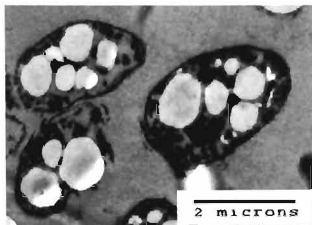
Pha sinh trưởng (pha 1): nuôi cấy chủng vi khuẩn tuyển chọn trong bình tam giác 250 ml có chứa 50 ml môi trường HM có nguồn carbon là ri đường ở 35°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sau 20h nuôi cấy, ly tâm và chuyển sinh khối để vào sang pha 2 (pha tích lũy). Pha tích lũy PHB: chủng vi khuẩn được tiếp tục nuôi trong bình tam giác 250 ml có chứa 50 ml môi trường MA nhưng hàm lượng của một số chất dinh dưỡng trong môi trường lần lượt được giảm đi (thí nghiệm 1 - nồng độ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  giảm xuống 0,2 g/l; thí nghiệm 2 - nồng độ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  giảm xuống 0,1 g/l; thí nghiệm 3 - nồng độ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  giảm xuống 0,1 g/l), hàm lượng các chất dinh dưỡng khác được giữ nguyên. Sau 10h nuôi cấy, bổ sung 2ml dung dịch glucose đậm đặc (50%) vào mỗi bình rồi tiếp tục nuôi ở 35°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút. Thu dịch nuôi cấy và xác định giá trị CDW, hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào ở các thời điểm 15h và 30h nuôi cấy.

## KẾT QUẢ, THẢO LUẬN

### Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn sinh PHA

Từ 20 mẫu đất thu ở rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định, phân lập được 425 chủng vi

khảo, ký hiệu từ NDI đến ND425. Tuyển chọn được 12 chủng vi khuẩn có tích lũy PHA, gồm các chủng: ND97, ND153, ND156, ND199, ND201, ND203, ND 210, ND218, ND240, ND325, ND355, ND389. Trong 12 chủng vi khuẩn trên, chủng ND153 có khả năng sinh trưởng, phát triển rất tốt, ảnh TEM cho thấy chủng ND153 có nhiều hạt PHA tích lũy trong tế bào (Hình 1) do đó chủng này được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Các hạt PHA tích lũy trong tế bào chủng ND153 dưới kính HVDT truyền qua (x 20000 lần)

### Hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào chủng, định loại chủng ND153

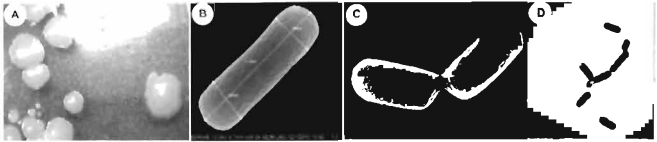
Khuẩn lạc của chủng ND153 có dạng không tròn đều, mép gợn sóng, hơi lõm ở tâm, khuẩn lạc có màu kem, bề mặt trơn bóng, hơi nhầy ướt (Hình 2A). Ảnh SEM cho thấy chủng ND153 là trực khuẩn ngắn, kích thước tế bào dao động 0,9 – 1,2  $\mu\text{m}$  x 2,0–3,5  $\mu\text{m}$ , có tiêm mao, dạng đơn trực khuẩn và song trực khuẩn là phổ biến (Hình 2B, 2C), có khả năng hình thành bào tử, giữ màu tím khi nhuộm Gram chứng tỏ chủng thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương (Hình 2D).

### Công thức phân tử của loại PHA tích lũy trong tế bào chủng ND153

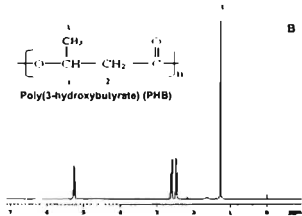
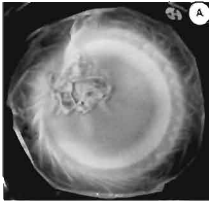
Mẫu PHA tách chiết từ chủng ND153 có màu trắng trong, mềm và dai (Hình 3A). Kết quả phân tích mẫu polymer tinh sạch của chủng ND153 bằng máy cộng hưởng từ hạt nhân được trình bày ở hình 3.B. So sánh kết quả này với nghiên cứu của Thirumala và đồng tác giả (2010) đưa đến kết luận: đỉnh ở vị trí 5,27 ppm tương ứng với nhóm methyne ( $-\text{CH}-$ ), hai đỉnh kép ở vị trí 2,5 và 2,6 ppm tương ứng với nhóm methylene ( $-\text{CH}_2-$ ), một đỉnh khác ở vị trí 1,3 ppm

trương ứng với nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>). Như vậy các monomer cấu tạo nên loại polymer tích lũy trong tế bào của chủng ND153 là 3-hydroxybutyric acid, và loại polymer này có tên là poly 3-hydroxybutyrate

(PHB). Đây là dạng PHA điển hình được tích lũy trong tế bào của rất nhiều chủng vi khuẩn, và là một trong 2 dạng polymer đang được sản xuất và ứng dụng trên quy mô công nghiệp.



