

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP POLY- β -HYDROXYBUTYRATE (PHB) TỪ ĐẤT VÀ THỰC VẬT TẠI TỈNH BÌNH DƯƠNG

Nguyễn Thành Luân^{1,*}, Nguyễn Thị Liên Thương²,
Nguyễn Thị Quỳnh Mai¹, Nguyễn Minh Chánh¹

¹Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

²Trường Đại học Thủ Dầu Một

*Email: luannt@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 19/6/2017; Ngày chấp nhận đăng: 16/3/2018

TÓM TẮT

Nhựa sinh học có nguồn gốc chủ yếu từ vi khuẩn, có khả năng chịu nhiệt tốt và có thể phân hủy sinh học nhanh. Nghiên cứu này phân lập và tuyển chọn các nguồn vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp nhựa sinh học từ đất và thực vật tại tỉnh Bình Dương. Khi khảo sát hàm lượng và thời gian thu nhận nhựa PHB ở 3 chủng CR2, RB3, RC3 cho thấy chủng vi khuẩn CR2 hoang dại có khả năng sinh tổng hợp PHB cao nhất đạt 39,84% trong thời gian 48 giờ và đạt giá trị màu sắc tốt nhất khi hòa tan bằng H₂SO₄ đậm đặc. Kết quả định danh cho thấy chủng CR2 là loài *Rhizobium gallicum*, RB3 là loài *Agrobacterium tuminfaciens*. Cấu trúc PHB thu nhận được giống với cấu trúc của PHB thương phẩm. Nghiên cứu chuyên sâu về PHB là tiềm năng phát triển cho một nền công nghiệp và nông nghiệp xanh, cải tiến các phương pháp sản xuất nhựa PHB ở quy mô công nghiệp trong vật liệu mới thay thế.

Từ khóa: Poly- β -hydroxybutyrate, PHB, *Rhizobium gallicum*, *Agrobacterium tuminfaciens*, nhựa sinh học.

1. MỞ ĐẦU

Các tỉnh thuộc miền Đông Nam Bộ hiện nay đang có xu hướng công nghiệp hóa cao, thu hút dân cư từ các vùng miền khác nhau về lao động và sinh sống. Trong đó, tỉnh Bình Dương hiện có 28 khu công nghiệp với 24 khu công nghiệp đã đi vào hoạt động, dân cư gia tăng nhanh chóng trong vòng 10 năm qua. Hiện trạng này dẫn đến việc gia tăng lượng bao bì nylon trong rác thải. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, thời gian phân hủy túi nylon được tổng hợp từ polymer dầu mỏ có thể kéo dài từ 500 đến 1000 năm nếu không có tác động của ánh sáng mặt trời [1]. Hơn nữa, trong quá trình phân hủy, nhựa PVC còn sinh ra các hợp chất làm đất bị trơ, không giữ được độ ẩm và dinh dưỡng cho cây trồng. Để đảm bảo sự phát triển một thành phố công nghiệp bền vững, tỉnh Bình Dương cần có một tầm nhìn về công nghiệp xanh, bảo vệ môi trường sinh thái. Vấn đề cấp thiết đặt ra là cần tìm một vật liệu mới có thể thay thế nhựa tổng hợp truyền thống và có khả năng phân hủy sinh học để giảm ô nhiễm môi trường. Vì vậy, nhựa sinh học được tìm kiếm và nghiên cứu như là vật liệu mới thay thế nguồn vật liệu ô nhiễm hiện nay.

Nhựa sinh học (Bioplastic) xuất hiện từ những năm 1950 nhưng chỉ thật sự được chú trọng trong những năm gần đây. Nhựa sinh học đã có được những bước tiến vững chắc ở khu vực châu Âu và châu Mỹ. Nhựa sinh học tại Việt Nam được xem như một loại vật liệu mới có tiềm năng ứng dụng cao nhưng vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều. Nhựa sinh học

