

NGHIÊN CỨU ĐỊNH DANH CHỦNG *BACILLUS SUBTILIS* LS6

Trương Quang Vinh^{1,2}, Trịnh Đình Khả^{1*}, Nguyễn Xuân Hoàng¹

¹Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên

²Sở Công an tỉnh Bắc Ninh

TÓM TẮT

Bacillus là nhóm vi khuẩn có lợi hiện diện trong đa số các chế phẩm vi sinh và sản xuất enzyme. Chủng *Bacillus* sp. LS6 có khả năng sản xuất đa enzyme ngoại bào mạnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả kết quả định danh chủng *Bacillus* sp. LS6 dựa trên kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái, hóa sinh và trình tự đoạn gene 16S rRNA. Chủng LS6 là vi khuẩn Gram dương và có hoạt tính catalase. Chủng LS6 có khả năng đồng hóa nguồn carbon (inositol, maltose, sucrose, glucose, lactose, sorbitol, xylose, tinh bột, cellulose), nhưng không sinh trưởng được trên môi trường có nồng độ muối NaCl 7%. Đoạn gene 16S rRNA đã được phân lập bằng phản ứng PCR và đọc trình tự nucleotide. Trình tự nucleotide đoạn gene 16S rRNA của chủng LS6 có kích thước 554 bp và có độ tương đồng cao với một số đại diện của chi *Bacillus* (99,5 – 99,8%). Trong đó, trình tự nucleotide tương đồng cao nhất với loài *Bacillus subtilis* (Mã số Genbank: KT236337). Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. LS6 được đặt tên là *Bacillus subtilis* LS6.

Từ khóa: Sinh học, *Bacillus subtilis*, Đa enzyme, Mã vạch DNA, Xác định trình tự, 16S rRNA

Ngày nhận bài: 25/6/2019; Ngày hoàn thiện: 25/7/2019; Ngày đăng: 29/7/2019

STUDY ON IDENTIFICATION OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN LS6

Trương Quang Vinh^{1,2}, Trịnh Đình Khả^{1*}, Nguyễn Xuân Hoàng¹

¹University of Science - TNU

²Department of Public Security - Bac Ninh Province

ABSTRACT

Bacillus is a group of bacteria that presents in the majority of microbial products and production enzyme. The strain *Bacillus* sp. LS6 having high productivity of extracellular multi-enzyme. In this study, we described the result of identification strain *Bacillus* sp. LS6 by study of morphological characteristics, biochemical characteristics and sequencing nucleotide of 16S rRNA fragment. The LS6 strain used carbon sources (inositol, maltose, sucrose, glucose, lactose, sorbitol, xylose, starch, cellulose), but could not grow on medium with 7% NaCl. The 554 bp fragment of 16S rRNA gene of the LS6 strain was isolated by PCR reaction and nucleotide sequencing. The sequencing analysis result has showed that the sequence of 16S rRNA gene of the LS6 strain has high homology to those of some representatives of genus *Bacillus* (99.5-99.8%). Among them, it has the highest homology with that of *Bacillus subtilis* strain (accession number KT236337). The LS6 strain was named *Bacillus subtilis* LS6.

Keywords: Biology, *Bacillus subtilis*, DNA barcode, Multi-enzyme, Sequencing, 16S rRNA

Received: 25/6/2019; Revised: 25/7/2019; Published: 29/7/2019

* Corresponding author. Email: khatd@tnus.edu.vn

1. Mở đầu

Enzyme là chất xúc tác sinh học có vai trò quan trọng trong chuyển hóa sinh học các hợp chất cao phân tử thành các đơn phân tử. Việc chuyển hóa tinh bột, cellulose và xylan bởi enzyme thành đường có nhiều ý nghĩa quan trọng và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực: công nghiệp thực phẩm, sản xuất thức ăn chăn nuôi, sản xuất bia, bột giấy, ngành công nghiệp chất tẩy rửa, ngành công nghiệp dệt may, nhiên liệu và hóa chất, quản lý chất thải và xử lý ô nhiễm môi trường [1]. Một trong những công việc cần tiến hành khi nghiên cứu các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme là phải phân loại chủng vi sinh đó. Hiện nay, để phân loại chủng vi sinh vật người ta có thể dựa vào những đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa và phân loại phân tử. Trong đó, phân loại học phân tử dựa vào trình tự nucleotide của gene mã hóa rRNA đang là một công cụ hữu hiệu trong phân loại học và bổ sung cho quá trình phân loại bằng các đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa [2,3,4,5,6].

