

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG VI KHUẨN *Bacillus* spp. CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CAROTENOID Ở VÙNG DUYÊN HẢI HUYỆN HÒN ĐẤT, TỈNH KIÊN GIANG

Bằng Hồng Lam^{1,2}, Huỳnh Thị Hồng Thu²,
Nguyễn Lê Thành Đạt² và Nguyễn Minh Chon²

TÓM TẮT

Từ 24 mẫu đất và nước mặn thu ở xã Sóc Sơn, Sơn Kiên và Thổ Sơn thuộc vùng duyên hải huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang, đã phân lập và nhận diện được 54 dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* qua các đặc điểm hình thái và sinh hóa. Kết hợp kỹ thuật ly trích với hệ dung môi methanol: chloroform (1 : 2 v/v) và quang phổ hấp thu ở bước sóng 400 - 600 nm đã phát hiện ở tất cả các dòng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được đều có khả năng sinh carotenoid. Qua phân tích quang phổ hấp thu cho thấy các dòng vi khuẩn SK8-1, SS6-3 và TS6-3 có khả năng sinh carotenoid cao nhất trong các dòng vi khuẩn đã phân lập. Kết quả giải trình tự 16S rRNA cho thấy, đoạn gen giải trình tự dòng SS6-3 có độ tương đồng 100% với dòng *Bacillus marisflavi* IHBB 9971, dòng TS6-3 và dòng SK8-1 có độ tương đồng 100% với dòng *Bacillus infantis* BAB-2130.

Từ khóa: *Bacillus*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus infantis*, carotenoid

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Carotenoid từ lâu đã được sử dụng trong các ngành dinh dưỡng, y dược và các ngành công nghiệp với vai trò làm chất màu thực phẩm thay cho chất màu tổng hợp. Một số carotenoid hoạt động như tiền tố vitamin A và chất kháng oxy hóa góp phần trong điều trị bệnh ở người như ung thư, tiểu đường và tim mạch (Ötles and Cagindi, 2008; Alcaino *et al.*, 2016). Nhiều nghiên cứu cho thấy các sắc tố carotenoid có màu nâu, đen, vàng, cam, đỏ

được quan tâm trong sản xuất công nghiệp có thể được tổng hợp bởi vi khuẩn *Bacillus*. Điều này cho thấy sắc tố tự nhiên từ nguồn vi khuẩn có khả năng thay thế tốt cho các chất màu tổng hợp và cũng là một lựa chọn đầy hứa hẹn có thể thay thế chất màu khác được chiết xuất từ các loài thực vật hay rau củ quả bởi vì chúng được coi như là chất màu tự nhiên, không bị ảnh hưởng bởi vấn đề sản xuất theo mùa và cho năng suất cao (Indra Arulselvi *et al.*, 2014). Chính vì vậy, nghiên cứu “Phân lập và tuyển chọn

¹ Trường Đại học An Giang - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh; ² Trường Đại học Cần Thơ

các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng sinh tổng hợp carotenoid ở vùng duyên hải huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang” được thực hiện với mong muốn tuyển chọn được một số dòng *Bacillus* spp. có tiềm năng sinh tổng hợp carotenoid cao từ môi trường mặn, có thể ứng dụng hiệu quả trong ngành công nghiệp thực phẩm cũng như trong các lĩnh vực khác mang nhiều ý nghĩa thực tiễn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Mẫu vật

Mẫu đất và mẫu nước mặn thu được tại 3 xã Sóc Sơn, Sơn Kiên và Thổ Sơn ở vùng duyên hải huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang với độ sâu từ 2 - 5 cm so với mặt đất, mặt nước, mỗi mẫu thu khoảng 500 g/500 mL cho vào túi nylon, chai vô trùng và chuyển đến phòng thí nghiệm để phân lập. Tổng số mẫu thu là 24 mẫu trong đó có 13 mẫu đất và 11 mẫu nước mặn.

2.1.2. Hóa chất

- Các hóa chất pha môi trường phân lập và nuôi cấy vi khuẩn: môi trường Sporulation Medium Agar (SMA) (Agaisse and Lereclus, 1994) và môi trường Luria Bertani (LB) của Himedia (Ấn Độ).