có rất nhiều loại như: nhựa nhiệt dẻo từ tinh bột, nhựa acid polylactic (PLA), nhựa poly- β -hydroxybutyrate (PHB), polyacrylamide 11 (PA 11), nhựa polyethylene xuất xứ sinh học. Đặc biệt, poly- β -hydroxybutyrate (PHB) được sản xuất từ vi sinh vật được quan tâm nghiên cứu vì nó có khả năng chịu nhiệt cao với độ nóng chảy lên tới hơn 170 °C, có độ bền với nước và độ ẩm cao, có khả năng thấm oxy tốt và không gây độc. Nhựa PHB có tính chất tương tự với nhựa làm từ hoá dầu, có thể chìm trong nước và dễ phân hủy kỵ khí, có thể phân huỷ sinh học thành CO₂ và H₂O mà không sinh ra các chất gây hại. Nhựa PHB tồn tại trong tế bào chất dưới dạng hạt tinh thể và có thể được chiết rút nhờ dung môi. PHB đã được xác định ở hơn 20 chi vi khuẩn khác nhau trong đó có các chi lớn như *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* [2-3].

Hàm lượng PHB phụ thuộc nhiều vào chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp nhựa sinh học. Nghiên cứu về PHB hiện nay chủ yếu đề cập đến các nhóm vi khuẩn gram âm (-) thuộc lớp *Proteobacteria* nhờ lợi thế đa dạng ở các nguồn đất, nước và không khí bên cạnh khả năng sinh tồn rất cao trong đó có các loài phổ biến như *Rhizobium*, *Azotobacter* hay *Agrobacterium* [3]. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung vào việc phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *Rhizobium* sp. có khả năng tổng hợp PHB cao từ môi trường đất và thực vật để làm đa dạng nguồn giống vi sinh vật phục vụ cho các công trình nghiên cứu PHB. Bên cạnh đó, nghiên cứu hướng đến việc định tính PHB theo các phương pháp khác nhau nhằm phân tích quá trình tạo PHB của vi khuẩn và tối ưu các yếu tố tạo PHB trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập mẫu

Mẫu đất được chọn lọc từ các nguồn có khả năng sinh PHB như đất nhiễm dầu gần các trạm xăng dầu, garage, đất canh tác cây công nghiệp, đất thuần công nghiệp tại các khu công nghiệp lớn trên địa bàn tỉnh Bình Dương [4]. Mẫu thực vật như cây đậu que, cây cao su, cây nốt sần họ đậu (cỏ đậu, đậu bắp, sò đũa, cây đậu phộng, cỏ ba lá) được chọn lựa để khảo sát và phân lập vi sinh vật sinh PHB trong phòng thí nghiệm. Các chủng vi khuẩn sau khi được phân lập sẽ được tiến hành thử nghiệm PHB trong môi trường sinh PHB và chất thử PHB. Mẫu đất được nghiền nhỏ, pha loãng thành dung dịch nồng độ 10⁻⁴ nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng MPA (5 g/L cao thịt, 5 g/L glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L NaCl, pH 7-7,2, 20 g/L agar) và ủ ở 30 °C trong 12 giờ, các khuẩn lạc đặc trưng cấy chuyển và làm thuần trên môi trường MPA. Các mẫu thực vật và các nhóm cây họ đậu có nốt sần được xử lý trung hòa với nước cất vô trùng và cấy trên môi trường tăng sinh chọn lọc YMA (cao nấm men 1g/L, Manitol 10 g/L, K₂HPO₄ 0,5 g/L, MgSO₄ 0,2 g/L, NaCl 0,1 g/L, pH 6,8-7, agar 20g/L) ủ ở 30 °C trong 48 giờ, cấy chuyển nhiều lần trên YMA để làm thuần. Các chủng được khẳng định thuần chủng sẽ được quan sát và phân nhóm bằng cách quan sát hình thái vi thể, đại thể, các kiểm tra sinh hóa theo phân loại của Bergey's dựa trên nghiên cứu của Lê Lý Thùy Trâm để phân nhóm các chủng vi sinh phân lập được và khẳng định sơ bộ các nhóm vi khuẩn có khả năng sinh PHB [5].

