

Đặc điểm sinh học và tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sp 1901 phân lập tại Rừng Quốc gia Hoàng Liên

Trịnh Thành Trung, Phan Lạc Dũng, Trần Thị Lê Quyên,
Dương Văn Hợp, Đào Thị Lương*

Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội,
144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 01 tháng 3 năm 2013

Chỉnh sửa ngày 08 tháng 4 năm 2013; chấp nhận đăng ngày 07 tháng 5 năm 2013

Tóm tắt: Nhóm *Bacillus subtilis* là một nhóm gồm ít nhất 9 loài vi khuẩn có chung các đặc điểm kiểu hình và có tính tương đồng đoạn gen 16S rRNA cao. Định danh các loài trong nhóm này đòi hỏi phải sử dụng tổ hợp nhiều kỹ thuật phân loại hiện đại. Từ 315 chủng vi khuẩn hiếu khí sinh nội bào tử phân lập tại Sa Pa, chúng tôi đã phân tích trình tự gen 16S rRNA của 63 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái khuẩn lạc khác nhau. Duy nhất chủng SP 1901 được phân loại vào nhóm vi khuẩn *B. subtilis*. Để xác minh kết quả trên, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự 6 gen *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* và 16S rRNA. Phân tích trình tự và xây dựng cây phát sinh chủng loại đa gen, chủng SP 1901 được định danh là loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Chủng này có khả năng đồng hóa và lên men nhiều nguồn đường, sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 35 - 45°C, pH 5,0 - 9,0, nồng độ muối NaCl 1,0 - 7,0%, có khả năng tồn tại trong dịch dạ dày nhân tạo, sản sinh nhiều loại enzyme công nghiệp như amylase, cellulose, xylanase, lipase, protease và phytase, sinh chất kháng sinh kháng lại các vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và nấm gây bệnh cây *Fusarium oxysporum*, sinh chất kích thích sinh trưởng IAA. Đây là một báo cáo đầu tiên ứng dụng kỹ thuật phân tích trình tự đa gen để phân loại chính xác một chủng vi khuẩn trong nhóm *B. subtilis* phân lập trong hệ sinh thái tự nhiên ở Việt Nam đến loài. Với nhiều đặc tính quý, chủng SP 1901 có nhiều tiềm năng ứng dụng vào sản xuất các sản phẩm thương mại chất lượng cao.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, phân tích trình tự đa gen, enzyme ngoại bào.

1. Mở đầu

Bacillus là một trong những vi sinh vật đầu tiên được phát hiện và mô tả trong giai đoạn đầu của tiến trình phát triển ngành vi sinh vật học ở cuối thế kỷ 19. Đây là một chi lớn với

gần 200 loài vi khuẩn hiếu khí, hình que, có khả năng sinh nội bào tử để chống chịu các điều kiện bất thường của môi trường sống. *Bacillus* phân bố rộng rãi trong các hệ sinh thái tự nhiên: từ trên cạn đến dưới nước, từ nước ngọt đến nước mặn và từ vùng ven bờ đến đáy các Đại Dương [1]. Bên cạnh các loài vi khuẩn gây bệnh cho con người như *B. anthracis* và *B.*

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-904302964.
E-mail: luongdt@vnu.edu.vn

cereus, nhiều loài vi khuẩn *Bacillus*, đặc biệt là nhóm *B. subtilis*, có tiềm năng sản xuất các sản phẩm thương mại ứng dụng trong y học, trong nông nghiệp và trong công nghiệp thực phẩm. Vì lẽ đó, *Bacillus* đã được quan tâm nghiên cứu ở mọi cấp độ trong tế bào như giải mã trình tự genome, nghiên cứu cơ chế điều hòa và biểu hiện enzyme và protein, sàng lọc các chất hoạt tính sinh học từ các sản phẩm trao đổi chất bậc hai cũng như ứng dụng các kỹ thuật sinh học hiện đại trong phân loại vi sinh vật ở cấp độ loài và dưới loài [2-6].

Hệ thống phân loại *Bacillus* dựa trên phân tích trình tự đoạn gen 16S rRNA bắt đầu từ những năm 1990 [7]. Theo đó, *B. subtilis* Cohn 1872 và những loài có quan hệ gần gũi như *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. anthracis*, *B. cereus* và *B. thuringensis* được xếp vào phân nhóm thứ nhất (hay còn gọi là nhóm “*Bacillus sensu stricto*”) trong tổng số 5 phân nhóm (hay còn gọi là nhóm “*Bacillus sensu lato*”). Hơn 20 năm qua, nhiều loài vi khuẩn có quan hệ gần gũi với *B. subtilis* đã được phân lập và mô tả. Chúng bao gồm ít nhất 9 loài là *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. axarquiensis*, *B. malacitensis*, *B. mojavensis*, *B. sonorensis*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis* và *B. subtilis*. Phương pháp phân loại truyền thống dựa trên hình thái tế bào, bào tử cũng như các đặc tính sinh hóa không có khả năng phân tách các loài này. Hơn nữa, hầu hết các loài này đều có mức độ tương đồng đoạn gen 16S rRNA rất cao (lớn hơn 99%) mặc dù kết quả lai DNA-DNA của từng loài với *B. subtilis* nhỏ hơn 70%. Vì vậy, 9 loài vi khuẩn *Bacillus* này thường được chỉ định theo một thuật ngữ chung gọi là nhóm *B. subtilis*. Nhiều loài trong nhóm này đã được phân tách thành các loài phụ, ví dụ như *B. subtilis* được chia thành *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis*

subsp. *inaquosorum*; *B. amyloliquefaciens* được chia thành *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* và *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* [8-10].

