

Sàng lọc và đánh giá khả năng tích lũy Polyhydroxyalkanoate từ một số chủng *Bacillus* sp

Nguyễn Thị Đà, Nguyễn Trọng Linh, Nguyễn Thu Trang, Trần Mạnh Hải, Lã Thị Huyền*
Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 13/8/2020; Ngày chấp nhận đăng: 28/9/2020)

Tóm tắt

Poly-hydroxyalkanoate (PHA) là polyme có khả năng phân hủy sinh học được tổng hợp bởi nhiều nhóm vi sinh vật trong điều kiện hạn chế dinh dưỡng với vai trò làm nguồn dinh dưỡng dự trữ. Nhằm mục đích tìm kiếm và đánh giá thu chủng thuộc chi *Bacillus* có khả năng sản xuất của nhựa polyme phân hủy sinh học 06 chủng thuộc chi *Bacillus* đã được lựa chọn nghiên cứu và đánh giá. Các chủng được sàng lọc kiểm tra khả năng tích lũy poly- β -hydroxybutyrate (PHB) bằng việc sử dụng Nile blue A để nhuộm và quan sát các tế bào có màu cam tích lũy poly- β -hydroxyalkanoates PHA. Kết quả cho thấy có 05/06 chủng chiếm 83,3% có khả năng tích lũy PHA. Chủng *Bacillus* sp. DV01 cho thấy khả năng tích lũy cao nhất. Kết quả phân loại dựa trên trình tự 16S rRNA cho thấy chủng này thuộc loài *Bacillus megaterium* với độ tương đồng đạt 100% và được đặt tên là *Bacillus megaterium* DV01. Hàm lượng PHA của *B. megaterium* DV01 khi tách thu được chiếm 23,9% so với sinh khối khô.

Từ khóa: PHA, 16S rRNA, *Bacillus megaterium*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc sử dụng rộng rãi nhựa tổng hợp trong công nghiệp cũng như trong đời sống ngày nay dẫn tới nguy cơ thay đổi đa dạng sinh học bản địa và ô nhiễm môi trường bởi tính chất không phân hủy của chúng. Chính vì vậy, việc tìm kiếm và phát hiện sự có mặt của polyhydroxyalkanoate (PHA) do vi sinh vật tổng hợp ra với nhiều ưu điểm của nó như tính chất nhiệt dẻo, khả năng phân hủy cũng như tương thích sinh học và khả năng được tổng hợp từ các nguồn nguyên liệu tái tạo đã thu hút được sự quan tâm nghiên cứu rất lớn [1-2]. PHA có thể được sử dụng làm vật liệu có giá trị cho sản xuất một loạt các sản phẩm bởi các tính chất như khả năng phân hủy sinh học và khả năng tương thích sinh học cao như: bao bì thân thiện với môi trường, dược phẩm, nông nghiệp, và các ngành công nghiệp thực phẩm [3-4]. PHA không chỉ đóng vai trò trong sản phẩm sản xuất nhựa sinh học mà bởi nó không gây hại cho động vật nên nó còn được sử dụng làm phụ gia cho thức ăn của heo con và cá [5]. Ngoài chức năng dự trữ năng lượng, sự có mặt của PHA trong tế bào chất làm tăng sức đề kháng của các vi sinh vật dưới điều kiện thay đổi pH, nhiệt độ và áp suất thẩm thấu, và khi tiếp xúc với hóa chất độc hại [6]. Sản phẩm thuộc nhóm PHA bao gồm: poly- β -hydroxybutyrate (PHB), Polyhydroxyvalerate (PHV), polydihydroxyhexanoate (PHH), polyhydroxyoctanoate (PHO),... Trong đó, PHB là PHA đơn giản nhất và được nghiên cứu cũng như ứng dụng nhiều nhất trong nhóm này. PHB được tổng hợp như nguồn dự trữ năng lượng trong rất nhiều vi sinh vật khác nhau thuộc chi *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Staphylococcus* và *Rhodococcus*. Chi *Bacillus* là vi khuẩn

*Điện thoại: 0982141298 Email: lthuyen@ibt.ac.vn

gram dương đầu tiên được phát hiện có khả năng tổng hợp PHB [7]. Khả năng tổng hợp PHA của chi này được biết đến ở các loài như: *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringensis*,... [7-10]. Chi này được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất các sản phẩm công nghiệp do đặc tính an toàn, khả năng tiết và độ bền của plasmid tái tổ hợp. Chi *Bacillus* là đối tượng nghiên cứu tiềm năng cho sản xuất PHB bởi nó có khả năng lên men trong môi trường nghèo dinh dưỡng cũng như có khả năng sử dụng rất nhiều nguồn carbon khác nhau để tổng hợp PHA [11].