Gene 16S rRNA có kích thước khoảng 1500 bp, có độ bảo thủ cao thường được ứng dụng trong phân loại phân tử với đối tượng vi khuẩn [7]. Cặp mồi LS6F, LS6R được thiết kế dựa trên trình tự vùng bảo thủ ở phần đầu của gene 16S rRNA. Sử dụng cặp mồi LS6F/LS6R sẽ nhân được đoạn DNA có kích thước khoảng 500 bp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi công bố kết nghiên cứu một số đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân tích trình tự đoạn gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn LS6 có khả năng sinh enzyme làm cơ sở để phân loại định tên khoa học chính xác của chủng này.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn LS6 được cung cấp từ bộ sưu tập chủng giống của phòng thí nghiệm Sinh học-Khoa Công nghệ sinh học-Trường Đại học Khoa học-Đại học Thái Nguyên.

Hóa chất

Peptone, cao nấm men, agarose được mua từ hãng Bio Basic (Canada). Hóa chất sử dụng cho PCR, kit tinh sạch sản phẩm PCR được cung cấp bởi hãng Thermo Fisher Scientific (Anh).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp xác định hoạt tính sinh enzyme của chủng vi sinh vật

Chủng LS6 được nuôi trên môi trường LB lỏng có bổ sung 0,5% cơ chất (tinh bột, carboxymethyl cellulose, xylan, casein) tương ứng ở nhiệt độ 37°C. Sau 48h nuôi cấy, dịch enzyme ngoại bào được thu hồi bằng phương pháp ly tâm và thử hoạt tính sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán enzyme trên thạch nhuộm đặc hiệu xác định vòng phân giải cơ chất.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái

Chủng LS6 được nuôi cấy trên môi trường LB agar sau 24h quan sát các đặc điểm khuẩn lạc, nghiên cứu đặc điểm sinh hóa và nhuộm Gram theo Vũ Thị Minh Đức [8]. Đặc điểm hình thái, sinh hóa được so sánh với khóa phân loại của Bergey (2012) [9].

2.2.3. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Chủng vi khuẩn LS6 được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng qua đêm sau đó ly tâm thu cặn tế bào. DNA tổng số được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) [10].

2.2.4. Phương pháp nhân bản gene 16S rRNA

Cặp mồi đã được thiết kế dựa trên vùng bảo thủ gene 16S rRNA của vi khuẩn công bố trên Genbank để nhân đoạn gene 16S rRNA của chủng LS6 có kích thước khoảng 500 bp. Cặp mồi có trình tự nucleotide là LS6F (5'-CCC CCG GCT CAA CCG GGG AGG - 3') và LS6R (5' - CTC CCG TAG GAG TCT GGGC - 3'). Hỗn hợp phản ứng bao gồm 1,5 µl (50ng) DNA khuôn; 1 µl (10 pmol) mồi mỗi loại; 0,25 µl Taq polymerase 5U; 2,5 µl đệm PCR 10x; nước cất khử ion đến 25 µl.

