



PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI TINH BỘT

Trần Thị Giang¹, Trịnh Hữu Nghĩa¹, Nguyễn Thị Huỳnh Nghi², Võ Dương Lan Anh¹ và Đỗ Tấn Khang^{1*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Phòng Quản lý Khoa học, Sở Khoa học và Công nghệ Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đỗ Tấn Khang (email: dtkhang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 25/06/2022

Ngày duyệt đăng: 16/07/2022

Title:

Isolation and selection of starch degrading bacteria

Từ khóa:

Bacillus, enzyme amylase, ST25, vi khuẩn phân giải tinh bột

Keywords:

Amylolytic Bacteria, *Bacillus*, enzyme amylase, ST25

ABSTRACT

The study was conducted to select starch degrading bacterial strains based on amylase enzyme production. Starch samples prepared from cooked rice (ST25 cultivar) were placed in different sites in Ninh Kieu district, Can Tho city to attract bacteria. After 3 days, bacterial strains were isolated from the samples using Amylolytic Bacteria medium. The strains were tested for starch degrading ability based on agar diffusion method. The high ability strains were measured the starch degrading ability by DNS method. The results showed that there were 20 isolated bacterial strains in which 10 strains have spherical shape and 10 strains have rodlike shape. All of strains are Gram positive. After 72 hours of culture in amylolytic bacteria medium, three bacterial strains KTXA1, VB-34, VB-42 showed the highest activity with the degrading zones from 14,33 mm to 18,33 mm. Based on the results from the DNS method the strain KTXA1 was selected which showed the highest starch degrading ability, producing the reduced sugar of about 2.9 to 3.07 mg/mL at 24 to 96 hours. The strain was identified as *Bacillus* sp. based on 16S rRNA sequence.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn các dòng vi khuẩn có năng phân giải tinh bột. Các mẫu tinh bột nấu chín từ gạo ST25 được đặt ở nhiều vị trí khác nhau ở thành phố Cần Thơ để thu hút vi khuẩn. Sau 3 ngày, mẫu được phân lập bằng môi trường Amylolytic Bacteria. Các dòng vi khuẩn được định tính khả năng phân giải tinh bột bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch và được định lượng bằng phương pháp dinitrosalicylic acid. Kết quả phân lập được 20 dòng có khả năng phân giải tinh bột gồm 10 dòng có tế bào hình que, 10 dòng có tế bào hình cầu và tất cả đều Gram dương. Kết quả ghi nhận dòng vi khuẩn KTXA1, VB-34 và VB-42 có khả năng phân giải tinh bột cao, với đường kính phân giải từ 14,33 mm – 18,33 mm. Dòng KTXA1 có khả năng phân giải cao nhất với hàm lượng đường khử từ 2,9 đến 3,07 mg/mL tại thời điểm 24 đến 96 giờ. Kết quả định danh dòng KTXA1 có độ tương đồng với vi khuẩn *Bacillus* sp. dựa vào trình tự gene 16S rRNA.

1. GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long là một trong những vùng có nghề sản xuất rượu lâu đời. Nguyên liệu dùng để nấu rượu thường là gạo, nếp, khoai mì (Dung và ctv., 2012), trong đó gạo là một trong những loại nguyên liệu phổ biến. Với những ưu điểm như hạt gạo thon dài, bóng bẩy, khi cơm chín có mùi thơm của lá dứa và cơm non, hạt cơm mềm dẻo, gạo ST25 được xem là nguồn nguyên liệu tiềm năng trong việc sản xuất rượu gạo đặc trưng. Về dinh dưỡng, gạo ST25 hoàn toàn không chứa cholesterol, chứa hàm lượng cao các vitamin và khoáng chất như magie, canxi, chất xơ. Vì vậy, việc nghiên cứu sử dụng nguồn nguyên liệu này để sản xuất rượu, tạo ra loại rượu thơm đặc trưng và chất lượng là vấn đề cần thiết. Đường hóa và lên men rượu là hai giai đoạn chủ yếu trong quy trình sản xuất rượu lên men. Giai đoạn đường hóa là một quá trình biến đổi hóa học, chuyển tinh bột thành đường nhờ hoạt động của các enzyme amylase thủy phân tinh bột sẵn có trong nguyên liệu hay sản sinh từ vi sinh vật (Amira et al., 2012; Dung và ctv., 2012). Việc sử dụng các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa tinh bột thành đường giúp quá trình đường hóa diễn ra nhanh chóng và hiệu quả hơn (Toàn và ctv., 2008; Hiệp & Lý, 2012). Từ nhu cầu thực tiễn nêu trên đề tài được thực hiện nhằm mục tiêu phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn có năng phân giải tinh bột thành đường nhờ sinh tổng hợp enzyme amylase.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập vi khuẩn

