

## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH LOẠI CHỦNG VI KHUẨN BHN2 SINH MÀNG CELLULOSE VI KHUẨN

Dương Minh Lam<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Thùy Vân<sup>1</sup>, Đinh Thị Kim Nhung<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường đại học Sư phạm Hà Nội, \*duong.minhnam@gmail.com

<sup>2</sup>Trường đại học Sư phạm Hà Nội 2

**TÓM TẮT:** Màng cellulose vi khuẩn (màng BC) đã và đang được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khoa học, công nghệ khác nhau. Tuy nhiên, những nghiên cứu, ứng dụng màng BC ở Việt Nam vẫn còn rất mới mẻ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn BHN2 từ 12 chủng vi khuẩn phân lập từ bia hơi Hà Nội. BHN2 có khả năng sinh màng cellulose có đặc tính trong, nhẵn, đồng đều, dai, có khả năng thấm nước tốt phù hợp với các tiêu chí ứng dụng trong điều trị bỏng. Môi trường phù hợp cho sự hình thành màng có thành phần  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 2 g, nước dừa già 1.000 ml. Màng bắt đầu được hình thành từ ngày thứ 2 và ổn định vào ngày thứ 4. Kết quả phân tích trình tự gen mã hóa 16S rRNA cho thấy, chủng BHN2 thuộc loài *Gluconacetobacter intermedius* với độ tương đồng 99,8% và được gọi là *G. intermedius* BHN2. Nhờ khả năng hình thành màng với nhiều đặc tính quý, chủng này có tiềm năng ứng dụng lớn trong sản xuất màng trị bỏng.

**Từ khóa:** *Gluconacetobacter intermedius*, màng cellulose vi khuẩn, màng sinh học.

### MỞ ĐẦU

Màng cellulose vi khuẩn được tổng hợp bởi một số chi vi khuẩn phổ biến như *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina* và *Zoogloea*.

Hiện nay, họ Acetobacteriaceae có 10 chi, trong đó *Gluconacetobacter* là chi duy nhất có khả năng tổng hợp cellulose [9]. Các thành viên thuộc chi *Acetobacter* trước đây có khả năng sinh màng BC đều được chuyển sang chi *Gluconacetobacter* dựa trên nghiên cứu trình tự gen mã hóa 16S rRNA và đặc tính sinh màng.

Cellulose vi khuẩn được cấu tạo bởi chuỗi  $\beta$ -1,4 glucopyranose mạch thẳng; có đường kính sợi nhỏ hơn 100 Å [4], nhỏ hơn rất nhiều so với các sợi cellulose của thực vật (1/100) [1, 4], có khả năng kết tinh cao (60%), độ polymer hóa lớn, độ bền cơ học cao, khả năng thấm hút nước tốt [10]. Các đặc điểm trên đã cho phép màng BC được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực công nghệ khác nhau như màng phân tách, dây đỡ sợi truyền quang, chiếu chỉnh độ nhớt dung dịch, thực phẩm thay thế, mỹ phẩm, màng thay thế trong điều trị bỏng, hệ thống dẫn thuốc [2, 7].

Ở Việt Nam, nghiên cứu và ứng dụng màng BC đã được bắt đầu từ những năm

2000. Những nghiên cứu trong nước bước đầu đã thành công trong tuyển chọn chủng có đặc tính quý, sản xuất thử nghiệm màng BC và thử nghiệm ứng dụng làm bao bì, gạc và mặt nạ.

Ở vi khuẩn, đoạn gen 16S rRNA được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu định loại trong thời gian dài, tạo nên cơ sở dữ liệu trình tự phong phú trong ngân hàng gen. Các trình tự mỗi được sử dụng phổ biến được công bố. Công nghệ tổng hợp trình tự nucleotide hóa học phát triển mạnh tạo điều kiện thuận lợi cho việc thực hiện nghiên cứu ở khắp nơi trên thế giới kể cả ở các nước có trình độ khoa học, thiết bị vừa phải [5].

Việt Nam có độ đa dạng sinh học rất cao. Tuy nhiên, hiện nay chúng ta chưa sử dụng và phát huy triệt để tiềm năng của các nguồn gen nội địa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập, nghiên cứu một số đặc điểm và phân loại chủng vi khuẩn có khả năng sinh màng BC chất lượng tốt, có tiềm năng ứng dụng cao và định loại chủng bằng phân tích trình tự gen mã hóa 16S rRNA. Đây là một phần kết quả của đề tài trọng điểm cấp Bộ Giáo Dục và Đào Tạo.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Vật liệu:** mẫu bia hơi Hà Nội.