PCR được tiến hành theo chu trình: 95°C/ 5 phút, 30 chu kỳ (94°C/ 1 phút, 47°C/ 30 giây, 72°C/ 1 phút), 72°C/ 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.2.5. Giải trình tự và phân tích trình tự gene

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit Gene JET Gel Extraction Kit của hãng Thermo Fisher Scientific. Sau đó, sản phẩm PCR được đọc trình tự trên máy giải trình tự tự động tại Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trình tự nucleotide của đoạn gene 16S rRNA phân lập từ chủng LS6 được xử lý và phân tích bằng phần mềm DNA STAR (Wincosin, USA) để xác định hệ số tương đồng và dựng cây phân loại. Sử dụng phần mềm BLAST

trong

NCBI

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [11]

để nhận diện đoạn gene 16S rRNA và định danh chủng vi khuẩn LS6.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Định danh chủng LS6 bằng đặc điểm hình thái và hóa sinh

3.1.1. Khả năng sinh enzyme ngoại bào

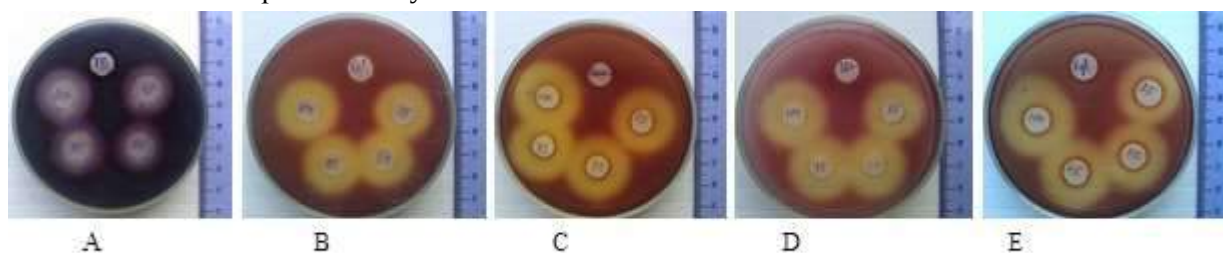
Chủng LS6 đã được xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp xác định vòng phân giải cơ chất của dịch enzyme ngoại bào. Kết quả cho thấy, chủng LS6 có khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase, cellulase, protease, mannanase và xylanase (Bảng 1 và Hình 1).

Bảng 1. Hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng LS6 (n=3)

Enzyme	Hoạt tính enzyme ngoại bào (D-d, mm)*			
Thể tích thử (μl)	25	50	75	100
Amylase	1,5 ± 0,01	1,7 ± 0,03	1,8 ± 0,01	1,9 ± 0,04
Cellulase	1,5 ± 0,02	1,5 ± 0,05	1,6 ± 0,02	1,7 ± 0,03
Protease	1,9 ± 0,04	2,0 ± 0,04	2,1 ± 0,01	2,2 ± 0,02
Mannanase	1,4 ± 0,01	1,6 ± 0,02	1,7 ± 0,02	1,8 ± 0,03
Xylanase	1,5 ± 0,03	1,7 ± 0,02	1,9 ± 0,03	2,2 ± 0,06

Ghi chú: *: $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Bảng 1 cho thấy, chủng LS6 có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme ngoại bào với hoạt tính mạnh. Trong đó, hoạt tính protease và xylanase mạnh nhất với khả năng thủy phân vòng cơ chất đạt 2,2 mm/100μl dịch enzyme thử. Kết quả này cho thấy, chủng LS6 có thể được dùng để lên men sản xuất chế phẩm đa enzyme.



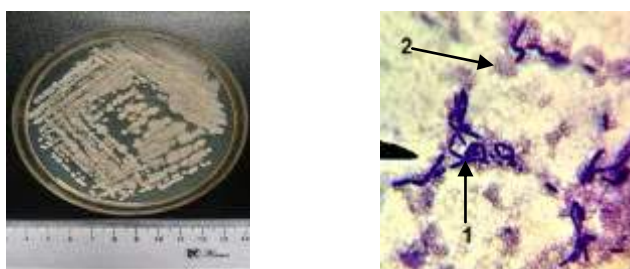
Hình 1. Hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng LS6

A: Amylase; B: Cellulase; C: Protease; D: Mannanase; E: Xylanase

3.1.2. Phân tích đặc điểm hình thái và hóa sinh của chủng LS6

Chủng LS6 được nuôi cấy trên môi trường LB agar. Sau 24h quan sát đặc điểm hình thái nhận thấy: khuẩn lạc dạng tròn, hơi nhầy, bề mặt khuẩn lạc khô, rìa răng cưa không đều, có tâm sẫm màu, màu vàng xám, đường kính 3-5 mm. Sau 48-96h khuẩn lạc có dạng nhẵn nhéo màu hơi nâu (Hình 2A).