Bên cạnh việc phân loại dựa trên trình tự gen 16S rRNA, một số gen khác như DNA gyrase subunit A (*gyrA*), DNA gyrase subunit B (*gyrB*) và two-component sensor histidine kinase (*CheA*) đã được sử dụng phân loại các loài trong nhóm *B. subtilis* [11-13]. Gần đây, xây dựng cây phát sinh chủng loại trên trình tự đa gen (*gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* và 16S rRNA) đã được ứng dụng trong phân loại các loài hoặc dưới loài *B. subtilis* [9, 14]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành lựa chọn chủng vi khuẩn thuộc nhóm *B. subtilis* phân lập từ mẫu đất Sa Pa [15] và ứng dụng kỹ thuật phân tích trình tự đa gen để phân loại chính xác đến loài.

2. Vật liệu và phương pháp

* *Mẫu đất, môi trường nuôi cấy và phương pháp phân lập vi khuẩn*

Vào tháng 11 năm 2010, chúng tôi tiến hành lấy 19 mẫu đất tại rừng Quốc gia Hoàng Liên và các ruộng canh tác nông nghiệp lân cận. Phương pháp lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển mẫu và phân lập vi khuẩn được mô tả chi tiết trong báo cáo của Trung và cộng sự (2011) [15].

* *Thử khả năng lên men và đồng hóa các nguồn đường*

Khả năng lên men và đồng hóa các loại đường khác nhau được thử nghiệm theo hướng dẫn của kit API 50 CHB (Biomerieux, Pháp).

* *Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào*

Hoạt tính của 19 loại enzyme được thử trên thanh API ZYM (Biomerieux, Pháp) theo

hướng dẫn của nhà sản xuất. Ngoài ra, hoạt tính amylase, cellulose, xylanase, lipase, protease và phytase được thử theo phương pháp khuếch tán trên bản thạch chứa 0,1% cơ chất tương ứng là tinh bột tan, CMC, xylan, tributyrin, casein và phytic axit.

** Khả năng sinh chất kháng sinh theo phương pháp khuếch tán trên thạch*

Chủng vi khuẩn hoạt hóa được cấy vạch trên môi trường thạch TSA (Becton Dickinson). Sau 30 giờ nuôi cấy ở 28°C, thời thạch nuôi cấy vi khuẩn được đục bằng ống kim loại (Ø 6 mm) và được chuyển sang môi trường NA đã cấy sẵn các vi khuẩn kiểm định là *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. và môi trường Czapeck đã cấy sẵn nấm kiểm định là *F. oxysporum*. Sau 24 giờ nuôi cấy đối với vi khuẩn ở 37°C và 72 giờ nuôi đối với nấm ở 28°C, hoạt tính kháng sinh được xác định dựa trên sự xuất hiện vòng ức chế xung quanh thời thạch.

** Khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA*

Chủng vi khuẩn hoạt hóa được cấy vào bình tam giác 100 ml chứa 25 ml môi trường dịch thể NA có bổ sung với L-tryptophan (Merck, Đức) nồng độ cuối là 5 mM. Sau 48 giờ nuôi lắc 180 v/p ở 37°C, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm ở 8,000 v/p trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng indole-3-acetic acid (IAA) được xác định như mô tả của Gutierrez và cộng sự, 2009 [16].

** Phân tích trình tự đa gen*

Phản ứng PCR khuếch đại và giải trình tự 6 đoạn gen gyrase subunit A (*gyrA*), RNA polymerase subunit B (*rpoB*), phosphoribosylaminoimidazolecarbox-amide formyltransferase (*purH*), DNA polymerase III subunit alpha (*polC*), 60 kDa heat-shock protein

groEL (*groEL*) và 16S rRNA được thực hiện với các cặp mỗi theo mô tả của Rooney và cộng sự (2009) [9]. Trình tự 6 gen này được đăng tải trên ngân hàng gen NCBI với mã hiệu của các trình tự lần lượt là JX403999, JX404000, JX404001, JX404002, JX404003 và JX404004.

** Xây dựng cây phát sinh chủng loại*

Trình tự đa gen của chủng vi khuẩn nghiên cứu có chiều dài 5.547 bp được kết nối theo thứ tự đoạn 928 bp của gen *gyrA*, đoạn 964 bp của gen *rpoB*, đoạn 875 bp của gen *purH*, đoạn 777 bp của gen *polC*, đoạn 835 bp của gen *groEL* và đoạn 1,168 bp của gen 16S rRNA. Trình tự đa gen của các loài quan hệ gần gũi trong nghiên cứu của Kobo và cộng sự (2011) [14] được tải về từ ngân hàng gen NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Neighbor joining sử dụng phép toán Tamura - Nei với độ lặp lại 1,000 lần trên phần mềm MEGA phiên bản 5.05.