*Môi trường phân lập* (MT1): có thành phần

như sau: glucose: 20 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 2 g, pepton: 5 g, cao men: 5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 2 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 3 g, acetic 2%, nước cất: 1.000 ml, pH 5.5.

**Môi trường tạo màng:** MT2 (glucose 20 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, nước máy 1.000 ml), MT3 (glucose 20 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, peptone 5 g, nước máy 1.000 ml), MT4 (glucose 0g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, nước dừa già 1.000 ml), MT5 ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, nước mía 1.000 ml), MT6 (glucose 20 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, cao men 5 g, nước máy 1.000 ml), MT7 (glucose 20 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, pepton 5 g, cao men 5 g, nước máy 1.000 ml).

### Phương pháp

#### Phương pháp phân lập và tuyển chọn

Phân lập vi khuẩn theo phương pháp pha loãng tới hạn [6].

#### Phương pháp xác định khả năng chuyển hóa ethanol thành acid acetic

Nuôi cấy chủng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường bao gồm (gam/L): cao nấm men: 10 g, ethanol: 10%-15% (vol/vol), nước máy: 1.000 ml, pH 6,8-7,0, Blue Bromophenol (BPB) 0,04%: 20 ml. Khi có mặt của acid acetic môi trường sẽ chuyển từ màu xanh sang vàng.

#### Xác định khả năng sinh màng BC

Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường dịch thể ở nhiệt độ 28-30°C trong vòng 3-4 ngày, quan sát sự hình thành màng. Kiểm tra và đánh giá chất lượng màng thông qua màu sắc, độ dày, trạng thái bề mặt và độ dai.

#### Phương pháp tách DNA tổng số [8]

##### Khuếch đại gen (PCR) và giải trình tự gen

Việc xác định trình tự gen mã hóa đoạn 16S rRNA được thực hiện với môi xuôi là 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và môi ngược 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGAC-TT-3' với hỗn hợp PCR master mix của hãng Bioneer, Hàn Quốc. Sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng kit tinh sạch của QiaGen sau đó được gửi đi giải trình tự tại công ty Bioneer sử

dụng 2 môi trên. Trình tự cuối cùng là trình tự nhân được của hai môi xuôi và ngược.

##### Phân tích trình tự DNA

Các trình tự tương đồng trong ngân hàng gen được tìm kiếm thông qua chương trình Blast nucleotide (Blast-NCBI-Mỹ). Tập hợp dữ liệu các trình tự tương đồng được đóng hàng, so sánh sơ bộ trong phân mềm ClustalX [12]. Kết quả đóng hàng sẽ cho ra tệp định dạng có thể tối ưu hóa trong phần mềm BioEdit [3]. Sau khi có được dữ liệu trình tự đóng hàng, phân tích trình tự gen sẽ được thực hiện trong phần mềm PAUP [10]. Phân tích trình tự nucleotide của gen mã hóa 16S rRNA của chủng vi khuẩn BHN2 với các trình tự tương đồng trong ngân hàng gen của các loài thuộc cùng chi và một số chi trong họ theo phương pháp phân tích Neighbor Joining. Hai trình tự của *Bacillus amyloliquefaciens* và *B. flexus* JN033557 được sử dụng làm nhóm ngoài. Số biểu thị trên sơ đồ là tần suất bắt gặp nhánh cây trong 5.000 so sánh lặp lại.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Kết quả phân lập, tuyển chọn chủng

Từ mẫu bia hơi Hà Nội, chúng tôi đã phân lập được 12 chủng vi khuẩn có ký hiệu (BHN1-BHN12). Cả 12 chủng này được sử dụng để đánh giá khả năng sinh acid trên môi trường MT1 không chứa acetic và có bổ sung 1%  $\text{CaCO}_3$ . Các chủng sinh acid sẽ làm tan kết tủa  $\text{CaCO}_3$  và tạo thành vòng trong suốt xung quanh khuẩn lạc. Kết quả cho thấy cả 12 chủng đều có khả năng sinh acid trong môi trường MT1.