- Các hóa chất dùng để ly trích các hợp chất carotenoid: Methanol và Chloroform nguyên chất của Merck (Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và nhận diện một số dòng *Bacillus* spp. có khả năng sinh tổng hợp carotenoid

Cân 10 g đất hoặc hút 10 mL nước hoà tan với 90 mL nước muối sinh lý 0,9% đã khử trùng. Hỗn hợp mẫu này được gia nhiệt ở 65°C trong 1 giờ, sau đó pha loãng đến nồng độ 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Hút 0,1 mL dung dịch mẫu ở mỗi nồng độ pha loãng cấy trải trên đĩa môi trường SMA và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 72 giờ. Chọn các khuẩn lạc có màu hồng, cam, vàng để tách rông đến khi được dòng thuần. Các dòng vi khuẩn được mô tả các đặc điểm về hình thái và sinh hóa để nhận diện thuộc chi *Bacillus* dựa trên hệ thống phân loại của Bergey's Manual of Systematic Bacteriology theo mô tả bởi Khaneja và cộng tác viên (2010). Các dòng vi khuẩn được phân lập sau khi tách rông được đặt tên theo quy ước là SS cho địa điểm thu mẫu là Sóc Sơn; SK cho địa điểm thu mẫu là Sơn Kiên và TS cho địa điểm thu mẫu là Thổ Sơn. Số 1, 2, 3,... là số thứ tự các dòng vi khuẩn phân lập được.

2.2.2. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp carotenoid từ các dòng *Bacillus* spp. phân lập được

Thí nghiệm được thực hiện dựa trên phương pháp của Indra Arulselvi và cộng tác viên (2014) có hiệu chỉnh cho phù hợp. Các dòng vi khuẩn phân lập được nuôi trong 100 mL môi trường LB lỏng với tỷ lệ giống là 2% (v/v), lắc ở tốc độ 200 rpm ở 37°C trong 48 giờ. Sinh khối tế bào vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm ở tốc độ 5000 rpm trong 30 phút (lấy phần cặn). Cân 0,2 g sinh khối vi khuẩn, thêm vào 6 mL dung môi methanol: chloroform với tỷ lệ 1 : 2 v/v, vortex mạnh để hòa tan đều sinh khối và ly trích sắc tố màu. Thêm 6 ml nước cất vô trùng, vortex mạnh. Phần sắc tố màu tan trong dung môi được ly tâm 12000 rpm trong 15 phút để thu dịch trích carotenoid (phần sắc tố màu trong dung môi chloroform). Theo đó, 2 ml dịch trích carotenoid của mỗi dòng vi khuẩn được đo độ hấp thụ cực đại bằng phương pháp quét bước sóng (Scanning absorption) trong khoảng bước sóng từ 400 - 600 nm bằng máy Thermo UV1 spectrophotometer.

Hàm lượng carotenoid tổng số được xác định theo mô tả của Liaaen-Jensen và Jensen (1971) dựa trên bước sóng hấp thụ cực đại của mẫu dịch trích

$$c = D.v.f.10/2500$$

Trong đó: *c* là hàm lượng carotenoid tổng (mg); *D* là giá trị OD tại bước sóng hấp thụ cực đại; *v* là tổng thể tích (mL); *f* là độ pha loãng; 2500 là hệ số hấp thụ riêng của carotenoid; 10 là hệ số qui đổi ra mg.

2.2.3. Định danh dòng *Bacillus* spp. có khả năng sinh carotenoid cao thông qua giải trình tự gen 16S rRNA

Dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng sinh carotenoid cao được định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA (Phân giải trình tự được thực hiện bởi Nam Khoa Biotek). Kết quả giải trình tự được so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen của NCBI thông qua công cụ BLAST để xác định tên khoa học đến loài các dòng vi khuẩn được tuyển chọn (Ramesh *et al.*, 2017).