Với mong muốn tìm kiếm chủng thuộc chi *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp và tích lũy PHA nhằm ứng dụng trong lên men thu PHA từ các nguồn Carbon khác nhau, trong nghiên cứu này, 06 chủng thuộc chi này được sàng lọc khả năng tổng hợp, tích lũy PHB thông qua phương pháp nhuộm huỳnh quang sử dụng Nile Blue A.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng giống

Sáu (06) chủng thuộc chi *Bacillus* được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm *Bacillus* sp. DV01, *Bacillus* sp. DV01, *Bacillus subtilis* KL1, *Bacillus subtilis* KL2, *Bacillus subtilis* KL3. *Bacillus* sp. M1. Các chủng nghiên cứu được lưu giữ trong bộ sưu tập chủng giống phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy chủng

2.2.1. Môi trường

Chủng nghiên cứu khi bảo quản lạnh được hoạt hóa bằng cách nuôi cấy 18 - 24 h ở 37°C trên môi trường LB với các thành phần (g/L): Peptone (10), cao nấm men (5), NaCl (5).

Khoảng 1: Môi trường nuôi cấy chủng cho lên men pha 1 được xác định là môi trường khoáng cơ bản [8] với một số cải tiến các thành phần (g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,5); KH_2PO_4 (1,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02); $\text{NH}_4\text{Fe(III) Citrate}$ (0,05); cao nấm men (5); peptone (5) glucose (10). Khoảng 2: Môi trường lên men pha 2 thu PHA (g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,5); KH_2PO_4 (1,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2); $\text{NH}_4\text{Fe(III) Citrate}$ (0,05); glucose (10); acid citric (1); vi lượng (2 mL). Dung dịch vi lượng 0,1 mL với các thành phần (mg/L): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3); H_3BO_3 (30); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1); $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3). Các hóa chất do công ty uy tín của Mỹ, Đức và Trung Quốc cung cấp.

2.2.2. Điều kiện nuôi cấy thu PHA

Chủng nghiên cứu được nuôi lắc 120 vòng/phút, 37°C trên môi trường khoáng dinh dưỡng khoảng 1 qua đêm, sau đó hút thu sinh khối bằng ly tâm và bổ sung vào bình 250 mL chứa 100 mL môi trường khoáng 2 và tiến hành nuôi lắc 120 vòng/phút ở 37°C trong 96 h.

2.3. Quan sát PHA tích lũy trong tế bào

Chủng nghiên cứu được cấy trên môi trường khoáng 1 đặc sau đó được cấy chuyển sang môi trường khoáng 2 đặc có bổ sung dung dịch Nile blue A (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Để thực hiện phương pháp này, Nile blue A được pha trong dimethylsulfoxide (DMSO) với hàm lượng 0,25 mg/mL sau đó được bổ sung vào môi trường khoáng 2. Chủng nghiên cứu được nuôi cấy trên môi trường này sau 48 h được lấy ra quan sát các PHA tích lũy trong tế bào khi soi dưới kính hiển vi

huỳnh quang. Tế bào tích lũy PHA sẽ có cam sáng khi bắt màu với Nile blue A.

2.4. Phương pháp nhuộm với Nile blue trên lam kính

Chuẩn bị lam kính sạch và nhỏ một giọt nước vô trùng sau đó lấy sinh khối chủng nghiên cứu đã nuôi cấy trên môi trường khoáng 2 sau 48 h. Dùng que cấy hòa chủng tan đều trong giọt nước và làm khô nhanh trên ngọn lửa đèn cồn. Nhỏ 20 μL Nile blue A (pha trong DMSO với hàm lượng 0,25 mg/mL) dàn đều và ủ lam kính ở 55°C trong 10 phút. Sau đó, mẫu được lấy và nhỏ acid acetic 8% và để trong khoảng 1 phút rồi rửa 02 - 03 lần dưới vòi nước chảy nhẹ. Mẫu được làm khô và soi kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng 460 nm.