Xử lý mẫu: 1 kg gạo ST25 được rửa sạch và cho thêm vào mẫu 2 lít nước, sau đó khử trùng nhiệt ướt với nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

Bố trí mẫu: 200 g mẫu đã được xử lý được cân và cho vào hộp nhựa đã được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% và bố trí ở các địa điểm khác nhau tại Khu 2 (Kí túc xá, Khu vườn bàng, Khu vực Hội trường rùa, Khoa Thủy sản và Hành lang Viện Công nghệ sinh học), Trường Đại học Cần Thơ.

Thu mẫu: Sau 3 ngày, mẫu gạo được thu về phòng thí nghiệm. Cân 5 g gạo cho vào bình tam giác (250 mL), thêm vào 45 mL buffer phosphate đã được khử trùng để nguội, lắc đều mẫu trên máy lắc tốc độ 140 vòng/ phút trong thời gian 60 phút.

Phân lập vi khuẩn: mẫu được pha loãng đến nồng độ 10^{-4} , trải 50 μ L dịch mẫu ở nồng độ 10^{-3} và 10^{-4} trên môi trường thạch Amylolytic Bacteria (AB) gồm NH_4Cl (9 g), K_2HPO_4 (0,5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

(0,5 g), CaCO_3 (3 g), Glucose (20 g), tinh bột (10 g), agar (20 g), pH = 7.0 và ủ ở nhiệt độ phòng (28-30°C) trong thời gian 24 giờ. Những khuẩn lạc đơn được chọn có hình thái khác nhau để cấy chuyển cho đến khi đạt được dòng thuần. Thử nghiệm sơ bộ khả năng phân giải tinh bột của các dòng vi khuẩn phân lập được bằng cách mỗi dòng vi khuẩn thu một ít sinh khối chấm lên môi trường thạch AB. Đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng, sau 3 ngày tiến hành cạo bỏ phần sinh khối và nhuộm với thuốc nhuộm Gram's Iodine. Xác định những dòng vi khuẩn cho vòng sáng xung quanh khuẩn lạc để bố trí thí nghiệm tiếp theo.

Mô tả hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn, bao gồm: Hình dạng, màu sắc, kích thước, độ nổi, dạng bia của khuẩn lạc, kiểm tra Gram bằng KOH 3% và hình dạng tế bào.

2.2. Khảo sát khả năng phân giải tinh bột bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Bố trí thí nghiệm: Dùng que cấy thu khuẩn lạc các dòng vi khuẩn cần khảo sát chấm thành những điểm khuẩn lạc trên môi trường thạch AB với hàm lượng tinh bột bổ sung vào môi trường là 1%. Sau 3 ngày ủ, enzyme amylase được tổng hợp và thủy phân tinh bột và tạo thành một vòng phân giải. Dung dịch Gram's Iodine được rót lên mặt thạch, tráng đều và quan sát để kiểm tra sự thủy phân tinh bột. Dựa vào tỉ lệ giữa đường kính của vòng thủy phân với đường kính của khuẩn lạc đánh giá và tuyển chọn các vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột cao để tiếp tục bố trí thí nghiệm.