2.2.4. Phương pháp thống kê

Dữ liệu thu được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS. Số liệu được trình bày là giá trị trung bình các lần lặp lại. Các giá trị trung bình được kiểm định bằng phép thử Duncan để kiểm tra sự khác biệt.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1 đến tháng 9 năm 2019 tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và nhận diện một số dòng *Bacillus* spp. có khả năng sinh tổng hợp carotenoid

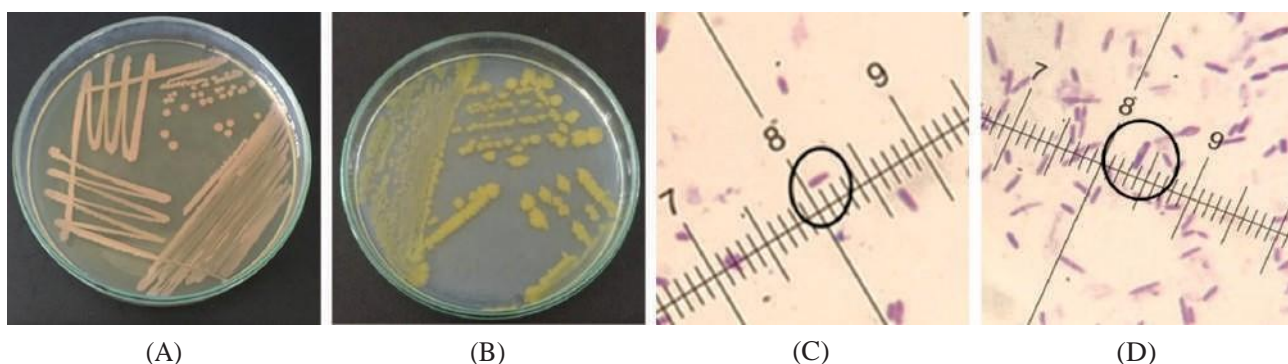
3.1.1. Phân lập vi khuẩn

Năm mươi bốn (54) dòng vi khuẩn đã được phân lập trên môi trường SMA từ 13 mẫu đất và 11 mẫu nước mặn trong tổng số 24 mẫu thu được tại 3 xã Sóc Sơn, Sơn Kiên và Thổ Sơn ở vùng duyên hải huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Trong đó có 24 dòng vi khuẩn được phân lập từ đất (chiếm 44,44%) và có 30 dòng được phân lập từ nước mặn (chiếm 55,56%). Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn phân bố rộng rãi trong cả môi trường đất và nước mặn.

3.1.2. Nhận diện các dòng vi khuẩn đã phân lập thuộc chi *Bacillus*

Về hình thái khuẩn lạc: Khuẩn lạc của 54 dòng vi khuẩn phân lập sau 72 giờ nuôi cấy trên đĩa môi trường SMA có màu vàng nhạt, vàng, vàng đậm, hồng, hồng nhạt, cam nhạt. Hình dạng khuẩn lạc tròn hoặc không tròn, bề mặt lồi hoặc phẳng, bìa nguyên hoặc răng cưa. Đường kính khuẩn lạc dao động từ 1 - 6mm.

Về hình dạng - kích thước tế bào: Tế bào của các dòng vi khuẩn đều có hình que với kích thước dao động (1,5 - 4) μm \times (0,5-1) μm .



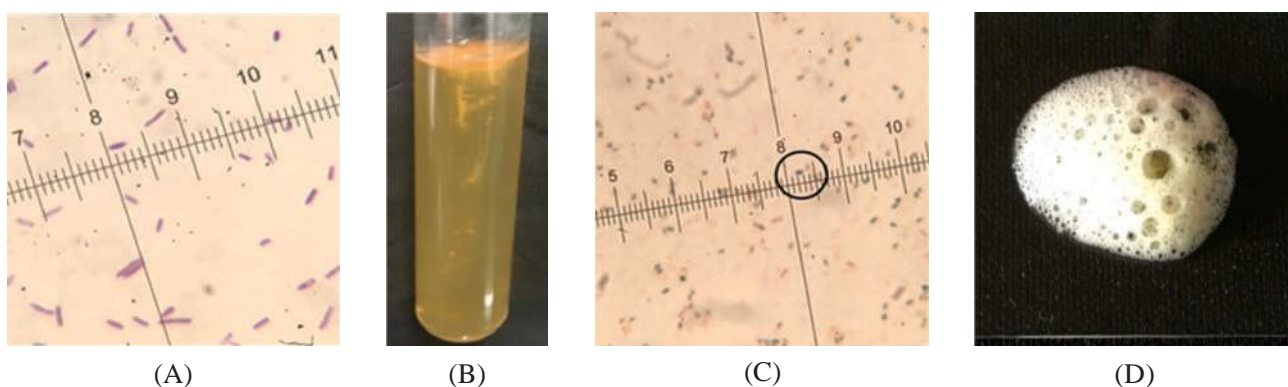
Hình 1. Hình thái khuẩn lạc (A) & (B) và Hình dạng - kích thước tế bào (C) & (D) của các dòng vi khuẩn đã phân lập

