

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



PHẠM THỊ TRANG

**TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍCH LŨY NHỰA
SINH HỌC POLYHYDROXYALKANOATE (PHA) DẠNG
COPOLYMER PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ
SINH HỌC THỰC NGHIỆM

HÀ NỘI – 2022

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



PHẠM THỊ TRANG

**TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍCH LŨY
NHỰA SINH HỌC POLYHYDROXYALKANOATE (PHA)
DẠNG COPOLYMER PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Nguyễn Kim Thoa

HÀ NỘI – 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm.

Học viên

Phạm Thị Trang

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập, thực hiện và hoàn thành đề tài khóa luận này, tôi đã nhận được sự quan tâm, giúp đỡ và tạo điều kiện vô cùng quý giá từ nhiều cá nhân và tập thể.

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới cô giáo, TS. Nguyễn Kim Thoa. Cô đã tận tình giúp đỡ, chỉ bảo và hướng dẫn tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn này. Kết quả nghiên cứu trong luận văn này là một phần trong nội dung nghiên cứu từ đề tài ***“Nghiên cứu thu nhận và tinh chế nhựa sinh học PHA dạng copolymer từ các chủng vi khuẩn phân lập ở Việt Nam”*** mã số TĐNSH0.07/22-24.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới chị Lại Thị Hồng Nhung và tập thể cán bộ phòng Công nghệ vật liệu sinh học – Viện Công nghệ Sinh học – Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực tập.

Tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến Thầy Cô giáo trong Khoa Công nghệ Sinh học, Ban giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ đã truyền đạt cho tôi những kiến thức, kinh nghiệm bổ ích quý báu trong suốt thời gian học thạc sĩ tại trường.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng tri ân tới gia đình, bạn bè của tôi– những người luôn bên tôi, ủng hộ, khích lệ, động viên, chia sẻ những khó khăn và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	viii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Polyhydroxyalkanoate.....	3
1.1.1. Phân loại PHA	3
1.1.2. Đặc tính hóa lý của một số loại PHA	4
1.1.3. Con đường sinh tổng hợp PHA.....	6
1.1.4. Ứng dụng của PHA	8
1.2. Các nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp PHA dạng copolymer	8
1.3. PHA từ nhóm vi sinh vật ưa mặn.....	10
1.4. Tình hình nghiên cứu trong nước về PHA.....	11
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. Vật liệu.....	16
2.2. Dụng cụ, thiết bị máy móc, hóa chất	17
2.2.1. Dụng cụ	17
2.2.2. Thiết bị máy móc	17
2.2.3. Hóa chất.....	18
2.2.4. Môi trường nuôi cấy.....	18
2.3. Phương pháp nghiên cứu	19
2.3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn từ các mẫu nước và trầm tích biển	19
2.3.2. Đánh giá sơ bộ khả năng tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn biển.....	19
2.3.3. Lên men sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển	20
2.3.4. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển.....	20

2.3.4.1.	Ảnh hưởng của pH lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển	20
2.3.4.2.	Ảnh hưởng của nhiệt độ lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển	20
2.3.4.3.	Ảnh hưởng của tỷ lệ giống lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển	21
2.3.4.4.	Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển	21
2.3.4.5.	Ảnh hưởng của nồng độ glycerol lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển	21
2.3.5.	Xác định khối lượng tế bào khô (CDW)	21
2.3.6.	Tách chiết PHA.....	21
2.3.7.	Định lượng PHA.....	22
2.3.8.	Xác định thành phần PHA	23
2.3.9.	Xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào	23
2.3.10.	Xác định nhu cầu sử dụng oxy	23
2.3.11.	Hoạt tính catalase.....	23
2.3.12.	Hoạt tính thủy phân tinh bột, CMC và gelatin.....	24
2.3.13.	Khả năng sử dụng các nguồn đường	24
2.3.14.	Tách chiết DNA tổng số của các chủng vi khuẩn	24
2.3.15.	Khuếch đại gene 16S rRNA của các chủng vi khuẩn	25
2.3.16.	Giải trình tự gene 16S rRNA của các chủng vi khuẩn.....	25
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		26
3.1.	Phân lập các chủng vi khuẩn từ các mẫu nước và trầm tích biển	26
3.2.	Sàng lọc nhanh các chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHA ..	28
3.3.	Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, tỷ lệ giống, độ thoáng khí và nồng độ cơ chất lên quá trình sinh trưởng và tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn	30
3.3.1.	Ảnh hưởng của pH	30
3.3.2.	Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	32
3.3.3.	Ảnh hưởng của tỷ lệ giống	34
3.3.4.	Ảnh hưởng của độ thoáng khí	35
3.3.5.	Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất	36
3.4.	Xác định thành phần PHA	38
3.5.	Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn biển tích lũy PHA	40