Chỉ tiêu đánh giá: Đường kính vòng phân giải tinh bột (ĐKPG) của các chủng vi khuẩn được tính theo công thức:

$$\text{ĐKPG} = D - d$$

Trong đó:

D: đường kính vòng trong suốt (mm)

d: đường kính khuẩn lạc (mm).

2.3. Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS (Acid Dinitrosalicylic)

Bố trí thí nghiệm: Thu sinh khối các dòng vi khuẩn tuyển chọn ở Mục 2.2 cho vào dung dịch đệm phosphate, trộn đều để sinh khối vi khuẩn hòa tan trong dung dịch đệm. Độ đục của dịch vi khuẩn được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nM. Mật số vi khuẩn được hiệu chỉnh về 10^8 tế bào/mL bằng cách hiệu chỉnh giá trị OD về 0,8.

Dung dịch được hút 3 mL cho vào 27 mL môi trường LB bổ sung 1% tinh bột. Hỗn hợp được nuôi lắc 120 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ phòng. Quy trình được thực hiện tương tự với nghiệm thức đối chứng âm nhưng không chủng vi khuẩn. Tại các thời điểm 24, 48, 72 và 96 giờ nuôi cấy, mẫu được thu để xác định hàm lượng đường khử. Mẫu được đem ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Phần dịch trong được chuyển sang tuýp mới và được đun sôi 5 phút, sau đó mẫu được làm nguội ở nhiệt độ phòng và được đo ở bước sóng 540 nM (Lan et al., 2013).

Đối với mẫu vi khuẩn: Cho 1 mL mẫu sau ly tâm vào ống nghiệm chứa 3 mL thuốc thử DNS. Đun sôi cách thủy hỗn hợp trong thời gian 5 phút. Sau đó, hỗn hợp được để nguội ở nhiệt độ phòng trong thời gian 5 phút. Nếu xuất hiện màu đậm hơn dãy đường chuẩn thì tiến hành pha dịch khuẩn sau ly tâm 5 lần. Mẫu được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 540 nM. Glucose với nồng độ 0 đến 1 mg/mL được sử dụng để dựng đường chuẩn.

Chỉ tiêu đánh giá: Từ phương trình đồ thị đường chuẩn, ta tính được mg/mL đường khử trong dung dịch mẫu vi khuẩn pha loãng. Sau đó, kết quả được nhân với hệ số pha loãng để được lượng đường trong 1 mL dung dịch gốc.

2.4. Định danh vi khuẩn bằng trình tự gene 16S rRNA

DNA sau khi được ly trích được khuếch đại vùng 16S rRNA thông qua phản ứng PCR bởi cặp mồi 27F và 1492R (Barker et al., 2003).

Trình tự mồi xuôi là 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Trình tự mồi ngược 1492R là: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'.

Thành phần của một phản ứng PCR với tổng thể tích 30 µL như sau: 12 µL Master Mix, 0,5 µL mồi xuôi (10 µM), 0,5 µL mồi ngược (10 µM), 15 µL BiH₂O và 2 µL DNA tinh sạch và 0,2 µL Taq DNA polymerase (1 U/µL). Phản ứng PCR gồm 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước chính như sau: Bước 1 là giai đoạn biến tính (nhiệt độ 95°C trong thời gian 40 giây); Bước 2 là giai đoạn gắn mồi (nhiệt độ 55°C trong thời gian 30 giây); Bước 3 là giai đoạn kéo dài (nhiệt độ khoảng 72°C trong thời gian 45 giây), sau đó là giai đoạn nhiệt độ 72°C được thực hiện trong 10 phút. Sau khi kết thúc phản ứng sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% bằng hệ thống điện di RunOne (Mỹ).