2.5. Phương pháp tách chiết PHA

PHA của chủng nghiên cứu được tinh sạch bằng phương pháp gia nhiệt kết hợp xử lý dung môi. Sinh khối tế bào sau nuôi được thu bằng ly tâm và rửa 2 lần với dung dịch đệm phosphate, pH 7,2 sau đó được hòa lại trong 3 mL đệm này và tiến hành gia nhiệt bằng lò vi sóng ở mức công suất 140W, quay và dừng sau mỗi 30 giây trong 15 phút. Dịch chứa tế bào sau khi gia nhiệt được chuyển sang ống thủy tinh có nút xoá sau đó bổ sung thêm dung dịch ethanol : aceton theo tỷ lệ 1 : 1, bung trộn đều sinh khối và ủ trong 1 - 3 h nhằm mục đích tăng tính thấm của màng tế bào. Tế bào sau ủ được thu bằng ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút, 15 phút và bổ sung 5 mL chloroform, xoáy chặt nắp và tiến hành lắc 5 - 6 h để PHA được hòa tan hoàn toàn. Hỗn hợp dung dịch được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút và thu pha chứa chloroform chuyển ra ống thủy tinh mới. Dịch chứa chloroform và PHA hòa tan sau khi thu được bổ sung methanol lạnh theo tỷ lệ 1 : 8, tương ứng. Kết tủa PHA thu được bằng ly tâm 12.000 vòng/phút trong 20 phút được làm khô trong tủ hút và bảo quản cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.6. Phương pháp Crotonic xác định hàm lượng nhựa sinh học

Lượng PHA trong một mẫu được lấy có thể được xác định bằng phương pháp đo quang phổ bằng cách chuyển đổi PHA thành acid crotonic khi xử lý với acid sulfuric. Dung dịch chuẩn acid crotonic được chuẩn bị với các nồng độ tăng dần khác nhau. Độ hấp thụ của acid crotonic được đo ở bước sóng 235 nm từ đó xác định được phương trình chuẩn có dạng $y = ax + b$. Trong nghiên cứu này, tế bào vi sinh vật được xử lý theo phương pháp 2.4.1 đến khi thu dịch chloroform sau khi lắc hòa tan PHA trong tế bào bước 3. Hút 200 μL dịch chloroform chứa PHA hòa tan sau đó bổ sung 200 μL H_2SO_4 98% đun 100°C trong 30 phút để toàn bộ PHA trong dung dịch được chuyển thành acid crotonic có màu nâu. Dung dịch sau đun được để nguội rồi tiến hành đo OD tại bước sóng 230 nm. Mẫu chuẩn được sử dụng là PHB (Sigma) được hòa tan trong chloroform với hàm lượng 8 mL/mL, sau đó tính các nồng độ thích hợp để dựng đường chuẩn. Kết quả xác định hàm lượng PHA trong dung dịch được xác định theo phương trình xây dựng được. Mẫu đối chứng chuẩn là chloroform + H_2SO_4 và được xử lý như quy trình trên.

2.7. Tách chiết DNA tổng số

Chủng nghiên cứu được nuôi qua đêm trên môi trường LB sau đó ly tâm thu sinh khối và tiến hành tách chiết DNA tổng số theo Ausubel và cs [12]. Ly tâm thu sinh khối tế bào trong 5 phút ở tốc độ 5.000 vòng/phút. Tế bào được hòa tan đều trong hỗn hợp dung dịch A (567 μL \times TE, 30 μL SDS 10% và 3 μL proteinase K 20 mg/mL) và được ủ ở 37°C trong 1 h. Sau khi ủ, bổ sung 100 μL NaCl 5 M rồi trộn đều. Sau bước này, 80 μL dung dịch CTAB / NaCl được bổ sung, trộn đều và mẫu được ủ trong 10 phút ở 65°C. Bổ sung 2 V (v/v) dung dịch Chloroform: isoamyl alcohol (24 : 1), đảo đều và ly tâm thu pha nổi phía trên sang Eppendoff mới, tiếp tục lặp lại bước

này lần 2. DNA được thu bằng cách rửa với isopropanol (0,6 thể tích (v/v)) trong khoảng 1 h ở -20°C và được rửa lại bằng 500 µL ethanol (70%). DNA được rửa, làm khô và hòa tan trong 100 µL TE. Dịch DNA được bảo quản ở -20°C để dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