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	46
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	47
TÀI LIỆU THAM KHẢO	48
PHỤ LỤC.....	57
Phụ lục 1: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 1.6.....	57
Phụ lục 2: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 5.3.....	57
Phụ lục 3: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 5.6.....	58
Phụ lục 4: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 6.2.....	58
Phụ lục 4: Trình tự gen 16s RNA của chủng 6.5.....	59
Phụ lục 6: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 6.6.....	60

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

STT	Từ viết tắt	Giải nghĩa tiếng Anh	Giải nghĩa tiếng Việt
1.	BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Công cụ để so sánh các trình tự gen/ protein cơ bản
2.	Cs		Cộng sự
3.	DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
4.	LB	Luria Bertani	
5.	ml	Mililiter	Mililit
6.	NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (Mỹ)
7.	OD	Optical Density	Mật độ quang
8.	PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
9.	PHA	Polyhydroxyalkanoate	
10.	PHB	Poly (3-hydroxybutyrate)	
11.	PHBV	Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	
12.	HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
13.	RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
14.	Salinity HT		Môi trường tối thiểu lên men tổng hợp Polyhydroxyalkanoate
15.	Salinity LB		Môi trường dinh dưỡng đặc hiệu cho vi khuẩn biển (có nồng độ muối 3%)
16.	sp.	Species	Loài
17.	TAE	Tris – acetate - EDTA	
18.	μl	Microliter	Micrôlít

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1: Đặc điểm mẫu nước và trầm tích biển vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa	16
Bảng 3.1. Số lượng vi khuẩn phân lập từ các mẫu nước biển và trầm tích của vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa	28
Bảng 3.2: Thành phần và nồng độ các monomer của PHA thu nhận từ các chủng vi khuẩn biển.	40
Bảng 3.3: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn biển tuyển chọn.	41
Bảng 3.4: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHA	42
Bảng 3.5: Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của các chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHA	43
Bảng 3.6: Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số tách chiết từ các chủng vi khuẩn tuyển chọn	44

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1: Cấu trúc hóa học của (a) 3-Hydroxypropionate (HP), (b) 3-hydroxybutyrate (HB), (c) 3-hydroxyvalerate (HV), (d) 4-hydroxybutyrate (4HB), (e) 3-hydroxyhexanoate (Hx), and (f) 3-hydroxyoctanoate (HO).....	4
Hình 1.2: Các con đường sinh tổng hợp PHA trong tế bào	7
Hình 1.3: Các ứng dụng của polyhydroxyalkanoat (PHA) trong các lĩnh vực khác nhau.....	8
Hình 2.1: Hình ảnh mẫu nước và mẫu trầm tích được lấy ở vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa.....	17
Hình 2.2: Đường chuẩn PHB được xác định theo phương pháp axit crotonic.....	22
Hình 3.1: Hình ảnh phân lập các chủng vi khuẩn ưa mặn từ các mẫu nước và trầm tích vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa.	27
Hình 3.2A: Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn biển 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6 bắt màu với dung dịch Sudan black B (A).....	29
Hình 3.2B: Tế bào của các chủng vi khuẩn biển 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6 được nhuộm với dung dịch Nile Blue A và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang đồng tiêu Nikon C1 ở bước sóng 460 nm.	29
Hình 3.3: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn	31
Hình 3.4: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn.	33
Hình 3.5: Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn	34
Hình 3.6: Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn	36
Hình 3.7: Ảnh hưởng của nồng độ glycerol đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn.....	37
Hình 3.8: Sắc ký đồ thành phần PHA của chất chuẩn PHBV (chứa 12% 3HV) và 2 chủng vi khuẩn biển đại diện 1.6 và 6.6 phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng cao áp Agilent 1290 infinity II.....	39
Hình 3.9: Sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rARN của các chủng có khả năng tích lũy PHA trên gel agarose 0,8%	44
Hình 3.10: Cây phát sinh chủng loại các chủng 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6 được xây dựng bằng phần mềm MEGA X trong phương pháp maximum-likelihood.....	45