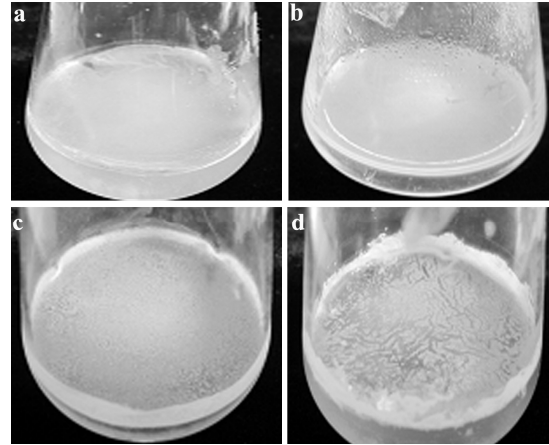
Một trong những đặc trưng cơ bản của chi *Acetobacter* và *Gluconacetobacter* là khả năng sinh acetic và sinh màng của chúng. Mục tiêu đặt ra trong nghiên cứu là tìm được chủng có khả năng sinh màng thuộc nhóm vi khuẩn acetic nên 12 chủng này được nghiên cứu khả năng ôxi hóa ethanol thành acetic. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong 4 ngày đầu tiên, tất cả các ống nuôi cấy đều chuyển sang màu vàng. Từ ngày thứ 5, màu xanh bắt đầu xuất hiện ở 6 ống (BHN1, BHN5, BHN6, BHN7, BHN10 và BHN11). Trong quá trình nuôi cấy, các chủng nghiên cứu đã sinh ra acid acetic làm thay đổi màu của Blue Bromophenol từ màu xanh lục

sang màu vàng. Tuy nhiên, một số chủng lại có khả năng ôxi hóa acetic triệt để thành CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O trong những ngày sau đó dẫn tới hiện tượng trở lại màu xanh. Các loài thuộc chi *Acetobacter* có khả năng phân giải tiếp tục acid acetic thành CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O. Sự thay đổi màu sắc là các dấu hiệu định tính cho việc định hướng chọn lựa các loài thuộc chi *Gluconacetobacter* tạo màng, các chủng BHN2, BHN3, BHN4, BHN8, BHN9 và BHN12 được lựa chọn để xác định khả năng hình thành màng.

Tất cả 12 chủng được nuôi cấy riêng rẽ trên MT1 dịch thể, không bổ sung acetic nhằm mục đích nghiên cứu khả năng tạo màng trên bề mặt. Kết quả cho thấy khả năng hình thành màng của các chủng nghiên cứu là khác nhau. Chỉ có 4 chủng có khả năng hình thành màng trên bề mặt môi trường sau 5 ngày nuôi cấy (BHN1, BHN2, BHN4, BHN9). Các chủng còn lại không có khả năng tạo thành lớp màng trên bề mặt môi trường. Tuy nhiên, 4 chủng có khả năng tạo màng cho ra chất lượng màng khác nhau. Chủng BHN1 cho lớp màng trắng, dai, mỏng, nhẵn, sản lượng thấp (hình 1a). Chủng BHN2 cho màng trắng trong, nhẵn, dai, độ dày vừa phải, có thể sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau (hình 1b).

Chủng BHN4 và BHN9 tạo ra lớp màng

mỏng, màu vàng, hoặc trắng, dễ vỡ (hình 1c, d). Với các đặc điểm của màng cellulose do 4 chủng tạo nên, chủng BHN2 được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Màng BC do các chủng a) BHN1, b) BHN2, c) BHN4, d) BHN9 tạo thành

#### Nghiên cứu môi trường thu màng BC

Chủng vi khuẩn BHN2 được nuôi cấy tĩnh trong môi trường dịch thể (MT2 đến MT7), nhiệt độ 28-30°C, trong 5 ngày. Kết quả về khả năng tạo màng và tính chất màng được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tạo màng BC ở chủng BHN2

Đặc điểm	MT2	MT3	MT4	MT5	MT6	MT7
Thời gian tạo màng (ngày)	3	3	2	4	3	2
Tính chất màng	Mỏng, khá dai	Mỏng, dai	Mỏng, rất dai, đồng nhất	Rất mỏng	Mỏng, dai	Khá dày
Màu sắc màng	Trắng sữa	Trắng ngà	Trắng sữa	Trắng ngà	Trắng ngà	Trắng ngà
Khối lượng màng (g/100 cm <sup>2</sup> )	16,5	22,3	24,8	14	21,2	28
Khả năng hút nước	Trung bình	Tốt	Rất tốt	Trung bình	Tốt	Tốt