2.2. Định tính nhựa poly- β -hydroxybutyrate (PHB)

Phương pháp định tính nhựa dựa vào cơ chế bắt màu của nhóm lipid với thuốc nhuộm Sudan Black B hiệu quả hơn so với phương pháp nhuộm Nile Blue A [5]. Hạt PHB được nhuộm sẽ bắt màu lam đen, tế bào và các bộ phận khác có màu đỏ. Dịch huyền phù vi khuẩn khi nuôi cấy ở 30 °C trong 48 giờ sẽ được cô định trên lam kính, nhuộm bằng thuốc nhuộm Sudan Black B, tẩy màu bằng xylen, nhuộm lại với thuốc nhuộm Safranin và quan sát ở kính hiển vi quang học có độ phóng đại của vật kính x100. Như vậy, kết quả nhuộm PHB sẽ loại bỏ những mẫu vi khuẩn không tổng hợp nhựa [6].

2.3. So sánh khả năng sinh tổng hợp nhựa PHB

Theo nghiên cứu của Lê Lý Thùy Trâm (2006), việc xác định hàm lượng PHB có trong tế bào vi khuẩn ở cùng một điều kiện và thời gian nuôi cấy cũng như khả năng sinh nhựa của các chủng vi khuẩn phân lập cần được đánh giá. Để thực hiện khảo sát này, vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường canh YEM ở nhiệt độ 30 °C lắc liên tục ở 120 - 150 rpm trong 48 giờ [5]. Mẫu được ly tâm thu sinh khối với tốc độ 5000 rpm trong 40 phút, sau đó rửa sạch với nước cất vô trùng 2 lần và sấy khô ở nhiệt độ 60 °C. Lượng sinh khối khô chọn lọc (0,1 g/L) được nghiền mịn, hòa tan trong 3 mL NaClO nồng độ 5 - 8% có bổ sung thêm 4 mL chloroform, sau đó được ủ ở nhiệt độ 60 °C trong thời gian 60 phút, đảm bảo việc lắc đều liên tục 15 phút/lần. Sản phẩm PHB thô được thu nhận khi dịch hòa tan với chloroform được ly tâm ở tốc độ 5000 rpm trong 40 phút và sau đó tiến hành bay hơi chloroform ở 40 - 60 °C. PHB thô có màu trắng được thủy phân bằng 5 mL H₂SO₄ đậm đặc và đem so sánh màu với Sudan Black B để chọn ra chủng có khả năng sinh nhựa PHB cao nhất [7].

2.4. Định danh giải trình tự gene RNA 16S và khảo sát thời gian sinh tổng hợp nhựa PHB của chủng sinh PHB cao nhất

Định danh sinh học phân tử đến cấp loài bằng phương pháp giải trình tự gen rRNA 16S của vi khuẩn sinh nhựa PHB cao nhất kết hợp xây dựng cây phát sinh loài trên công cụ BLAST NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) để tìm mối quan hệ loài của nhóm gen sinh nhựa PHB của các loài phân lập và chọn lọc tối ưu nhất. Các chủng được gửi mẫu thực hiện giải mã trình tự gene rRNA 16S và được tra cứu với cây phát sinh loài trên cơ sở dữ liệu MEGA (<http://www.megasoftware.net/>).

2.5. Khảo sát thời gian sinh tổng hợp nhựa PHB của chủng sinh PHB cao nhất

Sự tăng trưởng và hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối thay đổi theo thời gian nuôi cấy. Khối lượng sinh khối không tỉ lệ với khối lượng PHB tạo ra. Vi khuẩn có khả năng sinh nhựa PHB cao nhất sẽ được nuôi cấy trong môi trường YEM lỏng ở nhiệt độ 30 °C, lắc liên tục ở 120-150 rpm/phút trong thời gian khảo sát là 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ [8]. Sinh khối sau đó sẽ được thu nhận và tách nhựa PHB theo các mốc thời gian và sấy khô để thu nhận PHB ở dạng bột. Bột PHB sau khi tách được xác định trọng lượng, thủy phân bằng 5 mL H₂SO₄ đậm đặc và so sánh với Sudan Black B để lựa chọn chủng tối ưu sinh PHB theo thời gian.