Hình 2. (A) Khuẩn lạc vi khuẩn ND153 trên môi trường HM đặc. (B) và (C) Tế bào chủng ND 153 dưới kính HVDT quét (30000 lần) (D) Tế bào chủng ND153 sau nhuộm Gram dưới kính HVQH ( x 1000 lần)



Hình 3. (A) Mẫu PHA tách chiết từ chủng ND153 (B) Phổ <sup>1</sup>H-NRM của mẫu PHA tinh sạch tách chiết từ chủng ND153.



Hình 4. Sinh trưởng của chủng ND153 ở các nhiệt độ khác nhau.

**Ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng và điều kiện môi trường đến sự sinh trưởng, phát triển của chủng ND153**

**Ảnh hưởng của nhiệt độ**

Nhiệt độ là tác nhân vật lý có ảnh hưởng sâu sắc

đến tốc độ của các phản ứng hóa sinh trong tế bào vi sinh vật, vì thế chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng, phát triển của chủng ND153 nhằm tìm ra khoảng nhiệt độ tối ưu để áp dụng cho những nghiên cứu tiếp theo. Kết quả cho thấy chủng ND153 có khả năng sinh

trường, phát triển trên khoảng nhiệt độ rộng (Hình 4). Ở 4°C sau 3 ngày nuôi cấy đã thấy vi khuẩn mọc lên, tuy rằng mọc kém. Trong khoảng nhiệt độ từ 25°C đến 45°C chủng ND153 đều mọc khá tốt và mọc tốt nhất ở 33-37°C. Căn cứ vào khoảng nhiệt độ tối ưu này có thể kết luận chủng ND153 thuộc nhóm vi sinh vật ưa ấm trung bình (Nguyễn Thành Đạt, Mai Thị Hằng 2000). Nhiệt độ 35°C được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

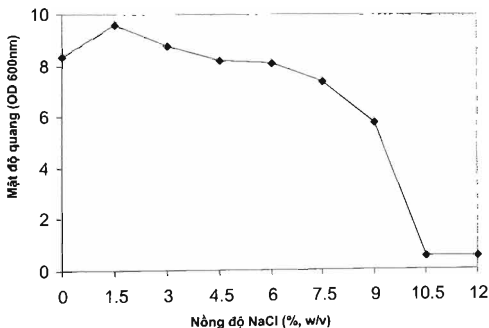
#### Ảnh hưởng của nồng độ NaCl

Chủng ND153 được phân lập từ đất rừng ngập mặn-môi trường sống có nồng độ NaCl cao. Hàm lượng NaCl trong môi trường nhiều khả năng sẽ ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn, do vậy chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm nghiên cứu sự ảnh hưởng của nồng độ muối đến chủng ND153, kết quả được thể hiện ở hình 5. Chủng ND153 có khả năng sinh trưởng và phát triển trong khoảng nồng độ NaCl khá rộng (0% đến 12%). Chúng sinh trưởng tốt ở nồng độ 0% - 7,5% và tốt nhất ở nồng độ 1,5% - 3% NaCl. Với nồng độ NaCl tối ưu như trên, theo sự phân chia các nhóm vi sinh vật ưa mặn của Gilmour (1990) thì có thể xếp chủng này vào nhóm vi sinh vật ưa mặn nhẹ (Slight halophilic microorganisms), đây là nhóm vi sinh vật điển hình của các đại dương. Trên thực tế, nhu cầu sử dụng NaCl và khả năng chịu đựng hàm lượng