Sử dụng phương pháp nhuộm Gram cho thấy, chủng LS6 có hình que, bắt màu Gram dương. Cơ thể vi khuẩn LS6 dạng đơn lẻ hoặc tạo thành chuỗi. Bào tử có hình oval (Hình 2B). Nghiên cứu một số đặc điểm hóa sinh cho thấy, chủng LS6 có khả năng đồng hóa một số nguồn đường và polysaccharide, có hoạt tính catalase nhưng không sinh trưởng được trên môi trường có nồng độ muối NaCl 7% (Bảng 2). So sánh với khóa phân loại của Bergey [9], chủng vi khuẩn LS6 có nhiều đặc điểm tương đồng với chi *Bacillus*.



Hình 2. Hình ảnh khuẩn lạc và nhuộm Gram của chủng LS6

1: Hình dạng tế bào; 2: Hình dạng bào tử

Bảng 2. Một số đặc điểm hóa sinh của chủng LS6

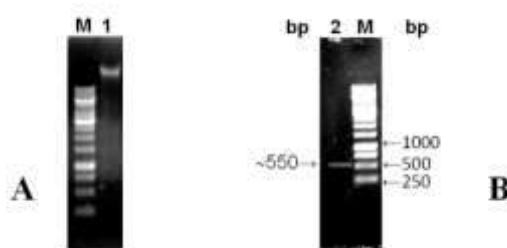
Đặc điểm	Đánh giá (+/-)	Đặc điểm	Đánh giá (+/-)
Gram	+	Đồng hóa lactose	+
Hoạt tính catalase	+	Đồng hóa sorbitol	+
Đồng hóa inositol	+	Đồng hóa xylose	+
Đồng hóa maltose	+	Đồng hóa tinh bột	+
Đồng hóa sucrose	+	Đồng hóa cellulose	+
Đồng hóa glucose	+	Chịu NaCl 7%	-

Ghi chú: +: Có khả năng đồng hóa/dương tính/chịu được; -: Không có khả năng đồng hóa/âm tính/không chịu được

3.2. Định danh chủng vi khuẩn LS6 bằng mã vạch DNA

DNA tổng số của chủng LS6 được tách chiết theo phương pháp đã mô tả. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy DNA không bị đứt gãy, có thể dùng cho các nghiên cứu về khuếch đại gene 16S bằng PCR (Hình 3A).

Sử dụng PCR với cặp mồi LS6F/LS6R đã khuếch đại được đoạn DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 550 bp (Hình 3B). Kích thước của đoạn gene nhân bản được phù hợp với tính toán lý thuyết khi thiết kế cặp mồi LS6F/LS6R. Sản phẩm PCR được tinh sạch để đọc trình tự nucleotide.



Hình 3. Hình ảnh điện di DNA tổng số (A) và sản phẩm PCR (B)

