

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY POLYETHYLENE TỪ ĐẤT BÃI RÁC Ở TỈNH VĨNH LONG

• Nguyễn Thị Pha^(*), Trần Thị Yên Nhi^(**), Trần Đình Giới^(***)

Tóm tắt

Ứng dụng vi sinh vật phân hủy polyethylene là rất cần thiết nhằm giảm sự tích lũy polyethylene gây ô nhiễm môi trường. Nghiên cứu đã phân lập được 26 dòng vi khuẩn từ 5 mẫu đất ở bãi rác các huyện: Trà Ôn, Bình Minh và Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long trên môi trường SM có bổ sung 20 gram agar và 1 ml hexadecane. Kết quả tuyển chọn từ 26 dòng vi khuẩn phân lập đã xác định được ba dòng (LH4, BM4 và BM5) có khả năng phân hủy polyethylene tốt nhất, trong đó dòng BM5 phân hủy tốt hơn trên cả 2 loại vật liệu polyethylene là LDPE và HDPE. Dòng vi khuẩn BM5 được giải trình tự vùng gen 16S rDNA kết hợp một số phản ứng sinh hóa xác định được thuộc chi *Bacillus* sp. và có quan hệ gần với loài *Bacillus amyloliquefaciens*.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens*, HDPE, LDPE, Polyethylene.

1. Đặt vấn đề

Polyethylene (PE) là một loại chất dẻo rất thông dụng dùng làm vật liệu sản xuất các đồ gia dụng hàng ngày rất tiện lợi như túi đựng hàng đi chợ, túi đựng rác, các loại chai, bình đựng nước uống, mỹ phẩm, dầu ăn... hay màng phủ nông nghiệp. Hiện nay có 2 loại vật liệu từ PE chủ yếu được sử dụng rộng rãi gồm HDPE (High Density Polyethylene) và LDPE (Low Density Polyethylene). HDPE là loại PE có khối lượng phân tử cao (tỷ trọng từ 0,941 - 0,965 g/cm³), rất ít phân nhánh. Mạch chính của phân tử HDPE có thể chứa từ 500.000 đến 1.000.000 đơn vị C₂H₂, trong khi mạch nhánh ngắn hơn rất nhiều. Sự phân bố khối lượng phân tử trong mạch nhánh và mạch chính quyết định nhiều tính chất cơ học và hóa học của sản phẩm [1]. LDPE là loại nhựa PE tỷ trọng thấp (từ 0,910 - 0,925 g/cm³), hình thành mạch nhánh một cách ngẫu nhiên, các mạch nhánh có độ dài ngắn khác nhau [1]. Mặc dù cả 2 loại PE này đều được sử dụng rất rộng rãi và đem lại rất nhiều thuận lợi cho sinh hoạt hàng ngày và sản xuất nông nghiệp nhưng với bản chất hóa học rất khó bị phân hủy trong điều kiện tự nhiên (mất từ 500-1.000 năm mới phân hủy hoàn toàn [7]), các vật dụng bằng PE đã không ngừng được tích lũy làm ô nhiễm môi trường trầm trọng. Để cải thiện tình trạng tràn ngập rác PE trong môi trường sống, nhiều nước trên thế giới đã cấm hoặc hạn chế sử dụng các vật dụng làm từ PE, nhiều nước công nghiệp phát

triển còn sử dụng các vật liệu thay thế khác nhanh phân hủy hơn. Việt Nam cũng như nhiều nước đang phát triển hầu như chưa tìm ra giải pháp thay thế nên tình trạng tích lũy rác PE ngày càng trở nên nghiêm trọng. Ứng dụng vi sinh vật phân hủy PE là một giải pháp hiệu quả nhằm thúc đẩy quá trình phân hủy các vật liệu PE, giảm thiểu sự ô nhiễm môi trường. Nghiên cứu đã được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có thể phân hủy nhanh vật liệu PE làm cơ sở cho thử nghiệm và ứng dụng trong công nghiệp xử lý rác thải.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Năm mẫu đất ở các bãi rác thải được thu ở các huyện Long Hồ, Bình Minh và Trà Ôn thuộc tỉnh Vĩnh Long;

Một số loại túi nilon làm từ nhựa PE phổ biến trên thị trường ở Cần Thơ.

Các loại hóa chất, trang thiết bị cho phân lập, nuôi cấy các dòng vi khuẩn.