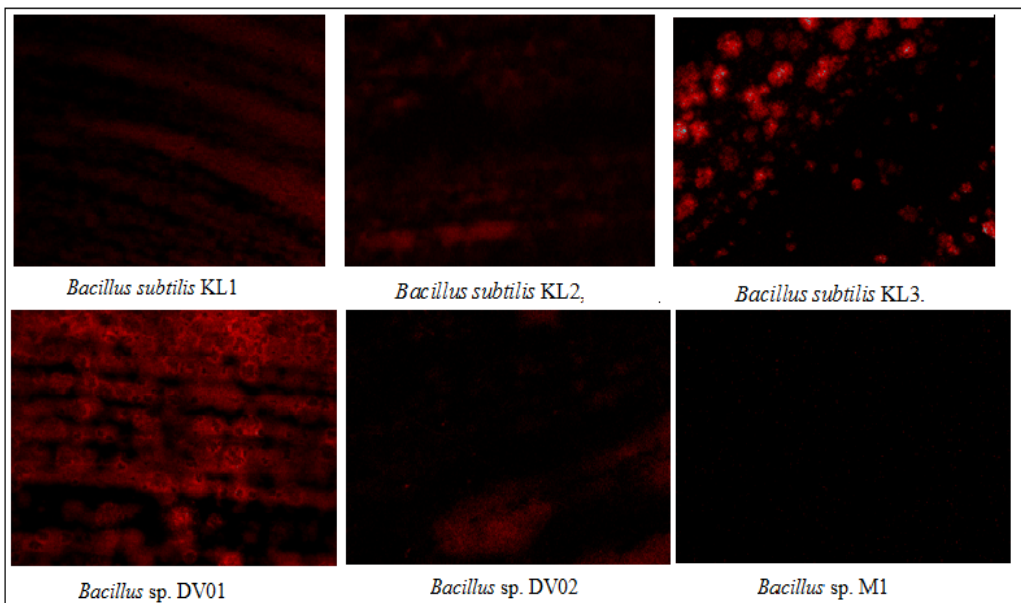
2.8. Phương pháp phân lập gen 16S rRNA

Tách DNA tổng số các chủng và chạy PCR gene 16S rRNA bằng cặp mồi: 16SF-5' AGAGTTTGATCMTGGC 3', 16SR-5' TACCTTGTTACGACT 3'. Thành phần PCR bao gồm: Dream Taq buffer (5 µL), dNTP 5mM (2 µL), PriF16S/ PriR16S 10pmol (1 µL), DNA khuôn, Taq polymerase (0,25 µL) trong 50 µL phản ứng và chu kỳ chạy PCR: 95°C, 5 phút; (95°C, 1 phút; 55°C, 1phút 20"; 72°C, 2 phút) × 30 lần; 72°C, 7 phút; 4°C-∞.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khả năng tích lũy PHA

Sàng lọc khả năng tích lũy PHA của các chủng nghiên cứu được đánh giá khi nuôi cấy chủng trên môi trường khoáng 2 có bổ sung Nile blue A sau 48 h. Sau khi nuôi cấy, các chủng có tích lũy PHA sẽ bắt màu cam khi soi dưới kính hiển vi huỳnh quang. Theo các tác giả đã công bố khả năng tổng hợp PHA của nhóm *Bacillus* rất đa dạng trong các loài như: *B. megaterium* [13], *B. subtilis* [7],... Trong nghiên cứu này, kết quả chụp kính hiển vi huỳnh quang cho thấy trong 06 chủng có 05 chủng có quan sát thấy hạt phát quang màu cam sáng khi soi dưới kính này (Hình 1). Điều này chứng tỏ có 05/06 chủng có khả năng tích lũy PHA đó là các chủng: *Bacillus* sp. DV01, *Bacillus subtilis* KL1, *Bacillus subtilis* KL2, *Bacillus subtilis* KL3, *Bacillus* sp. DV02. Riêng chủng *Bacillus* sp M1 không có khả năng tích lũy PHA. Tại cùng điều kiện nuôi cấy, chủng *Bacillus* sp. DV01 cho thấy có khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA tốt nhất trong cả 06 chủng trên môi trường khoáng. Chính vì vậy, chủng *Bacillus* sp. DV01 được lựa chọn để nghiên cứu phân loại, và xác định hàm lượng PHA.