3. Kết quả

** Phân lập vi khuẩn và lựa chọn chủng vi khuẩn nghiên cứu*

315 chủng vi khuẩn hiếu khí sinh nội bào tử được phân lập từ 10 mẫu đất rừng Hoàng Liên và 9 mẫu đất nông nghiệp xung quanh rừng tại huyện Sa Pa, Lào Cai. Dựa vào màu sắc, kích thước và hình thái bề mặt khuẩn lạc, 63 (20%) chủng vi khuẩn đã được lựa chọn và phân loại dựa trên phương pháp phân tích trình tự gen 16S rRNA [15]. Trong số này, 41 (65%) chủng được phân loại vào chi *Bacillus* dựa trên cơ sở dữ liệu Eztaxon-e cập nhật đến ngày 16/05/2012. Để lựa chọn các chủng thuộc nhóm *B. subtilis*, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen 16S

rRNA. Cùng với 9 loài trong nhóm *B. subtilis* [1], chỉ duy nhất chủng SP 1901 có quan hệ gần gũi với các loài trong nhóm *B. subtilis* (**Hình 1**). Trên cơ sở dữ liệu NCBI, trình tự đoạn 16S rDNA của chủng SP 1901 tương đồng với 90 trình tự của các loài thuộc nhóm *B. subtilis*, 47 trình tự của loài *B. amyloliquefaciens*, 21 trình tự của loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, 10 trình tự trong hệ gen của chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946 và *B. amyloliquefaciens* FZB42 và 43 trình tự của loài *B. subtilis*. Trên cơ sở dữ liệu EzTaxon-e, trình tự đoạn 16S rDNA của chủng SP 1901 tương đồng cao nhất với loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 là 99,93%; loài *B. methylotrophicus* là 99,79%; loài *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 là 99,72%; *B. vallismortis* DSM 11031 là 99,65%; *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* DSM 7 là 99,65% và với *B. siamensis* PD-A10 là 99,51%. Chỉ số tương đồng đoạn 16S rDNA của chủng SP 1901 giao động từ 99,51 - 97,73% đối với các loài *B. tequilensis* 10b, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* BGSC 3A28, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049, *B. mojavensis* IFO 15718, *Brevibacterium halotolerans* DSM 8802, *B. atrophaeus* JCM 9070, *B. licheniformis* ATCC 14580, *B. aerius* 24K và *B. sonorensis* NRRL B-23154.

* *Phân loại chủng vi khuẩn SP 1901 dựa trên phân tích trình tự đa gen*

Để xác nhận lại kết quả phân tích trên cơ sở dữ liệu NCBI và EzTaxon-e, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự 5 gen khác là *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC* và *groEL*. Kết hợp với trình tự gen 16S rRNA, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phân loại cho chủng SP 1901 cùng với các loài trong nhóm *B. subtilis* đã công bố [9, 10, 14]. Kết quả phân tích cho thấy, chủng SP 1901 được xếp vào nhóm loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* và phân tách rõ ràng với

nhóm loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* cũng như những loài khác trong nhóm *B. subtilis* (**Hình 3**). Với kết quả thu được, chúng tôi kết luận chủng SP 1901 là loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

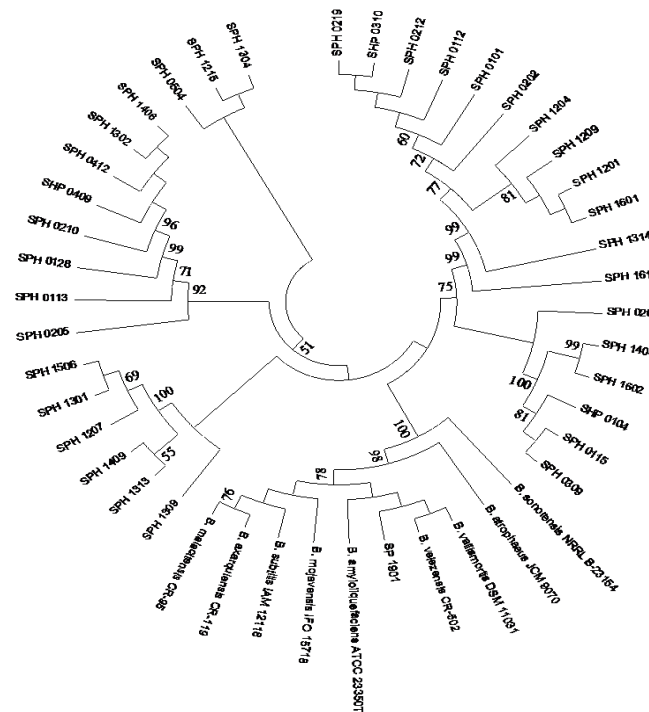
* *Đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn SP 1901*

Chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 là vi khuẩn hiếu khí, hình que, kích thước tế bào (3,2 - 3,9) × (0,9 - 1,0) μm, đứng riêng rẽ hoặc xếp đôi. Chủng SP 1901 có khả năng sinh nội bào tử hình trụ, thường nằm lệch về một phía tế bào nhưng không làm biến dạng hình que đặc trưng của tế bào. Trên môi trường nuôi cấy thạch NA, khuẩn lạc dạng tròn, có màu trắng sữa. Bề mặt khuẩn lạc khô, lồi và sần sùi. Mép khuẩn lạc có dạng hình răng cưa. Khuẩn lạc bám chắc vào thạch sau 2 ngày nuôi cấy.