Môi trường nuôi cấy: Phân lập trên môi trường SM (Bảng 1), nhân mật số trên môi trường LB gồm 10 g/l peptone, 5 g/l yeast extract và 10 g/l NaCl [4].

Bảng 1. Thành phần môi trường SM (pH = 7,0)

Hóa chất	Hàm lượng (g/l)
NH ₄ NO ₃	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
K ₂ HPO ₄	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
KCl	0,15
Yeast extract	0,1
FeSO ₄ .6H ₂ O	0,001
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001
MnSO ₄	0,001

Nguồn: Hadad et al., 2005 [4].

^(*) Trường Đại học Cần Thơ.

^(**) Sinh viên, Trường Đại học Cần Thơ.

^(***) Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn phân hủy PE

Mẫu đất và môi trường nuôi cấy

Mẫu đất được thu từ các bãi rác ở huyện Trà Ôn, Bình Minh và Long Hồ ở độ sâu khoảng 3-5 cm. Tại mỗi địa điểm lấy nhiều mẫu ở các vị trí khác nhau như ở rìa và trung tâm của bãi rác, sau đó đồng nhất thành một mẫu bằng cách trộn đều lại với nhau. Mẫu được cho vào túi nilon, dán nhãn, ghi thời gian và địa điểm lấy mẫu. Môi trường phân lập vi khuẩn là SM có bổ sung 20 agar và 1 ml hexadecane như trong Bảng 1 [4].

Phân lập vi khuẩn

Cân 10 g mẫu đất, thêm 90 ml nước cất vô trùng, cho vào bình tam giác đã khử trùng, khuấy trộn đều mẫu bằng máy khuấy từ trong 30 phút, để yên 1 giờ, sau đó pha loãng mẫu theo dãy số thập phân 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ... Dùng micropipet hút 50 μ l mẫu (ở các nồng độ) nhỏ lên đĩa thạch chứa môi trường SM đã chuẩn bị (mỗi nồng độ 3 đĩa). Dùng que thủy tinh vô trùng trải đều mẫu lên mặt môi trường, đẩy nắp đĩa lại để trong vài phút sau đó úp ngược đĩa, ủ trong tủ ở 30°C . Chọn ra các khuẩn lạc rời và khác nhau về màu sắc, hình dạng và kích thước, cấy chuyển nhiều lần theo phương pháp cấy rìa trên các đĩa có môi trường phân lập và quan sát dưới kính hiển vi để xác định độ thuần của vi khuẩn.

2.2.2. Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có hoạt tính phân hủy PE

Kiểm tra hoạt tính phân hủy PE của các dòng vi khuẩn: Cắt nhỏ túi đựng rác PE thành sợi nhỏ chiều ngang khoảng 1,5 mm (khối lượng 280 mg/100 ml), khử trùng bằng cách ngâm 30 phút trong cồn 70% và để khô trong tủ cấy vô trùng, sau đó cho vào ống falcol chứa 25 ml môi trường SM đã khử trùng. Các dòng vi khuẩn phân lập sau khi nhận mật số trong môi trường LB trong 3 ngày (10^6 tế bào/ml) được chủng vào ống falcol chứa môi trường SM và sợi PE đã chuẩn bị sẵn (mỗi ống 3 ml dịch nuôi cấy sinh đã chuẩn về mật số 10^6 tế bào/ml bằng buồng đếm hồng cầu). Sợi PE trong ống falcon được lấy ra ngâm trong dung dịch sodium dodecyl sulfate (SDS) 2% qua đêm rồi rửa lại với nước cất trước khi làm khô trong tủ cấy vô trùng và cân để xác định phần trăm khối lượng đã bị phân hủy sau khi xử lý trong 15 và 30 ngày theo công thức:

$$W_1 (\%) = \frac{I_w - F_w}{I_w} \times 100\%$$

Trong đó:

W_1 : Phần trăm khối lượng mất đi;

I_w : Khối lượng ban đầu;

F_w : Khối lượng sau khi xử lý.

Dựa vào phần trăm khối lượng mất đi của những mảnh PE để xác định những dòng vi khuẩn có khả năng phân giải PE.

Kiểu bố trí: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (RCD) 3 lần lặp lại với 27 nghiệm thức xử lý với 26 dòng vi khuẩn so sánh với đối chứng chỉ bổ sung môi trường SM đã khử trùng không nuôi vi khuẩn.