Sau khi có kết quả phân tích trình tự DNA từ công ty Genlab, chủng vi khuẩn được nhận diện dựa vào sự tương đồng giữa kết quả của trình tự này khi so sánh với trình tự của các chủng vi khuẩn được công bố trên ngân hàng gene National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng chương trình Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

2.5. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Kết quả được trình bày bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Phần mềm Minitab 16 được sử dụng để phân tích thống kê số liệu thí nghiệm với đánh giá sự khác biệt giữa các mẫu với p<0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

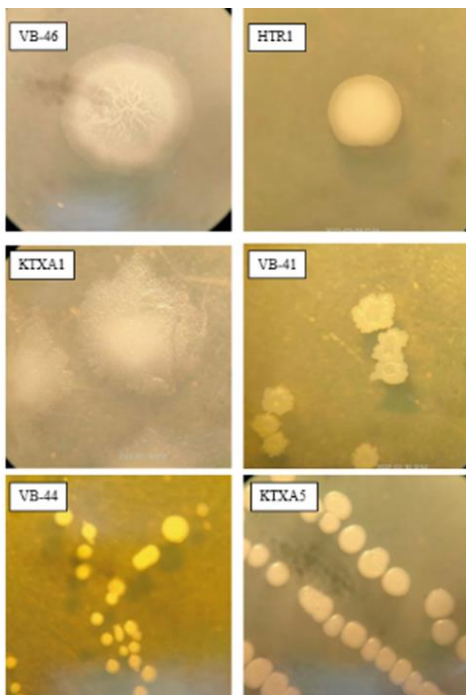
3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn

Kết quả cho thấy tất cả các vi khuẩn đều phát triển mạnh, khuẩn lạc của từng vi khuẩn có các đặc điểm hình thái khác nhau về độ nổi, dạng bìa, màu sắc, hình dạng, kích thước, bề mặt được mô tả ở Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của 20 dòng vi khuẩn phân lập được

STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc					Đặc điểm tế bào		
		Dạng khuẩn lạc	Độ nổi	Dạng bìa	Màu sắc	Bề mặt	Đường kính (mm)	Hình dạng	Gram
1	HL	Tròn	Lài	Bìa nguyên	Trắng đục	Khô trơn	3 ÷ 4	Cầu	+
2	HTR1	Tròn	Lài	Bìa nguyên	Trắng đục	Khô trơn	3 ÷ 4	Cầu	+
3	HTR2	Tròn	Mô	Bìa nguyên	Trắng đục	Khô trơn	2 ÷ 3	Cầu	+
4	HTR3	Tròn	Mô	Bìa nguyên	Trắng đục	Khô trơn	2 ÷ 3	Cầu	+
5	HTR4	Tròn	Lài	Bìa răng cưa	Trắng đục	Khô nhẵn	3 ÷ 4	Que	+
6	KTS	Tròn	Hố	Bìa nguyên	Trắng đục	Khô trơn	4 ÷ 5	Que	+
7	KTXA1	Tròn	Phẳng	Bìa răng cưa	Trắng đục	Khô nhẵn	6 ÷ 7	Que	+
8	KTXA3	Tròn	Lài	Bìa nguyên	Trắng đục	Khô trơn	3 ÷ 4	Cầu	+
9	KTXA5	Tròn	Hố	Bìa nguyên	Trắng đục	Khô trơn	2 ÷ 3	Que	+

STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc					Đặc điểm tế bào		
		Dạng khuẩn lạc	Độ nổi	Dạng bia	Màu sắc	Bề mặt	Đường kính (mm)	Hình dạng	Gram
10	VB-32	Tròn	Lồi	Bia răng cưa	Trắng đục	Ướt nhẵn	3 ÷ 4	Que	+
11	VB-34	Tròn	Phẳng	Bia nguyên	Trắng đục	Khô nhẵn	4 ÷ 5	Que	+
12	VB-35	Tròn	Mô	Bia nguyên	Trắng đục	Khô trơn	4 ÷ 5	Cầu	+
13	VB-37	Tròn	Mô	Bia nguyên	Trắng đục	Ướt trơn	2 ÷ 3	Cầu	+
14	VB-41	Không đều	Mô	Bia răng cưa	Trắng đục	Khô trơn	2 ÷ 3	Que	+
15	VB-42	Tròn	Phẳng	Bia răng cưa	Trắng đục	Khô nhẵn	4 ÷ 5	Que	+
16	VB-43	Tròn	Mô	Bia nguyên	Trắng đục	Khô trơn	5 ÷ 6	Cầu	+
17	VB-44	Tròn	Hố	Bia nguyên	Trắng đục	Khô trơn	2 ÷ 3	Que	+
18	VB-45	Tròn	Mô	Bia nguyên	Trắng đục	Khô trơn	1 ÷ 2	Cầu	+
19	VB-46	Tròn	Lài	Bia nguyên	Trắng đục	Ướt nhẵn	6 ÷ 7	Que	+
20	VB-47	Tròn	Mô	Bia nguyên	Trắng đục	Khô trơn	1 ÷ 2	Cầu	+



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột

Khả năng phân giải tinh bột bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa của 20 chủng vi khuẩn phân được thể hiện ở Bảng 2.

Sau 72 giờ nuôi cấy, khả năng phân giải tinh bột dựa trên đường kính phân giải của 20 dòng vi khuẩn đạt trung bình từ 1,0 đến 18,66 mm. Kết quả cho thấy có 9 dòng vi khuẩn có đường kính phân giải trên 10 mm (VB-34, KTXA1, VB-42, KTXA5, VB-41, KTS, VB-44, VB-46, VB-45), chiếm 45%. Kết quả còn cho thấy có 6 dòng vi khuẩn có đường kính phân giải từ 5 đến 10 mm (HL, VB-33, HTR4, VB-37, HTR1, KTXA3), chiếm 30% và 5 dòng vi khuẩn

có đường kính phân giải dưới 5 mm (VB-43, VB-35, VB-47, HTR2, HTR3), chiếm 25%. Dòng vi khuẩn VB-34, KTXA1, VB-42 có đường kính phân giải cao (khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại, với mức ý nghĩa 5%) với kích thước lần lượt là 18,66 mm, 15,33 mm và 14,33 mm. Dòng vi khuẩn HTR3 có đường kính phân giải thấp nhất (1 mm).

Bảng 2. Kết quả khảo sát khả năng tạo vòng halo của 20 chủng vi khuẩn

STT	Tên chủng vi khuẩn	Đường kính vòng phân giải (D – d) (mm)
1	VB-34	18,33 ^a ± 0,57
2	KTXA1	15,33 ^{ab} ± 0,57
3	VB-42	14,33 ^{ab} ± 1,15
4	KTXA5	12,66 ^{bc} ± 1,52
5	VB-41	12,33 ^{bc} ± 1,15
6	KTS	12,00 ^{bc} ± 2,00
7	VB-44	11,66 ^{bc} ± 2,30
8	VB-46	11,33 ^{bc} ± 2,08
9	VB-45	11,33 ^{bc} ± 1,15
10	HL	9,66 ^{cd} ± 0,57
11	VB-33	9,00 ^{cde} ± 1,00
12	HTR4	6,66 ^{def} ± 1,15
13	VB-37	6,33 ^{def} ± 2,08
14	HTR1	6,33 ^{def} ± 0,57
15	KTXA3	6,00 ^{def} ± 1,00
16	VB-43	5,33 ^{efg} ± 1,15
17	VB-35	5,00 ^{efg} ± 1,00
18	VB-47	4,66 ^{fg} ± 1,15
19	HTR2	1,66 ^{gh} ± 1,15
20	HTR3	1,00 ^h ± 0,00
	CV(%)	17,49