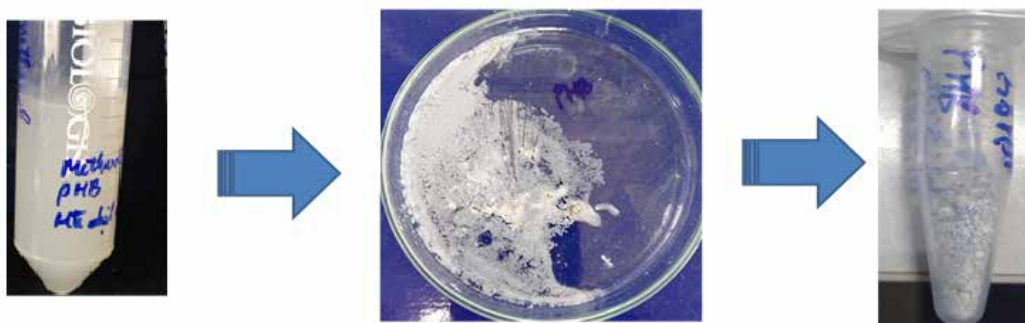


Hình 1. Khả năng tích lũy PHA của chủng nghiên cứu trên môi trường khoáng có bổ sung Nile blue A quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang

Chủng *Bacillus* sp. DV01 nghiên cứu được nuôi cấy thu sinh khối tách thu PHA trên môi trường khoáng 2. Kết quả tách PHA từ chủng chọn lọc được thể hiện tại Bảng 1 và Hình 2.

Bảng 1. Khả năng tổng hợp PHA của chủng chọn lọc

STT	Chỉ tiêu nghiên cứu	Hàm lượng (g)
1	Hàm lượng sinh khối khô (CWD)/100 mL	0,3615
2	Hàm lượng PHA thu được/100 mL	0,0864
3	% PHA/CWD	23,9%

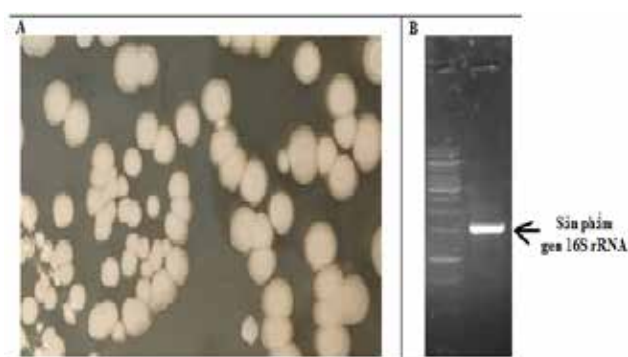


Hình 2. Hình ảnh kết quả tách PHA của chủng chọn lọc

Khi nuôi cấy trên môi trường khoáng 2, bằng phương pháp crotonic cho thấy chủng DV01 có khả năng tích lũy PHA với được 1,231 g/mL dịch nuôi cấy tương ứng với 34,05% PHA. Kết quả này tương ứng với công bố của Wu và cộng sự khi đánh giá khả năng tích lũy hàm lượng PHA của chủng *Bacillus* sp. JMa5 đạt 25 - 35% [14]. Tuy nhiên, khi tách thu PHA từ chủng nghiên cứu DV01 bằng phương pháp gia nhiệt kết hợp hàm lượng PHA chỉ đạt được 0,864 g/L tương ứng 23,9% với lượng sinh khối khô của chủng chọn lọc thu được là 3,615 g/L.

3.2. Đặc điểm phân loại của chủng chọn lọc

Chủng *Bacillus* sp. DV01 được nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB ở 37°C sau đó tiến hành tách chiết DNA tổng số theo phương pháp CTAB/NaCl của Ausubel và cs, 1994 [12]. Hình thái khuẩn lạc chủng nghiên cứu được thể hiện trên hình 3A. Kết quả khuếch đại gen 16S rRNA của chủng chọn lọc được thể hiện trên Hình 3B. Dựa vào kết quả điện di đồ trên hình 3B cho thấy, sản phẩm PCR bắt cặp đặc hiệu với gen 16S rRNA tại một băng vạch duy nhất có kích thước khoảng 1500 bp (Hình 3B). Sản phẩm PCR thu được, được tinh sạch và được giải trình tự.