2.6. Xác định cấu trúc của PHB bằng phương pháp FTIR

Cấu trúc của PHB được xác định qua thiết bị quang phổ hồng ngoại chuyển đổi Fourier (FTIR). Thiết bị FTIR đo quang phổ khi ánh sáng được truyền xuyên qua mẫu thử nghiệm, mỗi phân tử hóa chất có một tính chất bức xạ ánh sáng khác nhau từ đó có thể biết nhận ra được thành phần phân tử chất đó. Cấu trúc nhựa PHB xác định qua máy đo được so sánh đối chiếu với PHB thương phẩm của hãng Sigma Aldrich [9]. Các thí nghiệm được bố trí theo thể thức phân bố hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại. Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI sử dụng trắc nghiệm đa biến độ Duncan với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

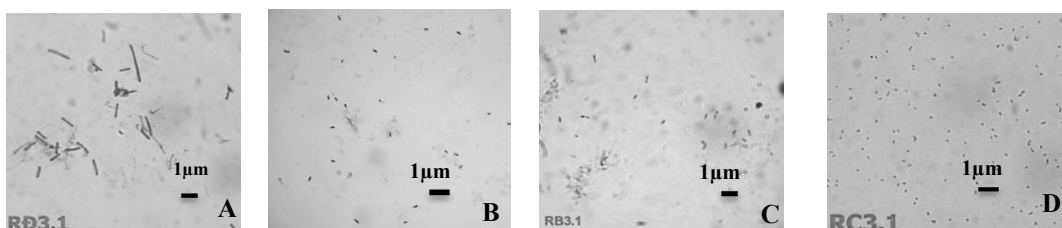
3.1. Kết quả phân lập mẫu

Thí nghiệm đã chọn lọc và phân lập được 8 chủng có khuẩn lạc đặc trưng từ 15 mẫu đất. Bên cạnh đó, 10 mẫu nốt sần cây họ đậu cũng đã được phân lập và chọn lọc làm thuần 5

chủng vi khuẩn. Các thử nghiệm sinh hóa cho thấy các chủng trên thuộc 2 họ vi khuẩn *Bacillaceae* và *Rhizobiaceae* từ đất trồng cây nông nghiệp, khu công nghiệp và nốt sần họ đậu. Kết quả này tương đồng với công bố của Mercan *et al.*(2002), theo đó, các chủng vi khuẩn thuộc họ *Rhizobium* sp. có khả năng sinh tổng hợp nhựa PHB với hàm lượng cao được thu nhận từ môi trường YEM bổ sung nitrogen và L-cystein [10].

3.2. Kết quả định tính nhựa poly-β-hydroxybutyrate (PHB)

Trong 13 chủng vi khuẩn phân lập, có 3 chủng ký hiệu CR2, RB3, RC3 (Hình 1) cho kết quả dương tính khi so sánh với chủng âm tính RD3. Chủng phân lập ký hiệu BU2, BU3, LA1 chưa xác định rõ được sự có mặt của PHB, các chủng còn lại điều cho kết quả âm tính. Tuy nhiên, kết quả này dựa trên phương pháp nhuộm PHB bằng Sudan black B mang tính chất định tính cơ bản, vì vậy có thể bị sai sót do quá trình nhuộm và đọc kết quả với các chủng vi khuẩn có hàm lượng nhựa PHB dự trữ trong tế bào ít. Phương pháp nhuộm Nile Blue A nên được áp dụng để đánh giá và so sánh bằng cách bắt màu cam sáng với hạt PHB trên nền đen khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng 460 nm [11].