MỞ ĐẦU

Xu hướng chung của thế giới hiện nay trước vấn đề quá tải rác thải nhựa là tập trung đẩy mạnh sản xuất các sản phẩm nhựa có khả năng phân hủy sinh học hoàn toàn nhằm hạn chế tối đa các mảnh nhựa bị phân rã trong môi trường tự nhiên. Nhựa sinh học với đặc tính thân thiện với môi trường, bị phân hủy trong tự nhiên thành CO₂ và nước trong thời gian ngắn được xem là cuộc cách mạng quan trọng trong công nghệ chất dẻo, là một giải pháp có tiềm năng ứng dụng và thay thế nhựa truyền thống. Số liệu của European Bioplastics cho thấy tổng năng lực sản xuất các loại nhựa sinh học chiếm 0,9 triệu tấn; dự kiến tăng lên 2,62 triệu tấn vào năm 2023, và đạt 2,87 triệu tấn vào năm 2025, tương đương với mức tăng trưởng trung bình 4,4% một năm trong giai đoạn 2018-2023, cao hơn 1% so với nhựa truyền thống [1]. Điều này cũng đồng nghĩa với nhu cầu về nguyên liệu nhựa sinh học ngày càng tăng, thúc đẩy nhà sản xuất mở rộng quy mô sản xuất, nguồn cung nguyên liệu cũng như hoàn thiện phương pháp sản xuất nhựa sinh học. Các nhựa sinh học phổ biến hiện nay là các polyeste như polylactic axit (PLA), poly(butyrat adipat terephthalat) (PBAT), polycaprolacton (PCL), polyhydroxyalkanoat (PHA) có thể phân hủy sinh học hoàn toàn bởi vi sinh vật trong khi chúng có đặc tính cơ, lý, hóa ưu việt, có thể so sánh với nhựa nhiệt dẻo thông thường. Đây là các loại nhựa có tiềm năng thay thế nhựa nhiệt dẻo truyền thống, mở rộng phạm vi ứng dụng của nhựa sinh học trong nhiều ứng dụng khác nhau, từ bao bì, đồ gia dụng đến các vật liệu tiên tiến y sinh, hóa dược.

Ở Việt Nam, nhựa là một trong các ngành công nghiệp có tốc độ tăng trưởng tương đối nhanh so với tốc độ phát triển của nền kinh tế chung. Tăng trưởng trung bình của ngành nhựa Việt Nam là 11,6%/năm, cao hơn so với mức tăng trưởng 3,4%/năm của ngành nhựa thế giới. Song song với tốc độ tăng trưởng cao, ngành nhựa cũng gây ra một áp lực rất lớn đối với môi trường do rác thải nhựa gây ra. Việt Nam là một trong 5 nước có lượng rác thải nhựa ra biển lớn nhất trên thế giới với khoảng 1,8 triệu tấn/năm. Xuất phát từ thực tế trên, các cơ quan quản lý Nhà nước cũng đã và đang đưa ra nhiều biện pháp, chính sách nhằm giảm thiểu ô nhiễm môi trường do rác thải nhựa gây ra. Cho đến nay, các nghiên cứu chế tạo một số vật liệu nhựa có khả năng phân hủy sau khi sử dụng, thay thế nhựa truyền thống đã được thực hiện, tuy vậy các kết quả đạt được còn tương đối rời rạc, ở quy mô nhỏ. Để có thể chủ động trong quá trình sản xuất, bắt kịp xu hướng phát triển nhựa sinh học trên thế giới chúng ta cần làm chủ được công nghệ sản xuất và tổng hợp các loại nguyên liệu nhựa sinh học từ các nguồn nguyên liệu sẵn có trong nước với giá thành rẻ. Một trong những thế mạnh hiện nay của công nghệ sinh học là có thể tạo ra nguyên liệu nhựa sinh học thông qua khai thác các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật.