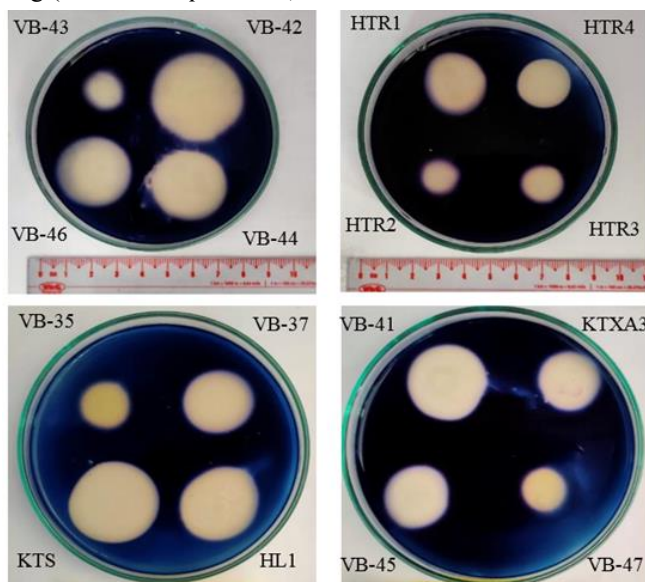
Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái theo sau các giá trung bình khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 5%.

Kết quả khảo sát khả năng phân giải tinh bột với đường kính phân giải từ 1,0 đến 18,33 mm của 20 dòng vi khuẩn phân lập từ mẫu gạo ST25 cao hơn kết quả nghiên cứu Thanh và Tram (2018) khi khảo sát khả năng phân giải tinh bột của các dòng vi khuẩn phân lập từ cây tiêu trồng tại huyện Chơn Thành, tỉnh Bình Phước, kết quả đạt từ 2,0 đến 11,3 mm.

Kết quả khảo sát khả năng phân giải tinh bột cũng gần tương đồng với nghiên cứu của Thi và ctv. (2019) phân lập, nhận diện vi khuẩn phân hủy tinh bột từ rác hữu cơ, ruột sùng (*Holotrichia parallela*)

và trùn đất (*Lubricus terrestris*) kết quả dựa vào vòng sáng phân hủy khi nhuộm với dung dịch Lugol, có 27 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột với giá trị từ 5,7 mm đến 23,4 mm.

Qua kết quả khảo sát trên, ba dòng vi khuẩn được tuyển chọn có khả năng phân giải tinh bột cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 5% so với 17 dòng vi khuẩn còn lại, bao gồm các dòng VB-42, VB-36, KTXA1. Các dòng vi khuẩn này được lựa chọn để xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS.



Hình 2. Đường kính vòng phân giải tinh bột của một số dòng vi khuẩn

3.2. Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS

Kết quả xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS được thể hiện ở Bảng 3.

Nhìn chung, có sự thay đổi về hàm lượng đường khử của 3 nghiệm thức qua các giai đoạn khảo sát. Cụ thể hàm lượng đường khử tại thời điểm 24 giờ đạt cao nhất là 3,07 mg/mL ở nghiệm thức KTXA1, thấp nhất ở nghiệm thức VB-34.

Sau 48 giờ nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có chứa 1% tinh bột, hàm lượng đường khử của 2 nghiệm thức VB-42, VB-34 đều tăng so với 24 giờ, còn nghiệm thức KTXA1 có hàm lượng đường khử giảm nhẹ. Trong đó, hàm lượng đường khử của nghiệm thức KTXA1 là cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại với mức ý nghĩa 5%.