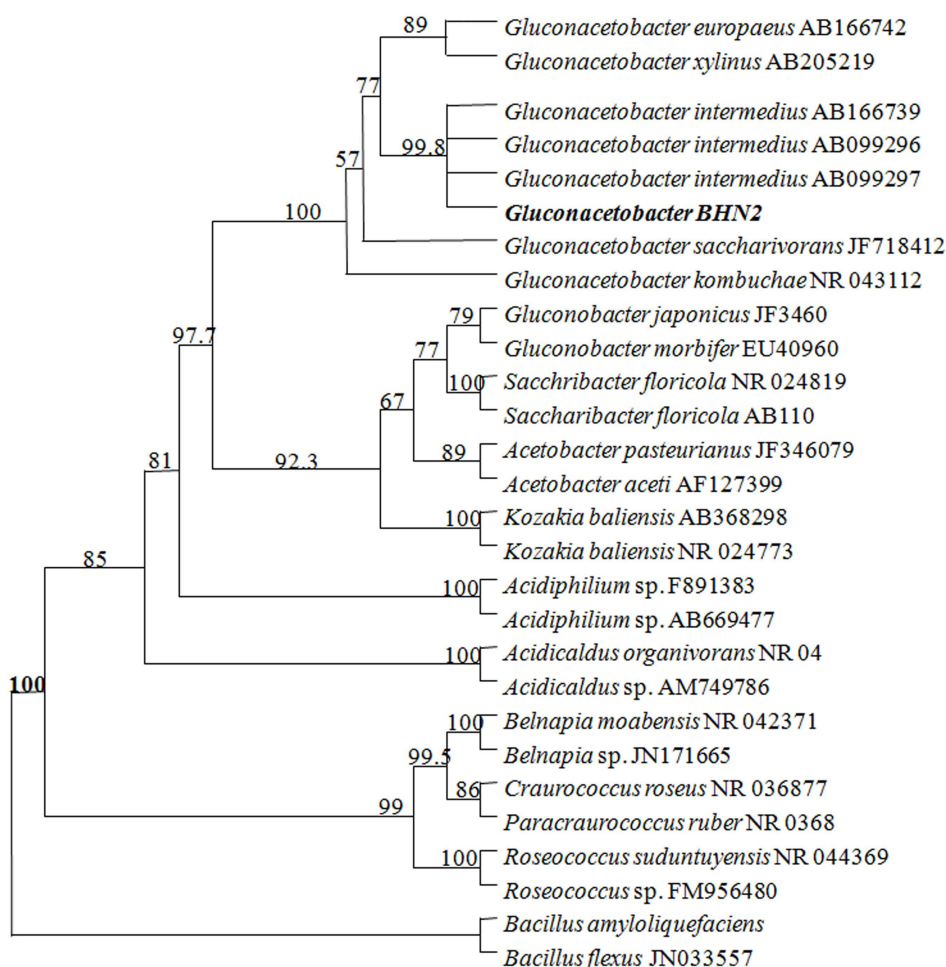
Trong số các môi trường nghiên cứu thử nghiệm, môi trường MT4 có thời gian bắt đầu hình thành màng sớm, màng mỏng, nhẵn, dai, đồng đều, khối lượng tươi đạt 24,8 g/100 cm<sup>2</sup>. Đây là môi trường thích hợp nhất cho việc sinh màng theo mục tiêu nghiên cứu sử dụng trong

điều trị vết bỏng. Môi trường MT4 có thành phần khác biệt cơ bản với các môi trường khác là có nước dừa. Trên thực tế, nước dừa chứa nhiều dinh dưỡng, các nhân tố sinh trưởng cần thiết và được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào và phù hợp với chủng BHN2 trong nghiên cứu này.

Một số kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy, chủng BHN2 tạo ra màng cellulose có bản chất tốt, có tiềm năng ứng dụng cao trong nghiên cứu và điều trị các vết bỏng, thay thế gạc thông thường. Tuy nhiên, để có thể ứng dụng được, cần xác định tên loài của chủng nghiên cứu. Cùng với một số đặc điểm hình thái, sinh lý và khả năng tạo màng cellulose, chúng tôi tiến hành định loại chủng BHN2 dựa vào phân tích trình tự gen 16S rDNA.

### Phân tích trình tự đoạn 16S rDNA

Trình tự gen mã hóa 16S rARN của BHN2 thu được từ phản ứng giải trình tự sử dụng cả môi xuôi 27F và môi ngược 1429R gồm 1349 nucleotide, khối lượng hai mạch là 821513.00 Daltons; tỉ lệ G+C = 56,19% và A+T = 43,81% với sự phân bố các nucleotide trong một mạch A, C, G, T tương ứng là 320, 310, 448 và 271. Trình tự chi tiết đã được gửi vào Ngân hàng gen NCBI với mã số JX477650.