Polyhydroxyalkanoate (PHA) là lớp polyester của các axit hydroxycarboxylic khác nhau, được tổng hợp bởi các loại vi sinh vật dưới dạng năng lượng dự trữ khi điều kiện sinh trưởng bị giới hạn. PHA mang các đặc tính cơ lý tương tự như các loại nhựa có nguồn gốc từ dầu mỏ nhưng ưu việt hơn như không độc hại, không tan trong nước, tương thích sinh học cao và đặc biệt là khả năng phân hủy sinh học, do đó chúng trở thành một trong những loại polymer có tiềm năng lớn để thay thế các loại vật liệu nhựa truyền thống [2]. Cùng với một số loại nhựa sinh học khác như PLA, PBAT, PHA hiện nay đã được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, y tế, dược phẩm, nông nghiệp v.v. [3]. Các PHA có bản chất homopolymer (3HB) thường có tính kết tinh cao do đó vật liệu tương đối giòn, cứng, với tỷ lệ kéo dài thấp. Trong khi đó các vật liệu copolymer đã khắc phục được những hạn chế của homopolymer, vì vậy việc tìm kiếm các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp các copolymer có chứa các monomer khác với 3-hydroxybutyrate (3HB) là một điều cần thiết.

Việt Nam với lợi thế hơn 11.000 km đường biển, là một trong những đất nước có mức độ đa dạng vi sinh vật biển cao, do đó việc khai thác và bảo tồn nguồn vi sinh vật ở hệ sinh thái này mang lại nhiều tiềm năng phát triển, đặc biệt là các chủng vi sinh vật có khả năng tích lũy PHA. Một số nghiên cứu trong nước cũng như quốc tế cũng đã tập trung vào nhóm các chủng vi sinh vật chịu mặn tổng hợp PHA với các đặc tính vật liệu hữu ích. Chính từ những cơ sở đã phân tích ở trên, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: ***“Tuyển chọn các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa sinh học Polyhydroxyalkanoate (PHA) dạng copolymer phân lập ở Việt Nam”*** trong đó tập trung vào nhóm vi khuẩn biển, với mục tiêu:

- Thu nhận được các chủng sinh tổng hợp PHA dạng polymer.
- Thu nhận được nhựa PHA từ các chủng tuyển chọn.

Để đạt được mục tiêu nghiên cứu này, chúng tôi đã thực hiện các nội dung nghiên cứu sau:

- *Phân lập các chủng vi khuẩn từ vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa.*
- *Sàng lọc các chủng vi khuẩn biển sinh tổng hợp PHA.*
- *Đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố như pH, nhiệt độ lên mức độ sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.*
- *Thu nhận PHA từ các chủng tuyển chọn và phân tích thành phần PHA.*
- *Phân loại các chủng vi khuẩn sinh PHA tuyển chọn.*

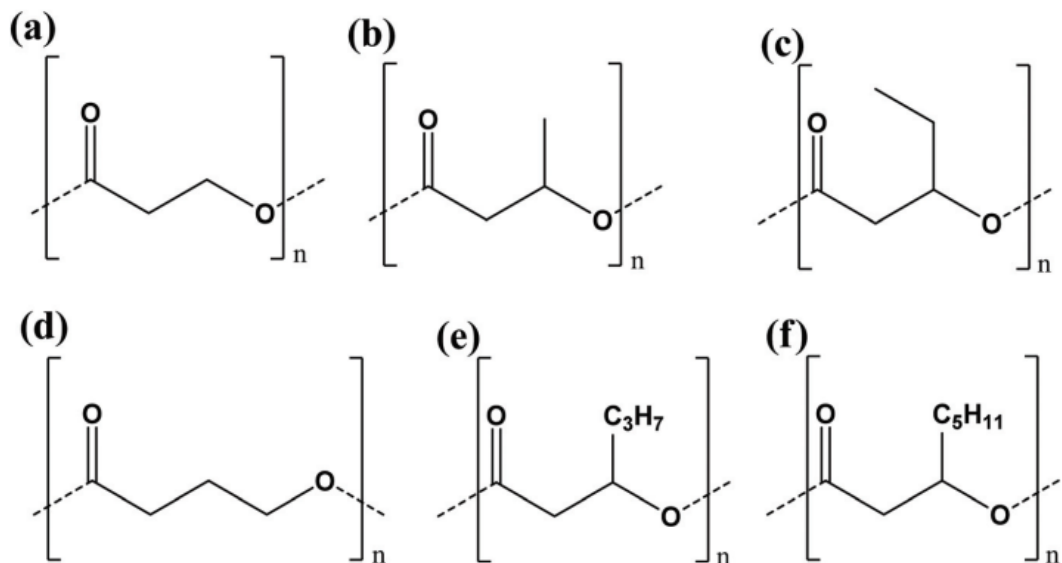
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Polyhydroxyalkanoate