Bảng 3. Hàm lượng đường khử của các nghiệm thức

Dòng vi khuẩn	Hàm lượng đường khử (mg/mL)			
	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
KTXA1	3,07 ^a ± 0,13	2,99 ^a ± 0,06	2,85 ^a ± 0,02	2,90 ^a ± 0,04
VB-42	2,54 ^b ± 0,08	2,65 ^b ± 0,10	2,26 ^b ± 0,10	2,17 ^b ± 0,03
VB-34	0,67 ^c ± 0,03	0,80 ^c ± 0,00	0,59 ^c ± 0,08	0,87 ^c ± 0,02
DC(-)	0,30 ^d ± 0,00	0,27 ^d ± 0,01	0,32 ^d ± 0,03	0,33 ^d ± 0,03
CV %	16,09	13,85	16,78	12,14

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau theo sau các giá biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức, với mức ý nghĩa 5%.

Sau 72 giờ nuôi cấy cả 3 nghiệm thức đều có hàm lượng đường khử sinh ra giảm. Nghiệm thức KTXA1 vẫn có hàm lượng đường khử cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại với mức ý nghĩa 5%. Sau 96 giờ nuôi cấy 2 nghiệm thức KTXA1 và VB-34 có hàm lượng đường khử tăng nhẹ, trong khi đó nghiệm thức VB-42 vẫn tiếp tục giảm.

Thanh (2008) nghiên cứu về phân lập chủng vi sinh vật có khả năng thủy phân tinh bột sống. Kết quả thử nghiệm cho thấy khả năng thủy phân tinh bột trên bột gạo, bột mì, bột bắp từ chủng nấm mốc lần lượt là 5,47 mg/mL, 6,65 mg/mL, 5,51 mg/mL và 6,17 mg/mL. So với nghiên cứu của Thanh (2008), lượng đường khử của 3 dòng vi khuẩn VB-34, VB-42 và KTXA1 cho kết quả thấp hơn. Ở nghiên cứu của Thanh (2008), lượng đường sinh ra cao gấp 2 lần so với dòng vi khuẩn KTXA1, nguyên nhân là có khác nhau giữa khả năng thủy phân tinh bột của nấm và vi khuẩn.

Qua kết quả khảo sát khả năng phân giải tinh bột bằng phương pháp DNS, nghiệm thức KTXA1 có khả năng phân giải tinh bột tạo ra lượng đường khử cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại ở tất cả thời điểm khảo sát, hàm lượng đường khử sinh ra nằm trong khoảng 2,9 đến 3,07 mg/mL. Do đó, dòng vi khuẩn KTXA1 được chọn để định danh.

3.3. Kết quả định danh vi khuẩn

Dòng vi khuẩn có kết KTXA1 có kết phân giải tinh bột cao nhất được chọn để giải trình tự gene. Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA dòng vi khuẩn có 842 nucleotide. Kết quả cho thấy dòng vi khuẩn KTXA1 có trình tự tương đồng với các trình tự gene của ngân hàng gene NCBI với độ tương đồng là khoảng 99,03% (Hình 3). Cụ thể, dòng vi khuẩn KTXA1 tương đồng với các trình tự gene dòng vi khuẩn sau *Bacillus* sp. Kết quả này cũng tương ứng với đặc điểm khuẩn lạc (hình dạng khuẩn lạc tròn, bia răng cưa, màu trắng đục, bề mặt khô nhẵn) và đặc điểm tế bào (Gram dương, hình que) đã được mô tả.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillus velezensis strain R-QL-101-34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus vele...	1478	1478	98%	0.0	99.03%	1451	MT078841.1
Bacillus sp. NCCP-1129 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	Bacillus sp. ...	1478	1478	98%	0.0	99.03%	1135	LC065166.1
Bacillus subtilis strain AJ3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1478	1478	98%	0.0	99.03%	1025	QL818309.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain F1-100b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (...)	1478	1478	98%	0.0	99.03%	1328	OK298800.1
Bacillus subtilis strain 89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1478	1478	98%	0.0	99.03%	1080	KC465728.1
Uncultured Bacillus sp. clone TOPO1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured B...	1476	1476	98%	0.0	99.03%	992	KY927426.1
Bacillus tequilensis strain EGY-WCP11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus tequ...	1476	1476	98%	0.0	99.03%	1322	KF562338.1
Bacillus subtilis strain SRSTH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1476	1476	98%	0.0	99.03%	1078	HQ398997.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain S10-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (...)	1474	1474	98%	0.0	99.03%	1473	MG905819.1
Bacillus subtilis strain SEM-9 chromosome, complete genome	Bacillus subtilis	1474	14651	98%	0.0	99.03%	4121982	CP021123.1
Bacillus subtilis strain LYN12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1474	1474	98%	0.0	99.03%	1481	MF411749.1