M – Marker 1kb; 1: DNA tổng số; 2: sản phẩm PCR; bp: base pair

Bảng 3. Các trình tự nucleotide của đoạn gene 16S rRNA sử dụng trong phân tích

TT	Loài	Mã số trên Genbank	Tác giả	Năm công bố	Kích thước (bp)
1	<i>Bacillus subtilis</i> strain LS6	KX289791	Nghiên cứu này		554
2	<i>Bacillus subtilis</i> strain S17	MK942525	Ikram,S.	2019	1495
3	<i>Bacillus subtilis</i> strain S11	MK942519	Ikram,S.	2019	1511
4	<i>Bacillus subtilis</i> strain S10	MK942518	Ikram,S.	2019	1513
5	<i>Bacillus subtilis</i> strain SHBS15	KT236337	Hayat,S. và Sabri,A.N.	2015	900
6	<i>Bacillus tequilensis</i> strain MMFG37	MG940854	Mahmoud,M.G., El Awady,M.E., Saber,G.I. và Imam,F.M.	2018	919
7	<i>Bacillus vallismortis</i> strain MML5820	MG813973	Gideon Moses,D. và Mathivanan,N.	2018	1490
8	<i>Bacillus flexus</i> strain BVC42	JQ660625	Pathma,J. and Sakthivel,N.	2013	950

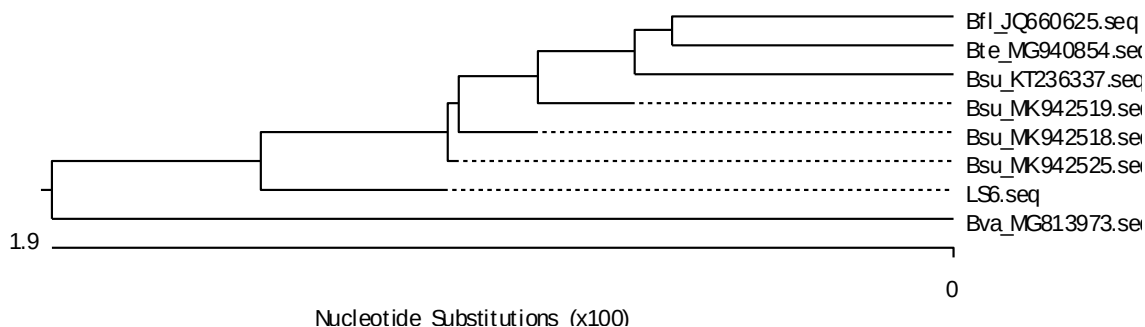
Kết quả phân tích hệ số tương đồng và hệ số phân ly di truyền bằng phần mềm DNA STAR cho thấy, hệ số tương đồng di truyền dựa trên trình tự gene 16S rRNA của chủng *Bacillus subtilis* LS6 so với một số chủng thuộc chi *Bacillus* từ 95,3-99,8% và tương đồng với tỷ lệ 99,5-99,8% so với 3 loài *Bacillus subtilis*. Trong đó, trình tự nucleotide tương đồng cao nhất với chủng *Bacillus subtilis* SHBS15 (mã số trên Genbank KT236337). Như vậy, kết hợp với đặc điểm hình thái, hóa sinh và trình tự nucleotide của đoạn gene 16S rRNA chủng LS6 đã được xác định là *Bacillus subtilis* và được đặt tên là *Bacillus subtilis* LS6. Trình tự đoạn gene 16S rRNA của chủng *Bacillus subtilis* LS6 đã được đăng ký trên Genbank với mã số KX289791.

Bảng 4. Hệ số tương đồng di truyền của chủng LS6 so với các chủng đã công bố

Percent Identity									
	1	2	3	4	5	6	7	8	
1		99.4	98.6	98.6	98.6	98.8	98.3	99.5	1
2	0.6		99.2	99.4	99.5	98.0	95.5	99.8	2
3	1.4	0.8		99.5	99.7	98.0	97.9	99.5	3
4	1.4	0.6	0.5		99.7	98.3	98.2	99.5	4
5	1.4	0.5	0.3	0.3		98.6	98.5	99.5	5
6	1.2	2.0	2.0	1.7	1.4		95.3	99.5	6
7	1.7	4.6	2.1	1.8	1.5	4.9		99.5	7
8	0.5	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		8
	1	2	3	4	5	6	7	8	

Bfl_JQ660625.seq
 Bsu_KT236337.seq
 Bsu_MK942518.seq
 Bsu_MK942519.seq
 Bsu_MK942525.seq
 Bte_MG940854.seq
 Bva_MG813973.seq
 LS6.seq