Hình 1. Nhuộm PHB các chủng vi khuẩn thử nghiệm bằng Sudan Black B (A: Kết quả âm tính chủng RD3; B: Kết quả dương tính chủng CR2; C: Kết quả dương tính chủng RB3, D: kết quả dương tính với RC3)

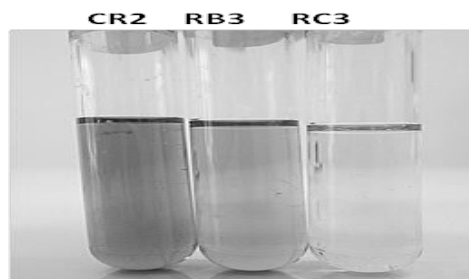
3.3. Kết quả so sánh khả năng sinh tổng hợp nhựa PHB

Khi so sánh sự sinh tổng hợp nhựa của 3 chủng vi khuẩn ký hiệu CR2, RB3, RC3 trong cùng một thời gian và điều kiện nuôi cấy cho thấy chủng CR2 và RB3 có sinh khối tạo thành ít hơn RC3, nhưng hàm lượng nhựa PHB cao hơn. Do vậy, có thể kết luận chủng CR2 có khả năng tổng hợp PHB cao nhất với hàm lượng PHB thu nhận được là $0,078 \pm 0,005$ g/L (Bảng 2). Bên cạnh đó, kết quả đo màu nhựa PHB được xác định và đánh giá qua việc bị thủy phân bằng H_2SO_4 đậm đặc cho thấy PHB từ chủng CR2 cho biểu hiện tốt nhất so với 2 chủng còn lại (Hình 2).

Bảng 2. Khối lượng PHB của các chủng vi khuẩn trên môi trường YEM

STT	Chủng	Sinh khối khô (g/L)	*PHB (g/L)	** Năng suất PHB (%)
1	CR2	$0,54^c \pm 0,029$	$0,078^c \pm 0,005$	14,52
2	RB3	$0,57^a \pm 0,025$	$0,042^a \pm 0,001$	7,45
3	RC3	$1,02^b \pm 0,028$	$0,058^b \pm 0,003$	5,65

Trong đó: *: xác định dựa vào sinh khối khô **: tỷ lệ của PHB/ sinh khối khô
 a, b, c : biểu diễn mô tả sự phân hạng có giá trị thống kê theo biên độ Duncan



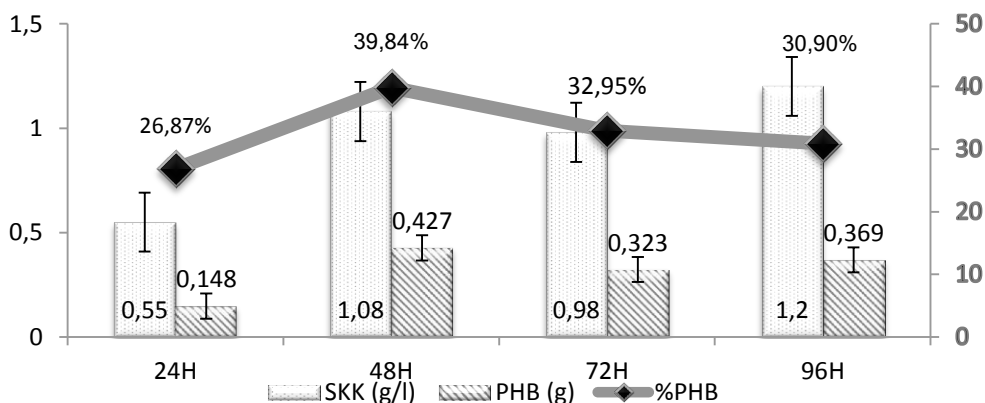
Hình 2. Màu PHB bị thủy phân bằng H₂SO₄ đậm đặc

3.4. Kết quả khẳng định vi khuẩn sinh PHB cao nhất bằng phương pháp định danh giải trình tự gene RNA 16S

Hai chủng CR2, RB3 được gửi mẫu thực hiện giải mã trình tự gene rRNA 16S. Trình tự gen sinh tổng hợp nhựa PHB được tra cứu với cây phát sinh loài BLAST NCBI. Kết quả cho thấy, chủng CR2 là chủng *Rhizobium gallicum* R602 (GenBankID: AJD46405.1), chủng RB3 là chủng *Agrobacterium tumefaciens* (GenBankID: JMKN01000011.1). Xây dựng cây phát sinh loài cho thấy mối quan hệ về loài cũng như về gen tổng hợp PHB của 2 loài này.