Đánh giá hoạt tính phân hủy các loại PE thông dụng của các dòng vi khuẩn: Các dòng vi khuẩn có hoạt tính phân hủy PE tốt nhất được khảo sát khả năng phân hủy các loại vật liệu khác nhau như HDPE và LDPE với cùng phương pháp như đã trình bày ở trên. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (RCD), 3 lần lặp lại với số nghiệm thức là các dòng phân hủy PE tốt nhất so sánh với đối chứng không chủng vi khuẩn.

2.2.3. Bước đầu nhận diện dòng vi khuẩn có hoạt tính phân hủy PE cao

Xác định mối quan hệ di truyền các dòng vi khuẩn cho hiệu quả phân hủy các vật liệu HDPE và LDPE tốt nhất bằng phương pháp giải trình tự vùng gen 16S rDNA so sánh trình tự với GenBank đã công bố trên ngân hàng giữ liệu NCBI bằng công cụ BLASTN dựa trên mức độ tương đồng với các chuỗi trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu kết hợp với một số phản ứng sinh hóa khác.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập các dòng vi khuẩn phân hủy PE

Từ 5 mẫu đất ở các bãi rác được thu thập tại 3 huyện: Trà Ôn, Bình Minh và Long Hồ thuộc tỉnh Vĩnh Long đã phân lập được 26 dòng vi khuẩn. Trong tổng số các dòng vi khuẩn phân lập được thì mẫu đất ở huyện Trà Ôn có 9 dòng chiếm 34,6%; mẫu đất huyện Bình Minh được 10 dòng chiếm số 38,5% và có 7 dòng chiếm 26,9% được phân lập từ mẫu đất ở huyện Long Hồ. Kết quả phân lập được trình bày ở Bảng 1, tên các dòng vi khuẩn được đặt theo tên huyện nơi thu mẫu.

Bảng 2. Kết quả phân lập

STT	Địa điểm (huyện)	Số mẫu	Số dòng vi khuẩn	Tỉ lệ (%)
1	Trà Ôn	1	9	34,6
2	Bình Minh	2	10	38,5
3	Long Hồ	2	7	26,9
Tổng		5	26	100,0

3.2. Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có hoạt tính phân hủy PE

3.2.1. Kiểm tra hoạt tính phân hủy PE của các dòng vi khuẩn

Hai mươi sáu dòng vi khuẩn phân lập được ủ trong môi trường dinh dưỡng SM có bổ sung nguồn carbon là mảnh nhựa PE, sau thời gian ủ 15 và 30 ngày, khối lượng khô của sợi PE được lấy ra để xác định. Số liệu thu thập được xử lý thống kê và trình bày trong Bảng 3.

Kết quả thống kê trong Bảng 3 cho thấy, sau 15 ngày nuôi cấy, chỉ có 2/26 nghiệm thức được chủng vi khuẩn có khối lượng PE mất đi nhiều hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với đối (0,7581%), gồm dòng LH4 (1,1877%) và BM5 (1,3296%). Sau 30 ngày xử lý, có 3/26 nghiệm thức được chủng vi khuẩn có khối lượng mất đi nhiều hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với đối chứng (0,9454%), gồm LH4 (1,8454%), BM4 (1,6536%) và BM5 (2,0875%). Nếu trừ đi khối lượng mất đi của nghiệm thức đối chứng thì ba dòng vi khuẩn này làm mất đi khối lượng của PE từ 0,7082-1,1421% sau 30 ngày xử lý. Khả năng phân hủy trên dưới 1% khối lượng PE trong vòng 30 ngày là một con số rất có ý nghĩa khi áp dụng vào thực tế, vì thời gian phân hủy tự nhiên của PE là 500 -1000 năm [7].

Bảng 3. Kết quả khảo sát khả năng phân hủy PE sau 30 ngày

STT	Dòng vi khuẩn	Trung bình phần trăm khối lượng mất đi	
		15 ngày	30 ngày
1	TrO1	0,9982 ^{a-e}	1,1366 ^{bcd}
2	TrO2	0,9493 ^{a-h}	1,2743 ^{bc}
3	TrO3	0,7070 ^{e-i}	1,2202 ^{bcd}
4	TrO4	0,5658 ^{hi}	0,8973 ^{cd}
5	TrO5	0,8987 ^{b-i}	0,7103 ^d
6	TrO6	0,9959 ^{a-f}	0,9876 ^{cd}