Hình 2. Vị trí phân loại của chủng BHN2 và các loài có họ hàng gần nhau (theo phân tích trình tự gen mã hóa 16S rRNA)

Kết quả tìm kiếm các trình tự tương đồng sẵn có trong Ngân hàng gen NCBI cho thấy, trình tự nghiên cứu có mức giống 99% với trình tự của *G. intermedius* mã số AB645730,

AB099297, AB099296, AB166739 và AB166738. Tuy nhiên, để xác định chính xác trình tự nghiên cứu thuộc loài nào cần phải phân có phân tích chi tiết hơn.

Để xác định được trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng nghiên cứu thuộc vị trí phân loại nào, điều quan trọng là phải có được các trình tự của các đơn vị phân loại gần gũi. Kết quả blast ở trên cho thấy, trình tự nghiên cứu có thể là trình tự của loài thuộc chi *Gluconacetobacter*. Chính vì vậy, các trình tự của các loài thuộc chi này và một số chi trong họ nhất thiết phải có mặt trong dữ liệu phân tích (hình 2). Kết quả phân tích trình tự gen mã hóa 16S rRNA khẳng định chủng BHN2 thuộc loài *G. intermedius* với mức độ tin cậy là 99,8% của 5000 lần phân tích lặp lại.

#### KẾT LUẬN

Chủng BHN2 được phân lập từ bia hơi Hà Nội có khả năng sinh màng cellulose có đặc tính trong, nhẵn, đồng đều, dai và có khả năng thấm nước tốt phù hợp với các tiêu chí ứng dụng trong điều trị bỏng. Thành phần dinh dưỡng phù hợp cho quá trình tạo màng gồm  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, nước dừa 1000 ml. Chủng BHN2 được xác định là loài *Gluconacetobacter intermedius*. Chủng này có tiềm năng ứng dụng sản xuất màng trị bỏng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Czaja W., Romanovicz D., Brown R. B., 2004. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 11: 403-411.
2. Fu L., Zhang Y., Li C., Wu Z., Zhuo Q., Huang X., Qiu G., Zhou P., Yang G., 2012. Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method. *J. Mater. Chem.*, 22: 12349-12357.
3. Hall T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc. Acid. Symp. Ser.*, 41: 95-98.
4. Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A., 2000. Bacterial cellulose-a masterpiece of nature arts. *J. Mater. Sci.*, 35: 261-270.
5. Janda J. M., Abbott S. L., 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. *J. Clin. Micr.*, 45: 2761-2764.
6. Janssen P. H., Yates P. S., Grinton B. E., Taylor P. M., Sait M., 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2391-2396.
7. Mohamed C. I. M. A., Gumah Abadi A., Ahmad N., Haliza A. J., 2012. Bacterial cellulose film coating as drug delivery system: physicochemical, thermal and drug release properties. *Sains Malaysiana*, 41(5): 561-568.
8. Sambrook J., Russell D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
9. Sievers M., Swings J., 2005. Family II. *Acetobacteraceae*. In Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T., Garrity G. M. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, 2: 41-50. Springer, East Lansing.
10. Suwannapinunt N., Burakorn J., Thaenthane S., 2007. Effect of culture conditions on bacterial cellulose (BC) production from *Acetobacter xylinum* TISTR976 and physical properties of BC parchment paper. *Suranaree J. Sci. Technol.*, 14(4): 357-365.
11. Swofford D. L., 2004. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts U.S.A.
12. Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Higgins D. G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acid. Res.*, 24: 4876-4882.

## ISOLATION, SELECTION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAL STRAIN BHN2 PRODUCING BACTERIAL CELLULOSE

Duong Minh Lam<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thuy Van<sup>1</sup>, Dinh Thi Kim Nhung<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hanoi National University of Education

<sup>2</sup>Hanoi Pedagogical University Number 2

### SUMMARY

Bacterial cellulose membrane has been applied in both industrial and routine life. This is the first research on molecular identification of cellulose producing bacteria in Vietnam. In this paper, we selected the bacterial strain BHN2, which was capable to produce bacterial cellulose, from 12 strains isolated from Hanoi fresh beer. The strain BHN2 produced the bacterial cellulose characterized by thin, smooth, uniform and high water absorption that could be suitable to use in curing burnt injuries. The most suitable medium used for producing membrane consists of the following ingredients (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 2 g, coconut milk 1,000 ml. The result of 16S rDNA sequence analysis indicated that the strain BHN2 belongs to *Gluconacetobacter intermedius*. This strain has a high potential application in producing cellulose membrane, that used in curing burnt injuries.

*Keywords:* *Gluconacetobacter intermedius*, BHN2, bacterial cellulose (BC), biomembrance.

*Ngày nhận bài:* 7-11-2012