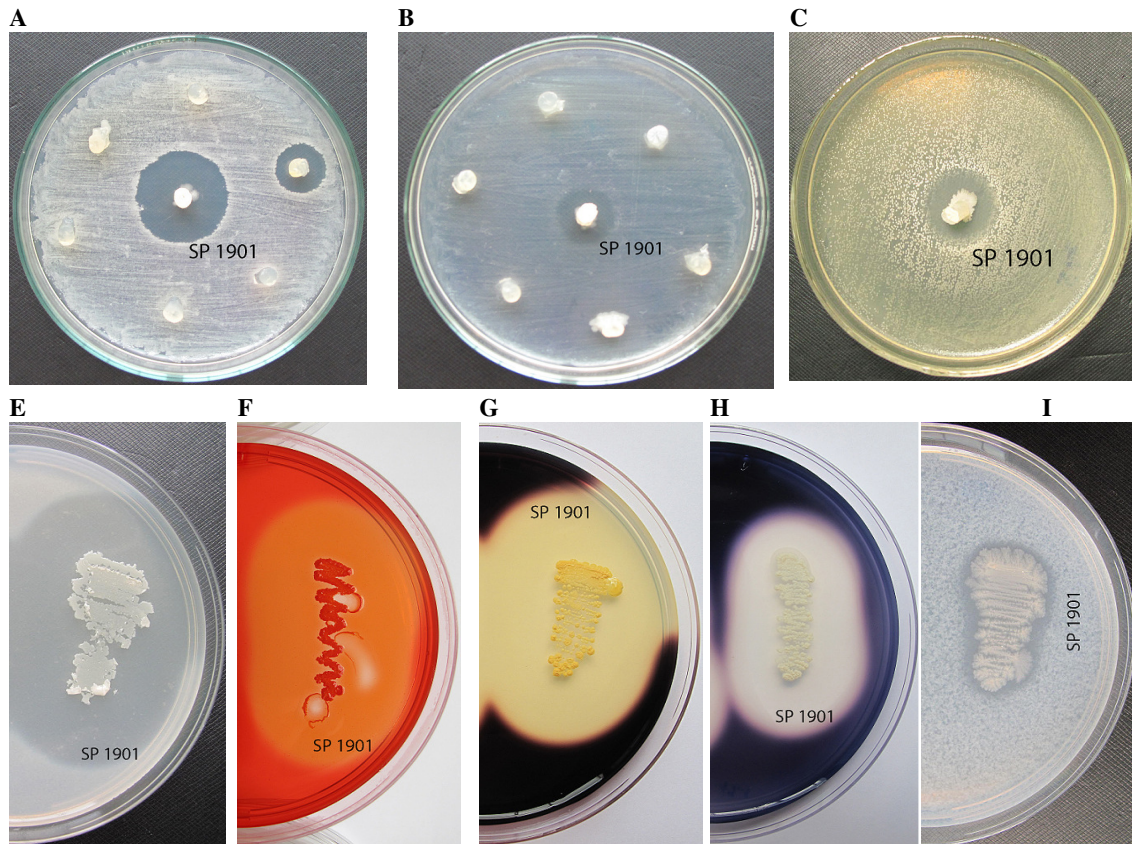
Chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 có khả năng đồng hóa tốt 19 loại đường là glycerol, D - glucose, D - fructose, inositol, D - mannitol, D - sorbitol, methyl - αD - glucopyranoside, N - acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, D - cellobiose, D - maltose, sucrose, D - trehalose, amidon (tinh bột), glycogen và gentiobiose; đồng hóa yếu L - arabinose, D - ribose, D - xylose, D - lactose và potassium 2 - ketogluconate; lên men 24 loại đường trên tổng số 49 loại đường thử nghiệm để tạo thành axit là glycerol, L - arabinose, D - ribose, D - xylose, D - glucose, D - fructose, inositol, D - mannitol, D - sorbitol, methyl - αD - glucopyranoside, N - acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, D - cellobiose, D - maltose, D - lactose, sucrose, D - trehalose, D - raffinose, amidon (tinh bột), glycogen và gentiobiose.

Chủng SP 1901 sinh trưởng tốt trong giải nhiệt độ 20°C - 55°C với khoảng nhiệt độ tối ưu là 35°C - 45°C; pH 5,0 - 9,0 với pH tối ưu là 7,0; và nồng độ NaCl 1,0 - 7,0%. Chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường có chứa 1% ox-bile nhưng yếu trên môi trường có chứa ox-bile từ 3% trở lên. Tế bào của chủng SP 1901 có thể tồn tại trong dịch dạ dày nhân tạo ở pH 2,0 và pH 3,0 sau khi xử lý 3 giờ ở 37°C.

Trên môi trường thạch chứa 0,1% cơ chất, chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 có khả năng sinh các loại enzyme ngoại bào như amylase, cellulose, lipase, phytase, protease và xylanase (Hình 2). Trên thanh thử API ZYM, chủng SP 1901 có khả năng sinh esterase (C 4), esterase lipase (C 8), lipase (C 14), acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase và α-glucosidase.