7	TrO7	0,7480 ^{d-i}	1,0389 ^{cd}
8	TrO8	0,7120 ^{e-i}	0,9930 ^{cd}
9	TrO9	0,9494 ^{a-h}	1,1312 ^{cd}
10	LH1	0,7565 ^{c-i}	1,0434 ^{cd}
11	LH2	0,8552 ^{b-i}	0,8916 ^{cd}
12	LH3	0,8971 ^{b-i}	0,8501 ^{cd}
13	LH4	1,1877 ^{ab}	1,8458 ^a
14	LH5	1,0437 ^{a-e}	1,2338 ^{bc}
15	LH6	0,6131 ^{f-i}	0,9913 ^{cd}
16	LH7	1,0856 ^{a-e}	1,1768 ^{bcd}
17	BM1	1,1244 ^{a-d}	1,1748 ^{bcd}
18	BM2	0,9939 ^{a-g}	0,9008 ^{cd}
19	BM3	0,5173 ⁱ	1,0433 ^{cd}
20	BM4	1,1394 ^{abc}	1,6536 ^{ab}
21	BM5	1,3296 ^a	2,0875 ^a
22	BM6	0,8058 ^{b-i}	0,9455 ^{cd}
23	BM7	0,8481 ^{b-i}	1,1311 ^{cd}
24	BM8	0,6098 ^{ghi}	1,2265 ^{bcd}
25	BM9	0,9960 ^{a-f}	0,9485 ^{cd}
26	BM10	0,8019 ^{c-i}	1,0372 ^{cd}
27	Đối chứng	0,7581 ^{c-i}	0,9454 ^{cd}
P-value		0,000	0,000
CV(%)		13,65	14,39

Ghi chú: TrO: Trà Ôn; BM: Bình Minh; LH: Long Hồ; Các giá trị trong cùng một cột có cùng ký tự thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1%.

Theo nghiên cứu của Botre *et al.* (2015) phân lập bảy dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy LDPE từ 0,4-2,8%, trong đó có 2 dòng OSC1 và OCS3 có khả năng phân hủy là 0,4% thấp hơn 3 dòng vi khuẩn trong nghiên cứu này; ba dòng OCS5, OCS4 và CC1 từ 0,7-1,2% tương đương với khả năng phân hủy của ba dòng LH4, BM4 và BM5 nhưng có 2 dòng M1 và SWG cho kết quả cao hơn với khả năng phân hủy nhựa là 2,5% và 2,8% [2]. Tương tự kết quả nghiên cứu của Kavitha *et al.* (2014), các dòng vi khuẩn phân lập phân hủy từ 1,29-1,3% lượng nhựa LDPE trong vòng 30 ngày [8]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này thấp hơn nhiều so với báo cáo của Nada và Sauhu (2010) có các dòng phân lập được với khả năng phân hủy từ 33-40,5% lượng nhựa PE [9]. Hussein *et al.* (2015) phân lập được 169 dòng vi khuẩn từ 64 mẫu đất ở các bãi rác thải nhựa, nhưng chỉ có 22 dòng là có hoạt tính phân giải PE chiếm tỉ lệ 13,01% trên tổng

số dòng vi khuẩn phân lập được [5]. Qua đây cho thấy khả năng phân lập được các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy PE là rất thấp. Qua kết quả kiểm tra hoạt tính phân hủy PE của 26 dòng vi khuẩn phân lập được so sánh với các nghiên cứu trước đây, ba dòng vi khuẩn LH4, BM4 và BM5 được chọn để đánh giá hiệu quả phân hủy PE trong các vật liệu khác nhau là HDPE và LDPE.

3.2.2. Đánh giá hoạt tính phân hủy các loại PE thông dụng của các dòng vi khuẩn

Số liệu về khả năng phân hủy các loại PE khác nhau của các dòng vi khuẩn sau 15 và 30 ngày được ghi nhận và tổng hợp trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát khả năng phân hủy các loại PE của 3 dòng vi khuẩn

STT	Dòng vi khuẩn	Trung bình phần trăm khối lượng mất đi			
		Vật liệu HDPE		Vật liệu LDPE	
		15 Ngày	30 Ngày	15 Ngày	30 Ngày
1	LH4	1,3774 ^a	1,6486 ^a	1,0884	1,2778 ^{ab}
2	BM4	1,1808 ^{ab}	1,2261 ^{ab}	1,0456	1,2350 ^{ab}
3	BM5	1,4700 ^a	1,6114 ^a	1,1381	1,6036 ^a
4	Đối chứng	0,9029 ^b	0,9947 ^b	0,8555	0,9018 ^b
P-value		0,001	0,014	0,201	0,004
CV%		13,25	15,4	14,86	12,57

Ghi chú: Xem Bảng 3.