Ghi chú: (A): Khuẩn lạc có màu hồng, (B): Khuẩn lạc có màu vàng đậm, (C): Tế bào hình que - chiều dài 2,5 μm , (D): Tế bào hình que - chiều rộng 1 μm .

Về các đặc điểm sinh hóa: 54 dòng vi khuẩn phân lập được đều là vi khuẩn Gram dương, có khả năng di động, sinh nội bào tử và cho phản ứng catalase dương tính.

Các đặc điểm kiểm tra về hình thái và sinh hóa của các dòng vi khuẩn đã phân lập giống như trong hệ thống phân loại của Bergey's Manual of

Systematic Bacteriology theo mô tả của Khanuja và cộng tác viên (2010) về đặc điểm nhận diện vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Do đó, có thể kết luận rằng có 54 dòng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất, mẫu nước mặn thu được ở Sóc Sơn, Thổ Sơn, Sơn Kiên thuộc vùng duyên hải huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang là thuộc chi *Bacillus* spp.



Hình 2. Đặc điểm sinh hóa của các dòng vi khuẩn đã phân lập

Ghi chú: (A): Gram dương, (B): Có khả năng di động, (C): Sinh nội bào tử, (D): Catalase dương tính.

3.2. Khả năng sinh tổng hợp carotenoid từ các dòng *Bacillus* spp. phân lập được

Tất cả 54 dòng vi khuẩn đã phân lập ở 3 xã Sóc Sơn, Sơn Kiên và Thổ Sơn ở vùng duyên hải huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang được khảo sát khả năng sinh carotenoid đều cho kết quả là có khả năng sinh carotenoid. Vì dịch trích carotenoid của 54 dòng vi khuẩn này đều có đỉnh hấp thu quang phổ trong vùng bước sóng 400 - 600 nm là vùng bước sóng có sự hiện diện của nhóm carotenoid theo Vũ Thanh Thảo và cộng tác viên (2011) (Bảng 1).

Bảng 1. Hàm lượng carotenoid tổng số của dịch trích carotenoid từ một số dòng *Bacillus* spp. đã phân lập

STT	Tên dòng	Bước sóng hấp thu cực đại (nm)	Hàm lượng carotenoid tổng số (µg/mL)
1	SK8-1	502	3,397 ^a ± 0,026
2	SS6-3	458	2,921 ^b ± 0,030
3	TS6-3	500	2,552 ^c ± 0,025
4	SK9-1	499	1,940 ^d ± 0,033
5	TS5-1	470	1,831 ^e ± 0,024

Ghi chú: Số liệu về hàm lượng carotenoid tổng số (µg/mL) là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột, nếu có mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua phép thử Duncan ± độ lệch chuẩn (SD).

Từ kết quả trình bày ở Bảng 1 cho thấy dịch trích carotenoid của dòng SK8-1 có màu hồng, có hàm lượng carotenoid tổng số cao nhất (3,397^a ± 0,026) ở bước sóng hấp thu cực đại là 502 nm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với tất cả các dòng còn lại. Dịch trích carotenoid dòng TS6-3 cũng có màu hồng, có hàm lượng carotenoid tổng số cao thứ ba (2,552^c ± 0,025) ở bước sóng hấp thu cực đại là 500 nm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với dịch trích carotenoid dòng SK9-1 có màu hồng nhạt (hàm lượng carotenoid tổng số là 1,940^d ± 0,033) ở bước sóng hấp thu cực đại là 499 nm.

Dịch trích carotenoid dòng SS6-3 có màu vàng đậm, có hàm lượng carotenoid tổng số cao thứ hai (2,921^b ± 0,030) ở bước sóng hấp thu cực đại là 458 nm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các dòng còn lại.