3.5. Kết quả khảo sát thời gian sinh tổng hợp nhựa PHB của chủng vi khuẩn tối ưu

Kết quả thu nhận PHB ở 48 giờ là tối ưu nhất, từ 72 giờ trở đi sinh khối có tăng nhưng hàm lượng nhựa PHB có trong tế bào giảm. Khi xem xét sinh khối ở cuối pha cân bằng và đầu pha suy vong thì nhận thấy nhựa PHB được vi sinh vật sử dụng để làm nguồn thức ăn duy trì sự phát triển của chúng (Hình 3).

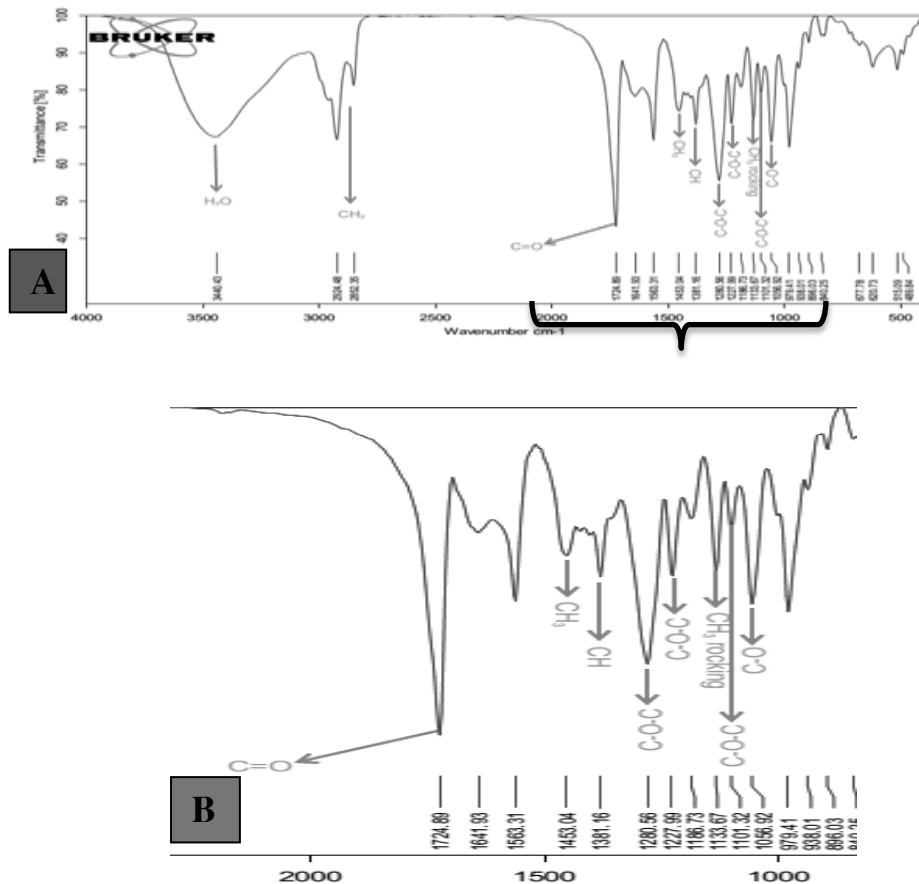


Hình 3. Thời gian nuôi cấy sinh nhựa PHB tối ưu nhất với sinh khối khô (SKK g/L), khối lượng PHB (g) và tỷ lệ PHB thu được (%)

Từ những kết quả trên, chủng CR2 là chủng đại được phân lập từ nốt sần cây cỏ đậu có năng suất tạo nhựa đạt 39,84% có tiềm năng và cần được nghiên cứu nhiều hơn nhằm tăng khả năng sinh tổng hợp nhựa. Kết quả này rất khả quan khi so sánh với một số nghiên cứu khác về khả năng tạo nhựa PHB của vi khuẩn *Methylobacterium* sp. khoảng từ 20-25% [5], vi khuẩn *Alcaligenes latus* VN1 đột biến đạt 55,6% trong khi đó chủng hoang dại là 39,3% [12], vi khuẩn *Methylobacterium radiotolerans* là 50,55% [13]. Đối với nghiên cứu về vi khuẩn *Rhizobium* spp. type 2426 phân lập từ nốt sần cây họ đậu đạt 40% và sau khi tối ưu hóa môi trường nuôi cấy có thể đạt 70% [14].