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại của 37 chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập tại Sa Pa và 9 loài thuộc nhóm *Bacillus subtilis* dựa trên phân tích trình tự 16S rDNA. Mũi tên chỉ vị trí phân loại của chủng SP 1901.



Hình 2. Khả năng sinh các hoạt chất ngoại bào của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901. Sinh chất kháng sinh kháng *Shigella* sp. (A), *E. coli* (B) và *S. aureus* (C); Sinh enzyme ngoại bào protease (E), xylanase (F), amylase (G), cellulase (H) và phytase (I).

Chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 có khả năng sinh chất kháng sinh kháng lại các loại vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) gây bệnh trên người như *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* và *Shigella* sp. (Hình 2) hoặc nấm gây bệnh cây là *F. oxysporum* và có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA.

4. Thảo luận

B. amyloliquefaciens được Fukomoto phát hiện vào năm 1943 nhờ khả năng sinh α -amylase và protease. Tại thời điểm đó, *B.*

amyloliquefaciens được xem như một dòng khác của loài *B. subtilis* hay loài phụ *B. subtilis* subsp. *amyloliquefaciens*. Đến năm 1987, *B. amyloliquefaciens* mới được tách ra thành một loài riêng dựa trên kết quả lai DNA lần lượt là 23, 15 và 5% so với các loài *B. subtilis*, *B. licheniformis* và *B. pumilus* [17]. Từ đó đến nay, nhiều chủng *B. amyloliquefaciens* phân lập từ các hệ sinh thái khác nhau ở các vùng địa lý khác nhau đã được công bố. Năm 2010, Borriss và cộng sự đã chứng minh sự khác biệt về chỉ số lai DNA, chỉ số so sánh hệ gen bằng kỹ thuật microarray (microarray - based comparative genomic hybridization), tính tương đồng của

toàn bộ hệ genome và phổ các chất hoạt tính lipopeptide và polypeptide giữa một nhóm *B. amyloliquefaciens* DSM 7 không có khả năng và một nhóm *B. amyloliquefaciens* FZB42 có khả năng sống nội cộng sinh trong rễ cây thực vật. Dựa vào kết quả thu được, Borriss đã đề xuất tách *B. amyloliquefaciens* thành 2 nhóm loài phụ là *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (có khả năng sống nội cộng sinh trong rễ cây thực vật) và *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (không có khả năng sống nội cộng sinh trong rễ cây thực vật) [10].

Phân loại các loài trong nhóm *B. subtilis* nói chung và *B. amyloliquefaciens* nói riêng đòi hỏi phải có sự tổ hợp của nhiều phương pháp phân loại hiện đại. Dựa vào kỹ thuật phân tích trình tự đa gen (MLSA), Rooney và cộng sự (2009) đã phát hiện một nhóm loài nằm tách biệt với các loài trong nhóm *B. subtilis* subsp. *subtilis* và *B. subtilis* subsp. *spizizenii* trên cây phân loại xây dựng từ 6 trình tự gen *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* và 16S rRNA [9]. Trên cơ sở phân tích dữ liệu khối phổ MALDI - TOF và thành phần axit béo (FAME), ông đã đề xuất một nhóm loài mới đó là loài phụ *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*. Mặc dù nghiên cứu của Borriss và cộng sự (2010) không đề xuất kỹ thuật phân tích trình tự đa gen nhưng trên cây phân loại 6 gen của Rooney và cộng sự đã chỉ rõ sự tách biệt giữa 2 nhóm *B. amyloliquefaciens* DSM 7 và *B. amyloliquefaciens* FZB42. Vì vậy, khi phân tích cây phát sinh chủng loại trên nhóm vi khuẩn *B. subtilis* phân lập từ thực phẩm lên men tại Nhật Bản, Kubo và cộng sự (2011) đã ứng dụng phân tích trình tự 6 gen và đã phân tách rõ các chủng dưới loài *B. amyloliquefaciens*. Phân tích trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn SP 1901 dựa trên cơ sở dữ liệu NCBI và EzTaxon-e đã tạo nên kết quả phân loại khác biệt nhau và không rõ ràng. Vì vậy, chúng tôi đã sử dụng

phương pháp phân tích cây phân loại trên 6 trình tự gen và đã xác định chủng SP 1901 thuộc loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (Hình 3) [10, 9, 14].

B. amyloliquefaciens được biết đến với nhiều ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm thương mại như sản xuất enzyme công nghiệp. Enzyme từ *Bacillus* như amylase, cellulose, protease và lipase có nhiều đặc tính quý như khả năng hoạt động tốt trong dải pH rộng và bền nhiệt. Do đó, enzyme từ *Bacillus* đã được ứng dụng nhiều trong công nghiệp chế biến thực phẩm, công nghiệp dệt may, công nghiệp giấy và công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa [18]. Từ những năm 1943, *B. amyloliquefaciens* đã được sử dụng để sản xuất 2 loại enzyme cung cấp trên thị trường là α -amylase và protease [17] với sersine protease (subtilisin BPN') cung cấp cho thị trường sản xuất chất tẩy rửa [19]. Bên cạnh đó, nhóm *B. amyloliquefaciens* nội cộng sinh rễ cây sinh phytase đã được công bố và gen mã hóa phytase đã được biểu hiện thành công trong tế bào *B. subtilis* [20]. Phytase là enzyme phân giải phytate khó tan trong các loại rau, củ và quả thành *myo*-inositol và các dạng phosphate hòa tan dễ hấp thụ trong hệ tiêu hóa động vật. Vì vậy, phytase đã được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn cho nhóm động vật dạ dày đơn và làm giảm nguy cơ ô nhiễm môi trường do hàm lượng phosphate dư thừa thải ra môi trường nước [21]. Trong thử nghiệm của chúng tôi, chủng SP 1901 sản sinh nhiều loại enzyme ngoại bào. Mặc dù chưa tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy cũng như điều kiện nuôi cấy tối ưu nhưng trên môi trường khoáng cơ bản có bổ sung nguồn đường glucose, chủng SP 1901 đã sản sinh một lượng lớn amylase, cellulase, lipase, phytase, protease và xylanase. Kết quả thử bằng thanh thử API ZYM cho thấy, chủng SP 1901 có khả năng phân cắt các loại