Dịch trích carotenoid dòng TS5-1 màu cam nhạt, có hàm lượng carotenoid tổng số là 1,831^e ± 0,024 ở bước sóng hấp thu cực đại là 470 nm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với tất cả các dòng còn lại.

Kết quả trên bước đầu cho thấy sự hiện diện của một số loại carotenoid ở các dòng vi khuẩn

Bacillus spp. phân lập được. Dịch trích carotenoid của các dòng khác nhau có bước sóng cực đại khác nhau là do chứa các loại carotenoid khác nhau, mỗi loại carotenoid khác nhau sẽ hấp cực đại khác nhau ở mỗi bước sóng khác nhau. Theo Briton và cộng tác viên (2004), 3'4' - Didehydro-β-Ψ-Carotene có độ hấp thu cực đại ở các bước sóng 467, 501 và 537 nm trong dung môi Chloroform. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Khaneja và cộng tác viên (2010), trong đó sắc tố vàng, cam và hồng có độ hấp thu cực đại lần lượt ở bước sóng 455, 467 và 492 nm.

3.3. Định danh các dòng *Bacillus* spp. có khả năng sinh carotenoid cao bằng phương pháp sinh học phân tử

Ba dòng SK8-1 (màu hồng), SS6-3 (màu vàng đậm) và TS6-3 (màu hồng) là 3 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng sinh carotenoid cao nhất và đại diện cho 3 xã Sơn Kiên, Sóc Sơn và Thổ Sơn được chọn để định danh. Kết quả định danh bằng giải trình tự đoạn gen 16S rRNA và so sánh với các trình tự gen trong ngân hàng gen trên NCBI cho thấy dòng SS6-3 có độ tương đồng 100% với *Bacillus marisflavi* IHBB 9971, dòng SK8-1 và TS6-3 có độ tương đồng 100% với *Bacillus infantis* BAB-2130. Kết hợp các đặc điểm hình thái và sinh hóa ở trên với kết quả của trình tự gen 16S rRNA của các dòng SS6-3, SK8-1 và TS6-3, có thể kết luận rằng SS6-3 là *Bacillus marisflavi*, SK8-1 và TS6-3 là *Bacillus infantis*. Bởi vì, kết quả này tương tự với kết quả mô tả về *Bacillus marisflavi* của Yoon và cộng tác viên (2003) và *Bacillus infantis* của Ko và cộng tác viên (2006). Ngoài ra, quá trình sinh tổng hợp sắc tố vàng đã được tìm thấy ở *Bacillus marisflavi* bởi Bùi Minh Giao Long và cộng tác viên (2010) và *Bacillus infantis* sản xuất sắc tố hồng cũng được xác định bởi Vũ Thanh Thảo và cộng tác viên (2011) và Lê Minh Trí và cộng tác viên (2011).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Từ 24 mẫu đất và nước mặn thu ở 3 xã Sóc Sơn, Sơn Kiên và Thổ Sơn thuộc vùng duyên hải huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang đã phân lập được 54 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng tổng hợp carotenoid trên môi trường SMA.

Kết quả khảo sát khả năng sinh carotenoid cho thấy 54 dòng *Bacillus* spp. đã phân lập được đều có khả năng sinh carotenoid. Trong đó, ba dòng SK8-1 (màu hồng), SS6-3 (màu vàng đậm) và TS6-3 (màu hồng) có hàm lượng carotenoid tổng số sinh ra cao nhất.

Dòng SS6-3 có độ tương đồng 100% với *Bacillus marisflavi* IHBB 9971, dòng TS6-3 và dòng SK8-1 có độ tương đồng 100% với *Bacillus infantis* BAB-2130 dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA.

4.2. Đề nghị

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa và một số hoạt tính sinh học khác của dịch trích carotenoid từ các dòng *Bacillus* spp. có khả năng sinh tổng hợp carotenoid cao như SK8-1, SS6-3 và TS6-3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Minh Giao Long, Vũ Thanh Thảo và Trần Cát Đông, 2010. Sàng lọc chủng vi khuẩn sinh carotenoid từ biển và các hồ tôm ở Việt Nam. *Y học TP. Hồ Chí Minh*, 14 (1): 1-5.