Polyhydroxyalkanoate (PHA) là lớp polyeste của các axit hydroxycarboxylic khác nhau, được tổng hợp bởi các loại vi sinh vật dưới dạng năng lượng dự trữ. Khi điều kiện sinh trưởng bị hạn chế do dư thừa carbon nhưng lại thiếu nguồn nitơ, photpho, lưu huỳnh, oxy v.v thì vi sinh vật điều khiển các hoạt động trao đổi chất của chúng theo cách mà thay vì tuân theo chu trình axit tricarboxylic thông thường, acetyl-CoA được chuyển hướng sang tổng hợp PHA. PHA không hòa tan trong nước, được tích lũy bởi vi khuẩn dưới dạng các hạt nội bào trong bào tương, tạo thành các thể vùi. Do PHA mang các đặc tính cơ lý tương tự như các loại nhựa có nguồn gốc từ dầu mỏ nên chúng trở thành một trong những loại polymer có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành sản xuất. Hơn thế nữa PHA có thể phân hủy sinh học trong các môi trường khác nhau, do đó chúng là lựa chọn hấp dẫn để thay thế nhựa sử dụng một lần. Với đặc tính phân hủy sinh học của chúng, PHA hình thành một chu trình sản xuất vòng khép kín giảm thiểu tác động đến môi trường. Có hơn 150 loại axit polyhydroxyalkanoic khác nhau tạo nên họ PHA [4]. Dựa vào sự liên kết của các đơn phân monomer đã tạo ra số lượng khổng lồ các chuỗi PHA có khối lượng, thành phần monomer và chiều dài chuỗi khác nhau.

1.1.1. Phân loại PHA

PHA có thể được phân loại dựa trên số lượng nguyên tử carbon của chuỗi polymer hoặc dựa trên bản chất của các monomer trong chuỗi. Dựa vào độ dài chuỗi, PHA được chia thành 3 loại: (i) chuỗi ngắn từ 3–5 carbon (SCL-PHA); (ii) chuỗi trung bình từ 6–14 carbon (MCL-PHA); và (iii) chuỗi dài gồm hơn 15 nguyên tử carbon (LCL-PHA). PHA chuỗi ngắn và chuỗi trung bình là các loại polymer có liên kết, khi được tạo ra từ các axit béo không bão hòa [5.]. Các PHA điển hình có thể kể đến là poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) và poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), cả hai đều là PHA chuỗi ngắn và đại diện cho các dạng cơ bản nhất có sẵn trên thị trường. Các loại PHA hiện có khác được sử dụng trong các nghiên cứu phân hủy sinh học là poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (PH4B), poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHx) và poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) (PHBO).



Hình 1.1: Cấu trúc hóa học của (a) 3-Hydroxypropionate (HP), (b) 3-hydroxybutyrate (HB), (c) 3-hydroxyvalerate (HV), (d) 4-hydroxybutyrate (4HB), (e) 3-hydroxyhexanoate (Hx), and (f) 3-hydroxyoctanoate (HO) [6]

Dựa vào bản chất monomer, PHAs được chia thành hai loại homopolymer và heteropolymer. Trong khi homopolymer chỉ chứa một loại monomer axit béo 3-hydroxy duy nhất thì heteropolymer có thể chứa hai hoặc nhiều loại monomer khác nhau, do đó chúng còn có tên là copolymer. Ví dụ điển hình của homopolymer là poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) chỉ có một dạng monomer là 3HB. P3HB (PHB) có tính kết tinh cao ($> 50\%$), do đó tương đối giòn và cứng, với tỷ lệ kéo dài và đứt gãy thấp. Vì vậy, các nỗ lực tạo phức PHB chủ yếu tập trung vào việc tìm kiếm chất hóa dẻo và chất hạt nhân làm giảm quá trình kết tinh và cải thiện tính linh hoạt. PHA dạng copolymer có chứa hỗn hợp gồm các tiểu đơn vị có chiều dài 4-5 carbon và chứa các monomer 3-hydroxyvalerate (3HV) hoặc 4-hydroxybutyrate (4HB) khi nuôi cấy các chủng vi khuẩn với axit valeric. Việc kết hợp HV vào polymer PHB tạo ra poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB/3HV)), ít cứng và giòn hơn P(3HB) nguyên chất [7].