Từ dữ liệu về trình tự nucleotide của đoạn gene 16S rRNA, sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các chủng *Bacillus* trong phân tích được thiết lập (Hình 6). Trên hình 6, tám chủng *Bacillus* được phân bố trên 2 nhánh. Nhánh thứ nhất chỉ có chủng *Bacillus vallismortis* MML5820 có trình tự đoạn gene 16S mang mã số MG813973 trên Genbank và 7 chủng còn lại ở nhánh thứ 2 với khoảng cách di truyền giữa chúng là 1,9%. Ở nhánh thứ 2, bảy chủng *Bacillus* phân bố thành 2 nhánh. Trong đó, nhánh thứ nhất là chủng *Bacillus subtilis* LS6 và 6 chủng còn lại phân bố nhánh thứ 2. Sơ đồ hình cây cho thấy chủng *Bacillus subtilis* LS6 có mối quan hệ di truyền gần với các chủng *Bacillus subtilis* có mã số trên Genbank: MK942525, MK942518, MK942519, KT236337.



Hình 6. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa chủng *Bacillus subtilis* LS6 với một số chủng *Bacillus* trên Genbank dựa trên trình tự đoạn gene 16S rRNA

4. Kết luận

Dựa trên một số đặc điểm hình thái, hóa sinh và trình tự nucleotide của đoạn gene 16S rRNA đã định danh được chủng vi khuẩn LS6 thuộc loài *Bacillus subtilis*. Chủng *Bacillus subtilis* LS6 có khả năng đồng hóa nguồn carbon (inositol, maltose, sucrose, glucose, lactose, sorbitol, xylose, tinh bột, cellulose) nhưng không sinh trưởng được trên môi trường có nồng độ muối NaCl 7%. Đoạn gene 16S rRNA của chủng *Bacillus subtilis* LS6 có kích thước 554 bp và trình tự nucleotide đã được đăng ký trên Genbank với mã số KX289791.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bhat M.K., "Cellulase and related enzymes in biotechnology", *Biotechnol. Adv.*, 18, pp: 355-383, 2000.
- [2]. Bakkali M. E., Chaoui I., Zouhdi M., Melloul M., Arakrak A., Elfahime E., El Mzibri M., Laglaoui A., "Comparison of the conventional technique and 16S rDNA gene sequencing method in identification of clinical and hospital environmental isolates in Morocco", *African Journal of Microbiology Research*, 7 (50), pp: 5637-5644, 2013.
- [3]. Marcello P., Riggio, M. P., Lennon, A., Taylor, D. J., Bennett, D., "Molecular identification of bacteria associated with canine

periodontal disease", *Veterinary Microbiology*, 150, pp: 394-400, 2011.

- [4]. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J., "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *J. Bacteriol.* 173 (2): pp: 697-703, 1991.

[5]. Trịnh Đình Khá, Quyền Đình Thi, Nghiêm Ngọc Minh, "Nhân dòng và phân tích trình tự gene 28S rRNA của chủng nấm đảm sinh tổng hợp cellulase", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, 96 (8): tr. 115-118, 2012.

[6]. Trịnh Đình Khá, "Nhân dòng và phân tích trình tự nucleotide vùng mã ITS-rDNA của chủng nấm phân hủy sinh học cellulose". *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, 161 (1): tr. 95-100, 2017..

[7]. Nguyễn Thị Thu Hiền, Trịnh Đình Khá, "Đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gene 28S-rRNA của loài nấm liên quan đến bệnh thối quả vải tại Lục Ngạn-Bắc Giang", *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 4: tr. 119-123, 2017.

[8]. Vũ Thị Minh Đức, Thực tập vi sinh vật, Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội, 2001.

[9]. Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M.E., Ludwig W. & Suzuki K, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 5, parts A and B, Springer-Verlag, New York, NY, 2012.

[10]. Sambrook J. and Russell D.W., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

[11]. Basic Local Alignment Search Tool, truy cập tại <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 6/2019