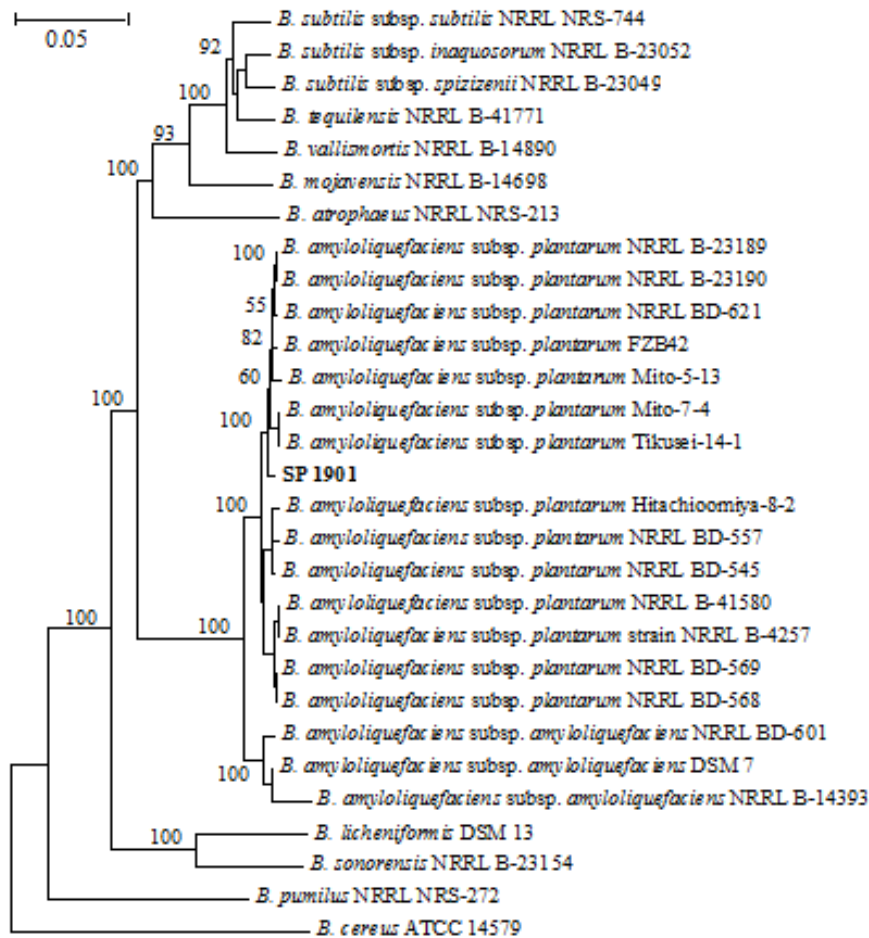
lipid có gốc từ C4 đến C14. Điều đó cho thấy, chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 phân lập tại khu rừng tự nhiên Hoàng Liên có nhiều tiềm năng sản xuất các loại enzyme công nghiệp.

Chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 có khả năng sinh kháng sinh diệt khuẩn và nấm gây bệnh. Hơn 50 năm qua, các loài thuộc nhóm *B. subtilis* đã được biết nhờ khả năng sinh các chất kháng sinh kháng vi khuẩn và nấm gây bệnh hoặc sản sinh các sản phẩm trao đổi bậc hai khác như chất kháng virus, chất kháng ung thư và chất ức chế miễn dịch [5]. Chất kháng sinh từ *Bacillus* có bản chất là các peptide được tổng hợp qua ribosome (còn gọi là bacteriocin hoặc lantibiotics). Lantibiotics có phổ kháng khuẩn hẹp và thường ứng dụng trong bảo quản thực phẩm [22]. Nhiều chất kháng sinh có bản chất peptide tổng hợp không qua ribosome cũng đã được công bố từ loài *B. amyloliquefaciens* như bacylicin, lipopeptide (surfactin, fengycin, iturin và bacillomycin) và polyketide (difficidin, bacillaene và macrolactin) [23, 5, 24]. Bacylicin là chất dipeptide được tạo nên từ L - analine và một amino acid hiếm L - anticapsin. Bacylicin có khả năng ức chế vi khuẩn *Erwinia amylovora* gây bệnh cháy lá trên táo và lê. Surfactin là chất hoạt động như chất tẩy trên màng tế bào, chất này có tính kháng khuẩn, kháng virus và kháng viêm. Iturin, fengycin và bacillomycin là các lipopeptide vòng có tính kháng nấm gây bệnh cây. Nghiên cứu gần đây cho thấy, một số chất peptide giống iturin từ *B. amyloliquefaciens* có khả năng diệt *Paenibacillus larvae* gây bệnh trên ong mật [25]. Difficidin là chất kháng sinh phổ rộng, chất này ức chế quá trình tổng hợp protein

và có khả năng ức chế *Erwinia amylovora*. Bacillaene cũng là một chất ức chế tổng hợp protein ở tế bào prokaryotes. Macrolactin là một chất kháng khuẩn Gram dương.