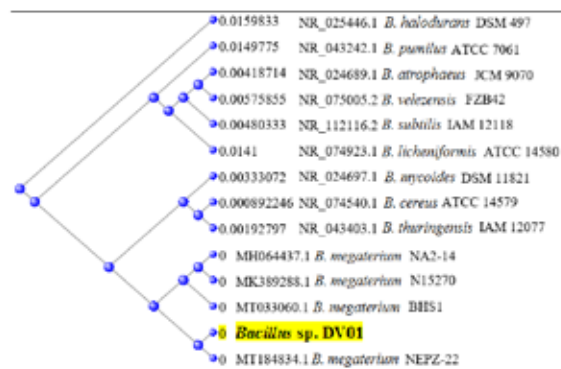
Hình 3. Hình ảnh khuẩn lạc trên môi trường LB (A) và điện di đồ sản phẩm PCR gen 16S rRNA (B) của chủng *Bacillus* sp. DV01

Kết quả đọc trình tự Gen 16S rRNA của các chủng đã được xử lý bằng phần mềm xử lý trình tự MEGA6.0, BioEdit, Chromas,... và trang web trực tuyến như <http://ncbi.nlm.nih.gov> thu được đoạn gen 16S rRNA có độ dài 1421 nucleotide và so sánh với dữ liệu về gen này đã được cung cấp trên Genbank. Kết quả so sánh sự tương đồng trình tự gen 16S rRNA của chủng nghiên cứu với trình tự 16S rRNA của một số chủng thuộc chi *Bacillus* trên ngân hàng gen NCBI được trình bày trên Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả so sánh sự tương đồng trình tự gen 16S rRNA của chủng nghiên cứu với trình tự 16S rRNA của một số chủng thuộc chi *Bacillus* trên ngân hàng gen NCBI

Mã chủng	Chủng so sánh	Chiều dài gen so sánh	Điểm sai khác	Độ tương đồng (%)
MH064437.1	<i>B. megaterium</i> NA2-14	1421	0	100
MK389288.1	<i>B. megaterium</i> N15270	1421	0	100
MT033060.1	<i>B. megaterium</i> BHS1	1421	0	100
MT184834.1	<i>B. megaterium</i> NEPZ-22	1421	0	100
NR_024697.1	<i>B. mycoides</i> DSM 11821	1425	74	94,246
NR_074540.1	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	1425	75	94,175
NR_043403.1	<i>B. thuringiensis</i> IAM 12077	1425	77	94,035
NR_043242.1	<i>B. pumilus</i> ATCC 7061	1422	83	93,812
NR_024689.1	<i>B. atrophaeus</i> JCM 9070	1424	90	93,118
NR_112116.2	<i>B. subtilis</i> IAM 12118	1425	88	93,123
NR_075005.2	<i>B. velezensis</i> FZB42	1425	89	93,053
NR_074923.1	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	1425	92	92,842
NR_025446.1	<i>B. halodurans</i> DSM 497	1404	92	93,091

Kết quả trên Bảng 2 cho thấy trình tự gen 16S rRNA của chủng *Bacillus* sp. DV01 có độ tương đồng 100% so với các chủng *B. megaterium* được so sánh (MH064437.1; MK389288.1; MT033060.1; MT184834.1). Dựa trên kết quả trình tự gen 16S rRNA này chủng *Bacillus* sp. DV01 được phân loại thuộc loài *Bacillus megaterium*. Dựa trên trình tự gen 16S rRNA đã xây dựng được cây phát sinh chủng loài của chủng tuyển chọn. Cây phát sinh chủng loài được xây dựng theo phương pháp Neighbor joining sử dụng phép toán Tamura - Nei với độ lặp lại 1.000 lần trên phần mềm chuyên dụng. Kết quả phân tích cây phát sinh loài của chủng tuyển chọn được trình bày trên Hình 4.



Hình 4. Cây phát sinh loài của chủng chọn lọc dựa trên phần mềm MEGA 6

4. KẾT LUẬN

Từ 06 chủng thuộc chi *Bacillus* được lưu giữ đã xác định được 05 chủng có khả năng bắt màu Nile blue khi nuôi cấy trên môi trường khoáng cơ bản cải tiến. Thông qua nghiên cứu, chủng *Bacillus* sp. DV01 được lựa chọn để phân loại và xác định khả năng tích lũy PHA. Dựa trên trình tự 16S rRNA cho thấy chủng này thuộc loài *Bacillus megaterium* và cho thấy có thể tích lũy được 0,864 g/L PHA khi nuôi cấy trên môi trường khoáng 2 có cải tiến.