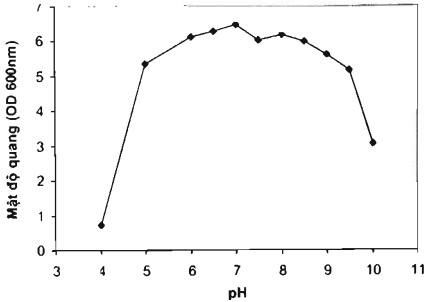
NaCl cao có thể thay đổi phụ thuộc vào nhiệt độ và các chất dinh dưỡng trong môi trường do vậy nồng độ 4% NaCl được lựa chọn để pha chế môi trường nuôi cấy chủng ND153 trong những nghiên cứu tiếp theo với 2 lý do: nồng độ muối này có thể ức chế sự sinh trưởng của một số vi sinh vật tạp nhiễm nhưng không ảnh hưởng nhiều đến sự sinh trưởng của chủng ND153, nuôi cấy vi khuẩn ở nồng độ muối cao sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tách chiết sau này (khi hòa sinh khối tế bào trong nước, nước sẽ khuếch tán vào tế bào do chênh lệch áp suất thẩm thấu, khi đó các tế bào sẽ dễ bị phá vỡ để giải phóng các hạt PHB)

#### Ảnh hưởng của pH

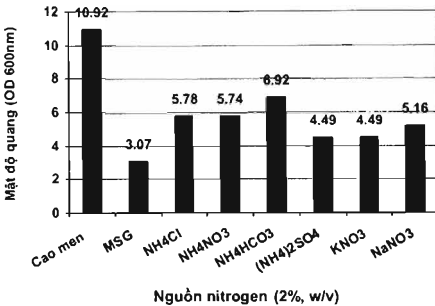
pH của môi trường ảnh hưởng đến sự phân li của các ion, đến cấu trúc và hoạt tính của protein nên có ý nghĩa quyết định đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp các chất của vi khuẩn. Xuất phát từ lý do đó, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nghiên cứu sự ảnh hưởng của pH đến chủng ND153. Hình 6 cho thấy chủng ND153 sinh trưởng, phát triển trên tất cả các pH mà nghiên cứu tiến hành (4,0 đến 10,0) tuy nhiên sự sinh trưởng đạt tốt nhất ở pH 6,5-7,0 chứng tỏ chủng này thuộc nhóm vi sinh vật trung tính. Căn cứ vào kết quả thực nghiệm, chúng tôi lựa chọn pH 7,0 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sự sinh trưởng của chủng ND153



Hình 6. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của chủng ND153



Hình 7. Ảnh hưởng của các nguồn nitrogen khác nhau đến sự sinh trưởng của chủng ND153.

### Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

Trong môi trường phân lập vi khuẩn và môi trường thu sinh khối, cao nấm men được sử dụng là nguồn nitrogen. Tuy nhiên theo Quillaguamán và đồng tác giả (2008) thì sự có mặt của một nguồn cơ chất tổng hợp như cao nấm men giúp vi sinh vật sinh trưởng tốt nhưng lại ảnh hưởng đến khả năng tích lũy PHA vì đa số vi sinh vật chỉ tích lũy được hàm lượng PHA cao khi trong môi trường dư thừa carbon

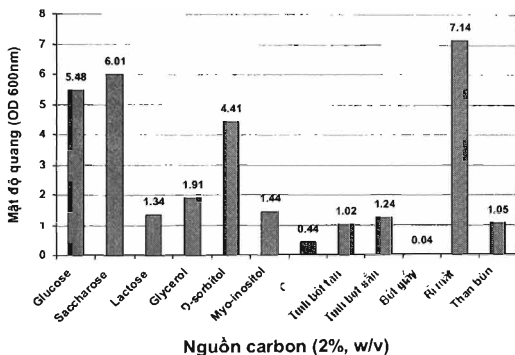
và thiếu một vài nguyên tố dinh dưỡng thiết yếu, trong đó có nitrogen. Hơn nữa, cao nấm men là một nguồn cơ chất đắt tiền nên khi sử dụng sẽ làm tăng giá thành của sản phẩm, do vậy nghiên cứu này được tiến hành nhằm tìm kiếm một nguồn nitrogen khác, rẻ tiền có thể thay thế cao nấm men. Tám nguồn nitrogen khác nhau đã được thử nghiệm, kết quả (Hình 7) cho thấy chủng ND153 có thể sử dụng tất cả các nguồn nitrogen này, tuy nhiên cao nấm men vẫn là nguồn nitrogen thích hợp nhất. Các nguồn

nitrogen có gốc amonium như  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ảnh hưởng tốt hơn đến sự sinh trưởng, phát triển của chủng NĐ153 so với các nguồn nitrogen có gốc nitrate như  $\text{KNO}_3$  hay  $\text{NaNO}_3$ , như vậy có thể sơ bộ kết luận chủng NĐ153 đồng hóa gốc amonium tốt hơn đồng hóa gốc nitrate.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  được chọn là nguồn nitrogen cho nghiên cứu tiếp theo (nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon)