Nhờ khả năng phân giải các loại carbohydrate cùng khả năng sinh các chất kháng nấm và IAA kích thích sinh trưởng thực vật, chủng SP 1901 đã chứng minh tiềm năng ứng dụng sản xuất phân bón vi sinh. Thí nghiệm thực tế trên đồng ruộng đã chứng minh khi bổ sung chế phẩm chứa vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* FZB24 đã làm tăng 30% sản lượng thu hoạch bông so với đối chứng bổ sung với N:P:K (kg/ha) là 180:120:60. Đó là kết quả của khả năng sống nội cộng sinh trong rễ cây của *B. amyloliquefaciens*, qua đó làm tăng khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng của cây [26, 27].

B. amyloliquefaciens là những vi sinh vật an toàn (GRAS) và có thể dùng như probiotics để bổ sung vào thức ăn hoặc nước uống nhằm cân bằng hệ vi sinh đường ruột, qua đó ngăn ngừa và phòng chống các bệnh tiêu chảy thường gặp. Ngoài ra, vi sinh vật trong probiotics còn tăng cường khả năng dung nạp lactose, điều hòa hệ thống miễn dịch và tăng cường sức khỏe con người [28, 29]. Nhiều bằng chứng cho thấy *B. amyloliquefaciens* đã được sử dụng trong chế phẩm probiotics [30, 31]. Chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 phân lập trong đất rừng Hoàng Liên có khả năng sinh các chất kháng sinh kháng vi khuẩn gây bệnh đường ruột như *E. coli*, *Salmonella* sp. và *Shigella* sp.; có khả năng tồn tại trong dịch dạ dày nhân tạo; và có khả năng lên men đường lactose. Đó là những đặc tính tiềm năng của các chủng dùng trong sản xuất chế phẩm probiotics.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của chủng SP 1901 và các loài vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* xây dựng dựa trên đoạn ADN 5.547 bp kết nối từ 6 gen *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* và 16S rRNA.

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật phân tích trình tự đa gen để phân loại chủng vi khuẩn SP 1901 đến loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Theo chúng tôi, đây là nghiên cứu đầu tiên công bố chính xác một loài vi khuẩn phân lập trong hệ sinh thái tự nhiên ở Việt Nam đến cấp độ dưới loài dựa trên việc phân tích trình tự đa gen. Khả năng sinh enzyme ngoại bào và các chất có hoạt

tính sinh học của chủng vi khuẩn SP 1901 đã được nghiên cứu. Chủng vi khuẩn SP 1901 có nhiều tiềm năng ứng dụng sản xuất các enzyme thương mại, chế phẩm phòng trừ nấm gây bệnh cây, chế phẩm làm phân bón hữu cơ vi sinh hoặc chế phẩm probiotics. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể và nuôi cấy xốp cần được nghiên cứu triển khai nhằm tạo nên các chế phẩm thương mại chất lượng cao có nguồn gốc từ tài nguyên vi sinh vật của Việt Nam.

Lời cảm ơn

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ: “Khai thác nguồn gen xạ khuẩn và vi khuẩn cho sản xuất enzyme công nghiệp” - mã số 20/2010/NVQG.

Tài liệu tham khảo

- [1] P.D. Vos, G.M. Garrity, D. Jones, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Science (2009).
- [2] X.H. Chen, A. Koumoutsis, R. Scholz, Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol* 25 (2007) 1007-1014.
- [3] A. Koumoutsis, X.H. Chen, J. Vater & .Borriss, DegU and YczE positively regulate the synthesis of bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Appl Environ Microbiol* 73(2007) 6953-6964.
- [4] A.M. Herzner, J. Dischinger, C. Szekat, Expression of the lantibiotic mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PLoS One* 6 (2011) e22389.
- [5] E. Sansinenea & A. Ortiz, Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett* 33(2011) 1523-1538.
- [6] B. Fan, L.C. Carvalhais, A. Becker, D. Fedoseyenko, N. Vonwiren & R. Borriss, Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiol* 12(2012) 116.
- [7] C. Ash, J.A.E. Farow, S. Wallbanks & M.D. Collins, Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* 13(1991) 202-206.
- [8] L.K. Nakamura, M.S. Roberts & F.M. Cohan, Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49 (1999) 1211-1215.
- [9] A.P. Rooney, N.P. Price, C. Ehrhardt, J.L. Swezey & J.D. Bannan, Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(2009) 2429-2436.
- [10] R. Borriss, X.H. Chen, C. Rueckert, Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(2011) 1786-1801.
- [11] J. Chun & K.S. Bae, Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78(2000) 123-127.
- [12] O.N. Reva, C. Dixelius, J. Meijer & F.G. Priest, Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Ecol* 48(2004) 249-259.
- [13] L.T. Wang, F.L. Lee, C.J. Tai & H. Kasai, Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(2007) 1846-1850.
- [14] Y. Kubo, A.P. Rooney, Y. Tsukakoshi, R. Nakagawa, H. Hasegawa & K. Kimura, Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Appl Environ Microbiol* 77(2011) 6463-6469.
- [15] T.T. Trung, N. T. T. Thùy, N. M. Hùng, Đ. T. Lương và D. V. Hợp, So sánh sự đa dạng về vi khuẩn hiếu khí sinh nội bào tử tại rừng Quốc gia Hoàng Liên và các vùng đất canh tác nông nghiệp lân cận. *Hội nghị khoa học toàn Quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần 4(2011)* 996-1003.
- [16] C.K. Gutierrez, G.Y. Matsui, D.E. Lincoln & C.R. Lovell, Production of the phytohormone indole-3-acetic acid by estuarine species of the genus *Vibrio*. *Appl Environ Microbiol* 75(2009) 2253-2258.
- [17] F.G. Priest, M. Goodfellow, L.A. Shute & R.C.W. Berkeley, *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. *norn. rev. Int J Syst Bacteriol* 37(1987) 69-71.
- [18] J.L. Barredo (2005) *Microbial Enzymes and Biotransformations*. Humana Press Inc. 151-180.