Kết quả Bảng 4 cho thấy, sau 15 ngày nuôi cấy, có hai dòng vi khuẩn cho phần trăm khối lượng HDPE mất đi lớn hơn và khác biệt có ý nghĩa ở mức 1% với đối chứng (0,9029%) là LH4 (1,3774%) và BM5 (1,4700%) nhưng khác biệt không có ý nghĩa với vật liệu LDPE. Sau 30 ngày nuôi cấy, chỉ có nghiệm thức chủng dòng vi khuẩn BM5 là luôn cho phần trăm khối lượng mất đi của cả hai loại vật liệu HDPE và LDPE (1,6036-1,6114%) lớn hơn và khác biệt có ý nghĩa ở mức 1% so với đối chứng (0,9018-0,9947%). Như vậy dòng vi khuẩn BM5 cho hoạt tính phân hủy ổn định cả trên 2 loại vật liệu PE thông dụng là HDPE và LDPE.

3.3. Định danh dòng vi khuẩn BM5

3.3.1. Nhuộm Gram và khảo sát một số đặc tính sinh hóa

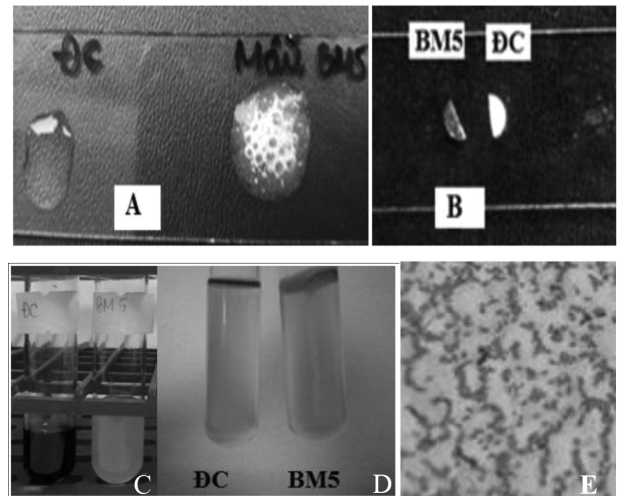
Các kết quả nhuộm Gram, thử nghiệm catalase, amylase, oxidase và khả năng di động của dòng vi khuẩn BM5 được ghi nhận và trình bày ở Bảng 5 và các Hình 1.

Bảng 5. Kết quả nhuộm Gram, thử nghiệm catalase, amylase, oxidase và khả năng di động của dòng vi khuẩn BM5

Thử nghiệm	Kết quả
Nhuộm Gram	+
Catalase	+
Oxidase	+
Amylase	+
Khả năng di động	+

Ghi chú: dấu "+" thử nghiệm dương tính; "-" thử nghiệm âm tính.

Kết quả Bảng 5 và Hình 1 cho thấy, dòng vi khuẩn BM5, có phản ứng dương tính với catalase (tạo bọt khí khi thử với hydrogen peroxide; Hình 1A) và có khả năng tổng hợp enzyme cytochrom C oxidase (làm giấy thử oxidase chuyển sang màu xanh tím; Hình 1B).



Hình 1. Khảo sát đặc điểm của chủng BM5.

Khi thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase thì dòng vi khuẩn BM5 cho kết quả dương tính, tức là làm mất màu hỗn hợp tinh bột và iod (Hình 1C). Dòng vi khuẩn BM5 có khả năng di động xung quanh đường cấy, làm đục môi trường ống thạch mềm NA 0,3% (Hình 1D), là vi khuẩn Gram dương, nhuộm màu tím của Gentian (Hình 1E).