### Ảnh hưởng của nguồn carbon

Đa số vi khuẩn chỉ tích lũy PHA khi trong môi trường nuôi cấy dư thừa carbon, điều đó chỉ ra vai trò rất quan trọng của nguồn carbon đối với các

chủng này. Nhiều nghiên cứu cho thấy giá thành của nguồn carbon quyết định đáng kể tới giá thành của sản phẩm PHA (Thuoc, 2009) do đó việc tìm ra nguồn carbon vừa có ảnh hưởng tốt tới sự sinh trưởng, phát triển của chủng vi khuẩn tuyển chọn, vừa rẻ tiền là việc làm cần thiết. Kết quả nuôi cấy chủng NĐ153 trên các nguồn carbon khác nhau (hình 8) cho thấy chủng này sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên 3 nguồn carbon là glucose, saccharose, ri đường. Trong 3 nguồn carbon trên, ri đường là nguồn carbon rất đáng quan tâm, vì nó vừa ảnh hưởng tốt tới sự sinh trưởng, phát triển của chủng, vừa có giá thành thấp nên có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu cho sản xuất ở quy mô lớn.



Hình 8. Ảnh hưởng của một số nguồn carbon khác nhau đến sự sinh trưởng của chủng NĐ153

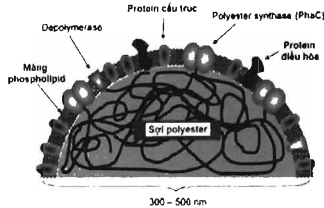
### Động thái sinh trưởng và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào chủng NĐ153

Trên bề mặt của các hạt PHA bên cạnh Polyester synthase còn có Depolymerase (Hình 9) (Rhm, 2003). Polyester synthase thường hoạt động mạnh trong pha sinh trưởng và đầu pha cân bằng, trong khi đó Depolymerase bắt đầu hoạt động ở cuối pha cân bằng và hoạt động mạnh ở đầu pha suy vong. Như vậy việc nghiên cứu động thái sinh trưởng và sinh polymer của các chủng vi khuẩn để tìm ra thời điểm tích lũy polymer cực đại là việc

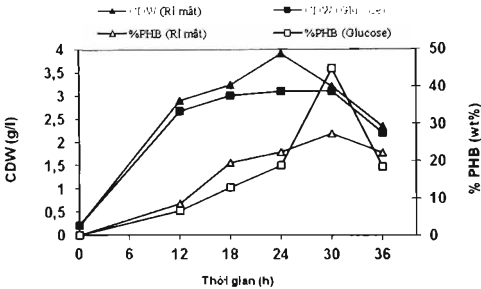
làm cần thiết. Kết quả nghiên cứu động thái sinh trưởng và khả năng tích lũy PHB của chủng NĐ153 trên 2 nguồn carbon khác nhau được mô tả trong hình 10. Khối lượng tế bào khô và hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào đạt giá trị cao nhất sau 24 và 30h nuôi cấy. Rỉ đường là nguồn cơ chất thuận lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng nhưng glucose là nguồn carbon ảnh hưởng tốt hơn đến sự tích lũy PHB. Khối lượng tế bào khô cực đại là 3,9 g/l sau 24h nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường có nguồn carbon là ri đường, trong khi đó hàm lượng PHB cực đại là 44% khối lượng tế bào khô sau 30h

nuôi cấy trên môi trường có nguồn carbon là glucose. Như vậy cũng giống như cao nấm men, ri đường là nguồn cơ chất tổng hợp, những nguồn cơ

chất này thường thích hợp cho sự sinh trưởng của vi sinh vật nhưng không thích hợp cho sự tích lũy polymer.