- [19] R. Gupta, Q.K. Beg & P. Lorenz, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(2002) 15-32.
- [20] E.E. Idriss, O. Makarewicz, A. Farouk, Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148(2002) 2097-2109.
- [21] S. Fu, J. Sun, L. Qian & Z. Li, *Bacillus* phytases: present scenario and future perspectives. *Appl Biochem Biotechnol* 151(2008) 1-8.
- [22] H. Lee & H.Y. Kim, Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol* 21(2011) 229-235.
- [23] A. Arguelles-Arias, M. Ongena, B. Halimi, Y. Lara, A. Brans, B. Joris & P. Fickers, *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb Cell Fact* 8(2009) 63.
- [24] F. Alvarez, M. Castro, A. Principe, G. Borioli, S. Fischer, G. Mori & E. Jofre, The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J Appl Microbiol* 112(2012) 159-174.
- [25] L.B. Benitez, R.V. Velho, A. de Souza da Motta, J. Segalin & A. Brandelli, Antimicrobial factor from *Bacillus amyloliquefaciens* inhibits *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Arch Microbiol* 194(2012) 177-185.
- [26] A.V. Yao, H. Bochow, S. Karimov, U. Boturov, S. Sanginboy & K. Sharipov Effect of FZB42 *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. *Arch Phytopathol Plant Prot* 39(2006) 323-328.
- [27] B. Fan, R. Borriss, W. Bleiss & X. Wu, Gram-positive rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 colonizes three types of plants in different patterns. *J Microbiol* 50(2012) 38-44.
- [28] M.E. Sanders, Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis* 46 (2008) 58-61; discussion 144-151.
- [29] M. Saxelin, Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: a European perspective. *Clin Infect Dis* 46 (2008) 76-79; discussion S144-151.
- [30] K.E. Sutyak, R.E. Wirawan, A.A. Aroutcheva & M.L. Chikindas, Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Appl Microbiol* 104(2008) 1067-1074.
- [31] H. Cao, S. He, R. Wei, M. Diong & L. Lu, *Bacillus amyloliquefaciens* G1: A Potential Antagonistic Bacterium against Eel-Pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011(2011) 1-7.

Microbiological Characterization and Potential Applications of *Bacillus Amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sp 1901 Isolated from Soil at Hoàng Liên National Park

Trịnh Thành Trung, Phan Lạc Dũng, Trần Thị Lệ Quyên,
Dương Văn Hợp, Đào Thị Lương

VNU Institute of Microbiology and Biotechnology, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hanoi, Vietnam

Abstract: *Bacillus subtilis* complex consists of at least 9 species that share a high similarity in phenotypic characteristics and 16S rDNA sequence. Those species are known to be important industrial application. Accurate identification of those bacteria usually requires polyphasic approaches.

Of 315 aerobic endospore - forming bacteria isolated from soils of Hoàng Liên national park, 63 strains with distinct colony morphology were selected for molecular identification based on 16S rDNA sequencing analysis. Only one strain SP 1901 grouped into *B. subtilis* complex was selected. A phylogenetic tree constructed using concatenated sequence of 6 genes *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* và 16S rRNA identified strain SP 1901 as *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. The bacterium could grow and ferment a variety of carbon sources, tolerate to artificial stomach juice, produce high amount of industrial enzymes such as amylase, protease, xylanase and lipase as well as antibiotics against human pathogenic bacteria *S. aureus* and *E. coli* and phytopathogenic fungi *F. oxysporum* and phytohormone of IAA. To our knowledge, this is the first report on taxonomic identification of *B. subtilis* strain isolated from Vietnam using multilocus sequencing analysis. With many valuable commercial products, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SP 1901 demonstrated a potential candidate for industrial applications. Further investigations on fermentation conditions as well as biological properties of the bioactive compounds are needed in order to produce high quality products originated from microbial resource of the country.

Keywords: Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, phylogenetic analysis, extracellular enzymes.