LỜI CẢM ƠN

Đây là công trình được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của đề tài Bộ Công thương của TS Nguyễn Thị Đà với đề tài được cấp: “Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học tái tổ hợp sinh tổng hợp bioplastic từ phụ phẩm chế biến thủy sản” ĐT.08.19/CNSHCB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. K. Yasotha, M. K. Aroua, K. B. Ramachandran, and I. K. P. Tan, “Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration”, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 30, no. 3, pp. 260-268, 2006.
- [2]. M. Koller, “Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): the biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament?”, *Euro Biotech Journal*, vol. 3, no. 1, pp. 32-44, 2019.
- [3]. D. C. Meng, R. Shen, H. Yao, J. C. Chen, Q. Wu, G. Q. Chen, “Engineering the diversity of polyesters”, *Current Opinion Biotechnology*, vol. 29, pp. 24-33, 2014.
- [4]. G. Q. Chen, “In Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications”, vol. 14, Springer Science & Business Media, 2010.
- [5]. X. Wang, X. J. Jiang, F. Wu, Y. Ma, “Microbial poly (3- hydroxybutyrate) (PHB) as a feed additive for fishes and piglets”, *Biotechnology Journal*, *Published online*, 2019.
- [6]. S. Obruca, P. Sedlacek, M. Koller, D. Kucera, I. Pernicova, “Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications”, *Biotechnology Advance*, vol. 36, no. 3, pp. 856-870, 2018.
- [7]. M. Singh, S. K. Patel, and V. C. Kalia, “*Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates”, *Microbial Cell Factories*, vol. 8, no. 1, pp. 38, 2009.
- [8]. A. Rodríguez Contreras, M. Koller, M. Miranda de Sousa Dias, M. Calafell Monfort, G. Braunegg, and M. S. Marqués Calvo, “High production of poly (3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain”, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 114, no. 5, pp. 1378-1387, 2013.
- [9]. S. Mohapatra *et al.*, “*Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges”, *Biochemistry and Biophysics Report*, vol. 12, pp. 206-213, 2017.
- [10]. V. Gowda and S. Shivakumar, “Agrowaste-based Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 57, no. 1, pp. 55-61, 2014.
- [11]. M. Thirumala, S. V. Reddy, and S. K. Mahmood, “Production and characterization of PHB

- from two novel strains of *Bacillus* spp. isolated from soil and activated sludge”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 37, no. 3, pp. 271-278, 2010.
- [12]. FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith, K Struhl, Wiley CJ, RD Allison, M Bittner, S Blackshaw, “*Current Protocols in Molecular Biology*”, John Wiley & Sons, 2003.
- [13]. S. R. Pandian, V. Deepak, K. Kalishwaralal, N. Rameshkumar, M. Jeyaraj, and S. Gurunathan, “Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3”, *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 2, pp. 705-711, 2010.
- [14]. Wu, Q., Huang, H., Hu, G.H., Chen, J., Ho, K.P., Chen, G.Q., 2001, “Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media”, *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 80, pp.111-118, 2001.

Screening and determination of polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus* sp. strains

Nguyen Thi Da, Nguyen Trong Linh, Nguyen Thi Thu Trang, Tran Manh Hai, La Thi Huyen
Institute of Biotechnology, Viet Nam Academy of Science and Technology, Hanoi

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable polymers produced by microbes as reserve material when they were cultured in a limitation of nutrients and excess C source mediums. PHAs can be synthesized by various bacteria including gram positive and gram-negative bacteria. Among the PHA-producing gram-positive bacteria, *Bacillus* sp. produce and accumulate various monomer compositions of PHAs. In this study, about 83.3% of strains (05/06 strains) can accumulate PHAs production. *Bacillus* sp. DV01 accumulated a amount of PHA 23.9% of CWD after 96h when cultured in modified basal medium containing 1% (w/v) glucose. *Bacillus* sp. DV01 was identified by sequencing the gene coding for 16S rRNA. BLAST results showed the obtained 16S rRNA sequence of this strain revealed 100% with the *Bacillus megaterium* and so-called *Bacillus megaterium* DV01

Keywords: PHA, 16S rRNA, *Bacillus megaterium* DV01.