Hình 9. Sơ đồ cấu trúc hạt PHA (Rahm 2003)



Hình 10. Động thái sinh trưởng và sinh PHB của chủng ND153 trên hai nguồn carbon khác nhau

### Khả năng tích lũy PHB của chủng ND153 trong quá trình lên men hai pha

Sự sinh trưởng của vi khuẩn và quá trình tích lũy PHB cần hai điều kiện môi trường khác hẳn nhau, do đó để thu được hàm lượng PHB cao, công nghệ lên men sản xuất PHB hiện nay thường tiến hành theo 2 pha: pha sinh trưởng - vi khuẩn được nuôi ở điều kiện tối thích để đạt được số lượng tế bào lớn nhất, pha tích lũy - tạo điều kiện dư thừa carbon và hạn chế một vài nguồn dinh dưỡng thiết yếu để kích thích tế bào tích lũy PHB (Quillaguamán *et al.*, 2008). Sự sinh trưởng và sinh

PHB của chủng ND153 trong quy trình lên men hai pha, trên các môi trường hạn chế dinh dưỡng được trình bày trong bảng 1. Kết quả cho thấy hạn chế một nguồn dinh dưỡng nào đó đều ít nhiều làm tăng khả năng tích lũy PHB của chủng ND153. Hàm lượng PHB tăng nhiều nhất trong thí nghiệm 3 (khoảng 82% khối lượng tế bào khô), như vậy bước đầu có thể xác định sự hạn chế  $MgSO_4$  trong môi trường nuôi cấy sẽ kích thích chủng ND153 tăng tích lũy PHB. So sánh khả năng tích lũy PHB của chủng ND153 với một số chủng vi khuẩn Gram dương thuộc chi *Bacillus* (Bảng 2), nhận thấy chủng ND153 nằm trong nhóm có khả năng sinh



PHB cao. Ở tất cả các chỉ số so sánh (khối lượng sinh khối khô, hàm lượng PHB tích lũy, khối lượng PHB tích lũy) trường hợp thí nghiệm trong bình tam giác, chủng ND153 đều trội hơn so với các

chủng vi khuẩn Gram dương thuộc chi *Bacillus* được công bố trong các nghiên cứu trước đó. Kết quả này cho thấy tiềm năng phát triển sản xuất PHB của chủng ND153 là rất lớn.

**Bảng 1.** Sinh trưởng và sinh PHB của chủng ND153 trên các môi trường hạn chế dinh dưỡng

Thời gian nuôi cấy	Thí nghiệm đối chứng		Thí nghiệm 1 (hạn chế NH <sub>4</sub> Cl)		Thí nghiệm 2 (hạn chế KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )		Thí nghiệm 3 (hạn chế MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	
	CDW (g/l)	%PHB	CDW (g/l)	%PHB	CDW (g/l)	%PHB	CDW (g/l)	%PHB
15 h	3,7	34,5	3,3	47,8	2,9	30,8	3,7	40,5
30 h	3,5	20,9	4	22,7	3,7	38,7	3,9	82,4

**Bảng 2.** So sánh khả năng tích lũy PHB của chủng ND153 với một số chủng vi khuẩn Gram dương thuộc chi *Bacillus*

Chủng vi sinh vật	Nguồn carbon	CDW (g/l)	%PHB	PHB (g/l)	Tài liệu tham khảo
Chủng ND153	Glucose	3,8	82,4	3,21	Nghiên cứu này
<i>Bacillus</i> sp INT005	Glucose	0,4	35,3	0,17	Tajima et al, 2003
<i>Bacillus cereus</i> SPV	Glucose	2,1	38	0,81	Valappil et al., 2007
<i>Bacillus</i> sp. 871	Glucose	2,3	70	1,9	Thirumala et al., 2010
<i>Bacillus</i> sp 112A	Glucose	2,1	67,6	1,83	Thirumala et al., 2010

**KẾT LUẬN**

Đã phân lập và tuyển chọn được 12 chủng vi khuẩn sinh PHA từ 20 mẫu đất thu thập ở rừng ngập mặn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định, trong đó chủng ND153 với khả năng sinh trưởng nhanh và tích lũy nhiều hạt polymer trong tế bào đã được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu.

Điều kiện môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của chủng này là: nhiệt độ 33-37°C, nồng độ 1,5% - 3% NaCl, pH 7,0, chủng ND153 có khả năng đồng hóa nhiều nguồn nitrogen và nguồn carbon khác nhau. Chủng ND153 là trực khuẩn Gram dương, tích lũy poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Hàm lượng PHB lớn nhất (khoảng 82% khối lượng tế bào khô) tích lũy trong tế bào chủng ND153 thu được sau 30h nuôi lắc trong bình tam giác khi hạn chế nguồn dinh dưỡng MgSO<sub>4</sub>.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia Việt Nam (Mã số: 106.03-2010.64)

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Bui Thu Thanh Mai, Trần Đình Mẫn, Nguyễn Quốc Việt,

Phạm Thanh Hà (2010) Phân loại chủng vi khuẩn V23-X1.1 có khả năng sinh tổng hợp poly-β-hydroxybutyrate. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 8: 117-123

Chen GQ (2010) *Plastics from Bacteria* Springer Heidelberg Dordrecht London New York: 19-21; 23-24.