3.6. Kết quả xác định cấu trúc của PHB bằng phương pháp FTIR

Kết quả phân tích cấu trúc nhựa PHB có đỉnh hấp thụ $1724,89\text{ cm}^{-1}$ phù hợp với nhóm C=O chuẩn từ $1720\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$. Đỉnh hấp thụ $1453,04\text{ cm}^{-1}$ phù hợp với gốc CH_3 , gốc C-O-C tương ứng với các đỉnh hấp thụ $1280,56$, $1227,99$, $1101,2\text{ cm}^{-1}$. Đỉnh hấp thụ từ $1050\text{-}1058\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với gốc C-O. Một số đỉnh hấp thụ còn lại là do quá trình tách và chạy FTIR PHB dẫn đến cấu trúc bị đứt gãy và lẫn một số tạp chất khác như dH_2O , CO_3^{2-} (Hình 4). Từ kết quả này, có thể khẳng định lượng PHB thu nhận được có kết quả tốt bằng kỹ thuật FTIR. Những nghiên cứu chuyên sâu về phương pháp sản xuất nhựa PHB ở quy mô công nghiệp sẽ là tiền đề giảm giá thành và đưa sản phẩm nhựa phân hủy sinh học PHB đến với người tiêu dùng trên thế giới và Việt Nam [15].



Hình 4. Cấu trúc PHB xác định qua quang phổ hồng ngoại chuyển đổi Fourier (FTIR)
 (A: Cấu trúc PHB quan sát ở quang phổ rộng;
 B: Cấu trúc đặc trưng của PHB quan sát ở quang phổ hẹp)

4. KẾT LUẬN

Qua kết quả sơ bộ thu nhận được, nghiên cứu mở ra triển vọng ứng dụng các chủng *Rhizobium gallicum* (CR2) sinh nhựa poly-β-hydroxybutyrate (PHB) vào sản xuất công nghiệp. Vi khuẩn hoang dại *Rhizobium gallicum* được phân lập từ cây cỏ đậu có hàm lượng PHB tích trữ đạt 39,84% ở giai đoạn tăng sinh bổ sung cơ chất trong 48 giờ trên môi trường canh YEM. Do đó, việc nghiên cứu chuyên sâu về môi trường, điều kiện nuôi cấy và gen tổng hợp nhựa của chủng vi khuẩn *Rhizobium* sp. để có những giải pháp đột biến gen hoặc tăng hoạt động của gen nhằm tăng hiệu suất tạo nhựa. Các nghiên cứu về cơ chất cảm ứng,