3.3.1. Giải trình tự vùng gen 16S rDNA của dòng vi khuẩn BM5 so sánh với GenBank

Sản phẩm PCR vùng gen 16S rDNA của dòng vi khuẩn có hiệu quả phân hủy PE tốt nhất là BM5 được gửi định danh tại Công ty trách nhiệm hữu hạn một thành viên Sinh hóa phù sa. Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn này có chiều dài là 1112 nucleotide với trình tự như sau:

ACAGATGGGAAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
 GTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC
 GGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCARACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACT
 TACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGGTAACGGCTCACCAAGG
 CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
 TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGT
 TGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAA
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
 ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGA
 GTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
 GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAG
 CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
 GATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
 AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
 GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
 CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG
 GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGCTTGTCTCAGCTTCGTGCTGAGATGTTG
 GTTAAGTCCGCACGAGCGCAACCCTTGATCCTAGCTGGCTAGCATCAGTGGGTCA
 CTCTTACGTACTGACGATGACCATAACC

Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự của cơ sở dữ liệu GenBank trên NCBI bằng công cụ Blastn (Hình 2).

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments 0 Download Graphics Database View Results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus amyloqueliciens strain MP4.1014.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1929	1929	100%	0.0	98%	NR_112846.1
Bacillus amyloqueliciens strain NBR2.15535.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1929	1929	100%	0.0	98%	NR_112845.1
Bacillus amyloqueliciens strain BCRC.11601.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1929	1929	100%	0.0	98%	NR_116022.1
Bacillus amyloqueliciens strain NBR2.15535.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1929	1929	100%	0.0	98%	NR_041455.1
Bacillus methylotrophicus strain CMB205.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	98%	NR_116240.1
Bacillus vallismortis strain DSM 11021.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	98%	NR_024690.1
Bacillus vallismortis strain NBR2.101728.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1914	1914	100%	0.0	98%	NR_116240.1
Bacillus subtilis strain 168.16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1912	1912	100%	0.0	98%	NR_102782.1
Bacillus amyloqueliciens subsp. plantarum strain C784.1.16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1912	1912	100%	0.0	98%	NR_072005.1
Bacillus atrophaeus strain NBR2.15539.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1908	1908	100%	0.0	98%	NR_112721.1

Hình 2. Kết quả so sánh trình tự gen trên GenBank

So sánh với các trình tự trong cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI bằng công cụ BLAST, kết quả cho thấy trình tự đoạn gene 16S rDNA của dòng vi khuẩn BM5 có độ tương đồng 98% với trình tự của các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* (như *Bacillus amyloqueliciens*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*) (Hình 2).

Các loài vi khuẩn này có quan hệ di truyền rất gần nhau và đều có các đặc tính hình thái và sinh hóa giống như dòng BM5 của nghiên cứu này. Đó là chúng đều là vi khuẩn Gram dương, phản ứng

dương tính với catalase, amylase, oxidase và có khả năng di động do vậy không thể xác định chính xác dòng BM5 thuộc loài nào nhưng các kết quả nghiên cứu tìm được các loài vi khuẩn có khả năng phân hủy polyetylen thì chỉ tìm thấy được 2 loài có khả năng này là *Bacillus subtilis* [6] và *Bacillus amyloqueliciens* [3].

Trong nghiên cứu này dòng BM5 là vi khuẩn có khả năng phân hủy polyetylen được phân lập từ bãi rác thải ở các huyện của tỉnh Vĩnh Long nên có khả năng là *B. subtilis* hoặc *B. amyloqueliciens*. Tuy nhiên, nếu xét kết quả so sánh trình tự vùng gen 16S rDNA thì dòng BM5 có số điểm Max score lớn nhất (1929) so với các loài còn lại (≤ 1917). Chỉ số này cho biết dòng BM5 đã được so sánh với 2¹⁹²⁹ vùng gen 16S rDNA của các loài vi khuẩn và xạ khuẩn có trong ngân hàng gen nên có độ chính xác cao hơn so với các loài còn lại, mặc dù cùng có 100% query coverage và 98% identity. Từ kết quả giải trình tự, các đặc tính hình thái, sinh hóa kết hợp với các nghiên cứu công bố trước đây về vi khuẩn phân hủy PE cho thấy dòng vi khuẩn BM5 thuộc chi *Bacillus* và có quan hệ gần nhất với loài *Bacillus amyloqueliciens*.

4. Kết luận và đề nghị

4.1. Kết luận

Từ 5 mẫu đất thu ở bãi rác các huyện thuộc tỉnh Vĩnh Long đã phân lập được 26 dòng vi khuẩn. Kết quả tuyển chọn phân hủy PE đã xác định được dòng

BM5 có hoạt tính phân hủy ổn định trên cả 2 loại vật liệu HDPE và LDPE với tỷ lệ phân hủy khoảng hơn 1,6% khối lượng sau 30 ngày xử lý. Bước đầu nhận diện dòng vi khuẩn này bằng một số đặc tính hình thái, sinh hóa và giải trình tự vùng gen 16S rDNA so sánh với ngân hàng gen NCBI xác định được dòng vi khuẩn BM5 có quan hệ gần loài *Bacillus amyloliquefaciens*.