Gilmour D (1990) *Halotolerant and halophilic microorganisms*. In: Edwards C (ed) *Microbiology of Extreme Environments*. McGraw Hill Publishing Co, New York: 147-177.

Law JH, Slopecky RA (1961) Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. *J Bacteriol* 82: 33-36

Lee SY (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng* 49: 1-14

Lemoigne M (1926) Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide β-oxybutyrique. *Bull Soc Chim Biol* 8: 770-782.

Lê Lý Thùy Trâm, Kiều Phương Nam, Bùi Văn Lê (2006) Thu nhận poly-β-hydroxybutyrate, một loại nhựa sinh học dễ phân hủy, từ vi khuẩn *Meihibacterium* sp. phân lập tại Việt Nam. *Tap chí Khoa học Đại học Đà Nẵng* 13: 35-40.

Nguyễn Thành Đại, Mai Thị Hằng (2000) *Sinh học vi sinh vật*. Nhà xuất bản Giáo dục: 128-129.

Philip S, Keshavarz T, Roy I (2007) Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J Chem Technol Biotechnol* 82: 233-247.

Quillaguanán J, Van-Thuoc D, Guzmán H, Guzmán D, Martín J, Everest A, Hatti-Kaul R (2008) Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas hohlivensis* in fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 227-232.

Rehm BHA (2003) Polyester syntheses: natural catalysts for plastics. *Biochem J* 376: 15-33.

Saltehzadeh H, Van Loosdrecht MCM (2004) Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol Adv* 22: 261-279

Spiekermann P, Rehm BHA., Kalscheuer R, Baumeister D, Steinbüchel A (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol* 171: 73-80.

Sudesh K, Abe H, Doi Y (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* 25: 1503-1555

Tajima K, Igari T, Nishimura D, Nakamura M, Satoh Y, Munekata M (2003) Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *J Biosci Bioeng* 95: 77-81.

Thirumala M, Reddy SV, Mahmood SK (2010) Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus* spp. isolated from soil and activated sludge. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37: 271-278.

Thuoc DV (2009) Production of poly(3-hydroxybutyrate) and ectines using a halophilic bacterium. Doctoral thesis. Lund University, Lund, Sweden: 13-15; 18-21; 36.

Valappil SP, Peiris D, Langley GJ, Hermman JM, Boccacini AR, Bucke C, Roy I (2007) Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *J Biotechnol* 127: 475-487.

Verlinden RAJ, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD, Radecka I (2007) Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol* 102: 1437-1449

## CHARACTERIZATION OF A POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) ACCUMULATION BACTERIUM - STRAIN ND153 ISOLATED FROM MANGROVE IN GIAO THUY DISTRICT, NAM DINH PROVINCE

Doan Van Thuoc\*, Nguyen Thi Binh

Hanoi National University of Education

### SUMMARY

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is a group of biopolymer that accumulates intracellularly as carbon and energy storage materials in numerous microorganisms, usually when grown under the limitation of a nutrient such as nitrogen, oxygen, phosphorus, sulfur, magnesium and in the presence of excess carbon. In this study, PHA accumulating bacteria were isolated from soil samples collected from mangroves in Giao Thuy district, Nam Dinh province. Twelve bacterial strains were screened for PHA production with glucose as carbon source. The strain ND153 was chosen as a potential PHA producer. Strain ND153 is a slight halophilic, pH neutral, mesophilic, motile, Gram-positive, spore formation, and rod-shaped bacterium. The bacterium is a heterotroph, able to utilize various nitrogen and carbon sources. PHA from strain ND153 was purified and used for magnetic resonance spectroscopic analysis. Based on  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) spectroscopic analysis, it was found that strain ND153 produced a homopolymer of 3-hydroxybutyric acid (poly 3-hydroxybutyrate - PHB) - a typical polymer accumulated by many microorganisms in nature. In a medium with glucose as carbon source, the maximum PHB content of 82% of cell dry weight was obtained after 30h of cultivation in shake flask under  $\text{MgSO}_4$  limitation.

**Keywords:** *Bacillus*, biodegradable, biopolymer, PHA, PHB

\* Author for correspondence: E-mail: [doanvanthuoc@yahoo.com](mailto:doanvanthuoc@yahoo.com)