điều kiện phản ứng và các yếu tố ảnh hưởng đến việc tạo nhựa PHB cũng như gia tăng sinh khối tế bào tạo nhựa cũng cần được đánh giá kỹ lưỡng. Việc tìm ra chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* cũng mở ra một hướng nghiên cứu mới về chuyển gen và tổng hợp nhựa PHB từ thực vật cũng như tăng tính đa dạng cho việc chọn tạo các chủng vi khuẩn mang gen tổng hợp PHB cao. Các ứng dụng của kỹ thuật tái tổ hợp và biến dị để thu nhận PHB tiềm năng ở quy mô công nghiệp trong tương lai cũng đã được ứng dụng nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty - Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 1978.
2. TajAl-Deen W., Al-Kaaby T., Al-Hussaniy A., Jadooh M. - Evaluation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus cereus*, Thesis for Bachelor degree, College of Science Babylon University **18** (2010) 1-6.
3. Walshaw D. L., Wilkinson A., Mundy M., Smith M. and Poole P. S. - Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminosarum*, Microbiology **143** (1997) 2209-2221.
4. Tombolini R., Povolo S., Buson A., Squartini A. and Nuti M. P. - Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti*, Microbiology **41** (141) (1995) 2553-2559.
5. Lê Lý Thùy Trâm - Nghiên cứu thu nhận nhựa phân hủy sinh học poly- β -hydroxybutyrate (PHB) từ vi khuẩn *Methylobacterium sp.* phân lập tại Việt Nam, Luận văn Thạc sỹ, Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM, 2006.
6. Pettinari M. J., Va'Zquez G. J., Silberschmidt D., Rehm B., Steinbu Chel A. & Me'Ndez, A. M. - Poly(3-Hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter sp.* strain FA8', Applied and Environmental Microbiology **67** (11) (2001) 5331-5334.
7. Gallego V., García T. M. & Ventosa A. - *Methylobacterium hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55** (2005) 281-287.
8. Roy N., Bhattacharyya P. and Chakrabarty P. K. - Iron acquisition during growth in an iron- deficient medium by *Rhizobium sp.* isolated from *Cicer arietinum*, Microbiology **140** (1994) 2811-2820.
9. Sigma-Aldrich - Sudan Black B, Staining System, Sigma Co Ltd., Germany (2003) 7329-970.
10. Mercan N, Aslim B., Ksekdaú Z. N. Y., Yeyatli Y. - Production of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) by some *Rhizobium* bacteria, Pamukkale & Gazi University Press, Turkey, 2002.
11. Ostle A. G., Holt J. G. - Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate, Applied and Environmental Microbiology **44** (1982) 238-241.
12. Phạm Thanh Hà, Trần Đình Mẫn, Yutaka Tokiwa - Tạo đột biến nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp poly- β - hydroxybutyrate của vi khuẩn *Alcaligenes latus* VN1, Tạp chí Công nghệ Sinh học **6** (2008) 489-496.
13. Kiều Phương Nam - Phân lập, định danh và khảo sát sự tác động vi khuẩn *Methylobacterium sp.* lên sự phát sinh hình thái ở thực vật, Luận văn Thạc sỹ ngành Công nghệ Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM, 2006.

14. Lakshmi L. S, Hema T. A., Raj D.T., Shylaja S.T. - Production and optimization of Poly-hydroxybutyrate from *Rhizobium* sp. present in root nodules, Tamil Nadu **3** (2) (2012) 2278-3008.
15. Bùi Thị Thanh Mai, Trần Đình Mẫn, Nguyễn Quốc Việt, Phạm Thanh Hà - Phân loại chủng vi khuẩn V23-X1.1 có khả năng sinh tổng hợp Poly-β-hydroxybutyrate, Tạp chí Công nghệ Sinh học **8** (1) (2010) 1-6.

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF POLY- β -HYDROXYBUTYRATE BIOSYNTHESIS FROM BOTANICAL RESOURCES IN BINH DUONG PROVINCE, VIETNAM

Nguyen Thanh Luan^{1,*}, Nguyen Thi Lien Thuong²,
Nguyen Thi Quynh Mai¹, Nguyen Minh Chanh¹

¹*Ho Chi Minh City University of Food Industry*

²*Thu Dau Mot University*

*Email: luannt@cntp.edu.vn

Bioplastic poly-β-hydroxybutyrate (PHB) derived from bacteria is known as a substance with high thermal stability and ready biodegradability. The aim of this study was to isolate and identify some bacteria that would be able to synthesize plastic by biological pathway from soil and botanical resources in Binh Duong province, Vietnam. Optimization of incubation time periods was conducted to maximize PHB accumulation. The results of 16S rRNA sequencing indicated the bacterial isolates exhibited PHB synthesis are *Rhizobium gallicum* and *Agrobacterium tuminfaciens*. The highest PHB yield was 39,84% obtained when *Rhizobium gallicum* was cultured in 48 hours period. The FTIR spectrum of bioplastic sample showed the similarity in its characteristics to the commercial PHB. The present study has thus provided useful data on some bacterial isolates for PHB production that can be potential for industrial application in manufacture of PHB, an emerging alternative of non-biodegradable plastics.

Keywords: Poly-β-hydroxybutyrate, PHB, *Rhizobium gallicum*, *Agrobacterium tuminfaciens*, bioplastic.