4.2. Đề nghị

Khảo sát sự khác biệt về trình tự DNA trong bộ gen dòng vi khuẩn BM5 so sánh với các loài *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus* bằng kỹ thuật đọc trình tự thế hệ mới, hay phân tích sự khác biệt về acid béo để có thể xác định chính xác dòng vi khuẩn BM5 tới cấp độ loài.

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân hủy PE, nhằm tối ưu hóa điều kiện phân hủy PE.

Mở rộng địa điểm thu mẫu nhằm tăng xác suất tìm được những dòng vi sinh vật có hoạt tính mong muốn (nấm, vi khuẩn hay xạ khuẩn)/.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Arutchelvi, J., M. Sudhakar, A. Arkatkar, M. Doble, S. Bhaduri, D. Ambika, B. Mukesh, U. Sumit and V. Parasu (2008), "Biodegradation of polyethylene and polypropylene", *Indian Journal of Biotechnology*, (7), p. 9-22.
- [2]. Botre, S., P. Jadhav, L. Saraf, K. Rau and A. Wagle. (2015), "Screening and Isolation of Polyethylene degrading Bacteria from various sources", *International Research Journal of Environment Science*, (4), p. 58-61.
- [3]. Das, M. P. and S. Kumar (2015), An approach to low-density polyethylene biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens*", *3 Biotech*, 5 (1), p. 81-86.
- [4]. Hadad, D., S. Geresh and A. Sivan (2005), "Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *BreviBacillus borstelensis*", *Journal of applied microbiology*, (98), p. 1093-1100.
- [5]. Hussein, A. A., I. K. Al-Mayaly and S. H. Khudeir (2015), "Isolation, Screening and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) degrading bacteria from contaminated soil with plastic wastes", *Mesopotamia Environmental Journal*, 1 (4), p. 1-14.
- [6]. Ibiene, A. A., H. O. Stanley, and O. M. Immanuel (2013), "Biodegradation of Polyethylene by *Bacillus* sp. Indigenous to the Niger Delta Mangrove Swamp", *Nig Journal Biotech*, (26), p. 68-79.
- [7]. Kale, S. K., A. G. Deshmukh, M. S. Dudhare and V. B. Patil (2015), "Microbial degradation of plastic: a review", *J. Biochem Tech*, 6 (1), p. 952-961.
- [8]. Kavitha R., A. K. Mohanan and V. Bhuvaneswari (2014), "Biodegradation of low density polyethylene by bacteria isolated from oil contaminated soil", *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, (4), p. 601-610.
- [9]. Nanda S. and S. S. Sahu (2010), "Biodegradability of polyethylene by *BreviBacillus*, *Pseudomonas*, and *Rhodococcus* spp.", *New York Science Journal*, (3), p. 95-98.
- [10]. Roberts M. S., L. K. Nakamura, and F. M. Cohan (1996), "*Bacillus vallismortis* sp. nov., a Close Relative of *Bacillus subtilis*, Isolated from Soil in Death Valley, California", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 (2), p. 470-475.

ISOLATING AND SELECTING POLYETHYLENE BIODEGRADATING BACTERIA FROM GARBAGE DUMPS OF VINH LONG PROVINCE

Summary

Applying microbial polyethylene biodegradation is essential to reduce the accumulation of polyethylene pollution. This study has isolated 26 bacteria strains from 5 soil samples of garbage dumps collected from three districts of Vinh Long Province, namely Tra On, Binh Minh and Long Ho. They were isolated on the SM medium supplemented with 20 grams agar and 1 ml hexadecane. On 26 of them, three polyethylene biodegradable bacterial strains (LH4, BM4 and BM5) were the best ones. On both popular polyethylene materials of LDPE and HDPE, BM5 strain worked well. It was then selected to define its taxonomy by sequencing of the 16S rDNA gene region combined with some biochemical reactions, which identified the BM5 bacterial strain belonging to *Bacillus* genus and closely related with *Bacillus amyloliquefaciens* species.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, HDPE, LDPE, Polyethylene.

Ngày nhận bài: 20/3/2017; Ngày nhận lại: 03/8/2017; Ngày duyệt đăng: 12/10/2017.