Hình 3. Kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng với trình tự 16S-rDNA

Theo nghiên cứu của Thi và ctv. (2019), việc phân lập, nhận diện vi khuẩn phân hủy tinh bột từ rác hữu cơ, ruột sùng (*Holotrichia parallela*) và trùn đất (*Lubricus terrestris*) cho kết quả có năm dòng phân hủy tinh bột triển vọng được chọn để giải trình tự gene 16S rRNA và định danh với kết quả là *Bacillus flexus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus* và *B. flexus*.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu của đề tài là phân lập được 20 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột với

10 dòng vi khuẩn có tế bào hình que, 10 dòng vi khuẩn có tế bào hình cầu và tất cả đều Gram dương. Sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường AB, kết quả cho thấy 3 dòng vi khuẩn KTXA1, VB-34, VB-42 có khả năng phân giải tinh bột cao. Khảo sát khả năng phân giải tinh bột bằng phương pháp DNS cho thấy dòng vi khuẩn KTXA1 có khả năng phân giải tinh bột cao nhất. Kết quả định danh dòng vi khuẩn KTXA1 có độ tương đồng với vi khuẩn *Bacillus* sp. là 99,03%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amira, E., Mohammed, A. D., Ahmed, E., & Noha, O. (2012). *Starch and Microbial α-Amylases: From Concepts to Biotechnological*

Applications. Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology, chapter 21, 160-188.

- Barker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and reanalysis of domain specific 16S primers. *Journal of Microbiological Method*, 55, 541-555.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Dung, N. T. P., Nhân, B. D., & Phong, H. X. (2012). Sản xuất men rượu từ *Saccharomyces cerevisiae* và enzyme amylase trong mầm lúa. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 21a, 11-18.
- Hiệp, N. H., & Lý, N. T. H. (2012). Phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 21a, 37-44.
- Lan, P. T. N., Hoàng, N. H., & Châu, N. T. T. (2013). Khảo sát bước đầu vi sinh vật phân giải tinh bột ở một số ao nuôi tôm thuộc đầm Sam - Chuồn, Phú Vang, Thừa Thiên Huế. *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5* (1116-1121).
- Thanh, T. T. T. (2008). *Nghiên cứu phân lập chủng vi sinh vật có khả năng thủy phân tinh bột sống.* (Luận văn thạc sĩ ngành Công nghệ Sinh học). Đại Học Quốc Gia thành phố Hồ Chí Minh.
- Thanh, D. T. N., & Tram, D. T. T. (2018). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria in black pepper (*Piper nigrum* L.) cultivated in Chon Thanh and Loc Ninh districts of Binh Phuoc province, Vietnam. *International Journal of Innovations in Engineering and Technology*, 10(1), 1-10.
<http://dx.doi.org/10.21172/ijiet.101.01>
- Thi, M., Hiệp, N. H., & Ngữ, C. M. (2019). Phân lập, nhận diện vi khuẩn phân hủy tinh bột từ rác hữu cơ, ruột sùng (*Holotrichia parallela*) và trùn đất (*Lubricus terrestris*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55, 57-64.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2019.044>
- Toàn, H. T., Thảo, M. T., Phương, N. T., Ngân, T. L. K., Vinh, B. T., & Điệp, C. N., (2008). Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose, tinh bột và protein trong nước ri từ bãi rác ở thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 10, 195-202.