Vũ Thanh Thảo, Trần Hữu Tâm, Trần Thành Đạo và Trần Cát Đông, 2011. Khảo sát sự tạo Carotenoid theo thời gian ở pha sinh dưỡng của một số chủng *Bacillus*. *Y học TP. Hồ Chí Minh*, 15(1): 211-217.

Lê Minh Trí, Trần Hữu Tâm, Trần Thị Thanh Thảo và Trần Cát Đông, 2011. Khảo sát môi trường nuôi cấy *Bacillus* sinh carotenoid cao từ các nguyên liệu rẻ tiền. *Y học TP. Hồ Chí Minh*, 15 (1): 189-194.

Agaisse, H. and D. Lereclus, 1994. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIII_A toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant. *J Bacteriol*, 176, 4734-4741.

Alcaíno, J., M. Baeza and V. Cifuentes, 2016. Carotenoid distribution in nature. *Carotenoids in Nature: Biosynthesis. Regulation and Function*. Springer, 3-34.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S and Pfander, H, 2004. *Carotenoids Handbook - Section 2: Carotenoids with a C40 skeleton*. Springer Basel AG: 1-50.

Indra Arulselvi, P., S. Umamaheswari, G. Ranandkumar Sharma, C. Karthik and C. Jayakrishna, 2014. Screening of Yellow Pigment Producing Bacterial Isolates from Various Eco-climatic Areas and Analysis of the Carotenoid Produced by the Isolate. *J. Food Process Technol.*, 5: 1-4.

Khaneja, R., L. Perez-Fons, S. Fakhry, L. Baccigalupi, S. Steiger, E. To1, G. Sandmann, T.C. Dong, E. Ricca, P.D. Fraser and S.M. Cutting, 2010. Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1889-1902.

Ko, K.S., W.S. Oh, M.Y. Lee, J.H. Lee, H. Lee, K.R. Peck, N.Y. Lee and J.H. Song, 2006. *Bacillus infantis* sp. nov. and *Bacillus idriensis* sp. nov., isolated from a patient with neonatal sepsis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 56 (11): 2541-2544.

Liaaen-Jensen, S. and Jensen, A., 1971. Quantitative Determination of Carotenoid in Photosynthetic Tissues. In *Method in enzymology, volume XXIII Photosynthesis*, ed. Pietro, A.S., 586-602.

Ötles, S. and O. Cagindi, 2008. *Carotenoids as natural colorants*. In: Socaciu, C. (Ed.). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*. CRC Press, Boca Raton, 51-70.

Ramesh, C.H., R. Mohanraju, K.N. Murthy and P. Karthick, 2017. Molecular characterization of marine pigment bacteria showing antibacterial activity. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 46 (10): 2081- 2087.

Yoon, J.H., I.G. Kim, K.H. Kang, T.K. Oh and Y.H. Park, 2003. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1297-1303.

Isolation and selection of carotenoid-biosynthesis *Bacillus* spp. from the Coastal zone of Hon Dat district, Kien Giang province

Bang Hong Lam, Huynh Thi Hong Thu,
Nguyen Le Thanh Dat, Nguyen Minh Chon

Abstract

Fifty-four strains *Bacillus* bacteria were isolated and identified by the morphology and biochemistry characteristics from 24 soil and saltwater samples collected in Soc Son, Son Kien, and Tho Son Commune from the Coastal zone of Hon Dat District. The extracts which were extracted by methanol: chloroform (1: 2 v/v) were measured absorption at wavelengths of 400 - 600 nm. The result showed that all strains were able to synthesize carotenoids; among them, SK8-1, SS6-3, and TS6-3 strains had the highest ability of carotenoids-biosynthesis. Bacterial identification by sequencing the 16S rRNA gene displayed that there was 100% similarity between the 16S rRNA gene of SS6-3 and *Bacillus marisflavi* IHBB 9971. Likewise, the 16S rRNA gene of TS6-3 and SK8-1 showed 100% similarity with *Bacillus infantis* BAB-2130.

Keywords: *Bacillus*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus infantis*, carotenoid

Ngày nhận bài: 9/02/2020

Ngày phản biện: 22/02/2020

Người phản biện: TS. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm

Ngày duyệt đăng: 27/02/2020