1.1.2. Đặc tính hóa lý của một số loại PHA

Một số đặc tính hóa lý của PHA như tính kỵ nước của polymer, điểm nóng chảy, nhiệt độ chuyển thủy tinh và mức độ kết tinh hoàn toàn thay đổi đáng kể phụ thuộc vào thành phần của monomer cấu thành. Họ PHA thể hiện nhiều tính chất cơ học khác nhau, từ dạng tinh thể cứng đến dạng đàn hồi.

Các PHA dạng chuỗi ngắn và vừa: Các polymer sinh học có độ dài chuỗi ngắn thường có đặc tính cứng, giòn, có mức độ kết tinh cao (khoảng 60 – 80%) trong khi

PHA có độ dài chuỗi trung bình dễ uốn dẻo và đàn hồi hơn, có độ kết tinh thấp (25%), độ bền kéo thấp, độ giãn dài cao, nhiệt độ nóng chảy thấp và T_g thấp hơn nhiệt độ phòng [8].

P(3HB): PHB là polymer thuộc họ PHA được nghiên cứu rộng rãi nhất nên hầu hết các đặc tính của PHA thường được giải thích từ tính chất của PHB. P(3HB) có tính kết tinh cao do tính ổn định trong cấu trúc không gian của nó. P(3HB) không tan trong nước và tương đối bền với phản ứng thủy phân. Nó có tính thấm O_2 thấp, là loại nhựa nhiệt dẻo tốt nhưng các tính chất cơ học và độ bền kéo kém hơn so với các polymer có nguồn gốc từ dầu mỏ, ví dụ như polypropylene [9]. Mật độ của PHB tinh thể và vô định hình lần lượt là 1,26 và 1,18 g/cm³. Khối lượng phân tử của P(3HB) thu nhận từ vi khuẩn phân lập trong tự nhiên thường nằm trong khoảng 10.000–3.000.000 Da với độ phân tán khoảng 2. P(3HB) tinh khiết về mặt quang học và sở hữu điện piezo, giúp trong quá trình tạo xương [10]. P(3HB) là vật liệu rất giòn và cứng, tuy nhiên tính chất vật lý của homopolymer P(3HB) có thể được cải thiện bằng cách tạo ra các polymer có khối lượng phân tử cao. Ví dụ như tách dòng gene *PHA synthase* của *C. necator* và biểu hiện dị hợp ở *Escherichia coli* tái tổ hợp.

P(4HB): Poly(4-hydroxybutyrate) (PH4B) là một vật liệu nhựa nhiệt dẻo bền và dễ uốn với độ bền kéo tương đương với polyethylen. Nó có độ giãn dài khi đứt là 100%, do đó có đặc tính cực kỳ đàn hồi. Khi kết hợp với các hydroxy axit khác, các đặc tính hoá lý của P (4HB) có thể thay đổi [11].

P(3HB-co-3HV): Việc kết hợp các monomer hydroxy axit thứ cấp khác ngoài 3HB như 3-hydroxyvalerate, 3-hydroxyhexanoate, 3-hydroxypropionat và 4-hydroxybutyrate vào chuỗi polymer để tạo thành copolymer là phương pháp phổ biến nhằm cải thiện đáng kể các tính chất vật liệu của P(3HB) như độ kết tinh, điểm nóng chảy, độ cứng và độ bền kéo. Copolymer phổ biến nhất P(3HB-co-3HV) có độ kết tinh và nhiệt độ nóng chảy thấp hơn, giảm độ cứng, tăng độ bền kéo, linh hoạt hơn (giảm Young's Modulus) so với P(3HB). Phần trăm số mol của 3HV rất quan trọng trong việc xác định các tính chất của copolymer. Tính chất cơ nhiệt có thể rất đa dạng vì thành phần của P(3HB-co-3HV) có thể nằm trong khoảng từ 0 đến 30 mol% 3HV [12]. Ví dụ P(3HB-co-3HV) chứa hơn 20 mol% đơn vị 3HV có thể được sử dụng để tạo màng và sợi có độ đàn hồi khác nhau bằng cách kiểm soát các điều kiện xử lý [13]. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) kết hợp các đặc tính cơ nhiệt của PE (độ bền, độ mềm dẻo, độ dẻo, độ dai, độ đàn hồi) với các tính chất vật lý - hóa học của polyester (khả năng in, khả năng nhuộm). Nó có thể blend với PLA và tinh bột nhiệt dẻo.

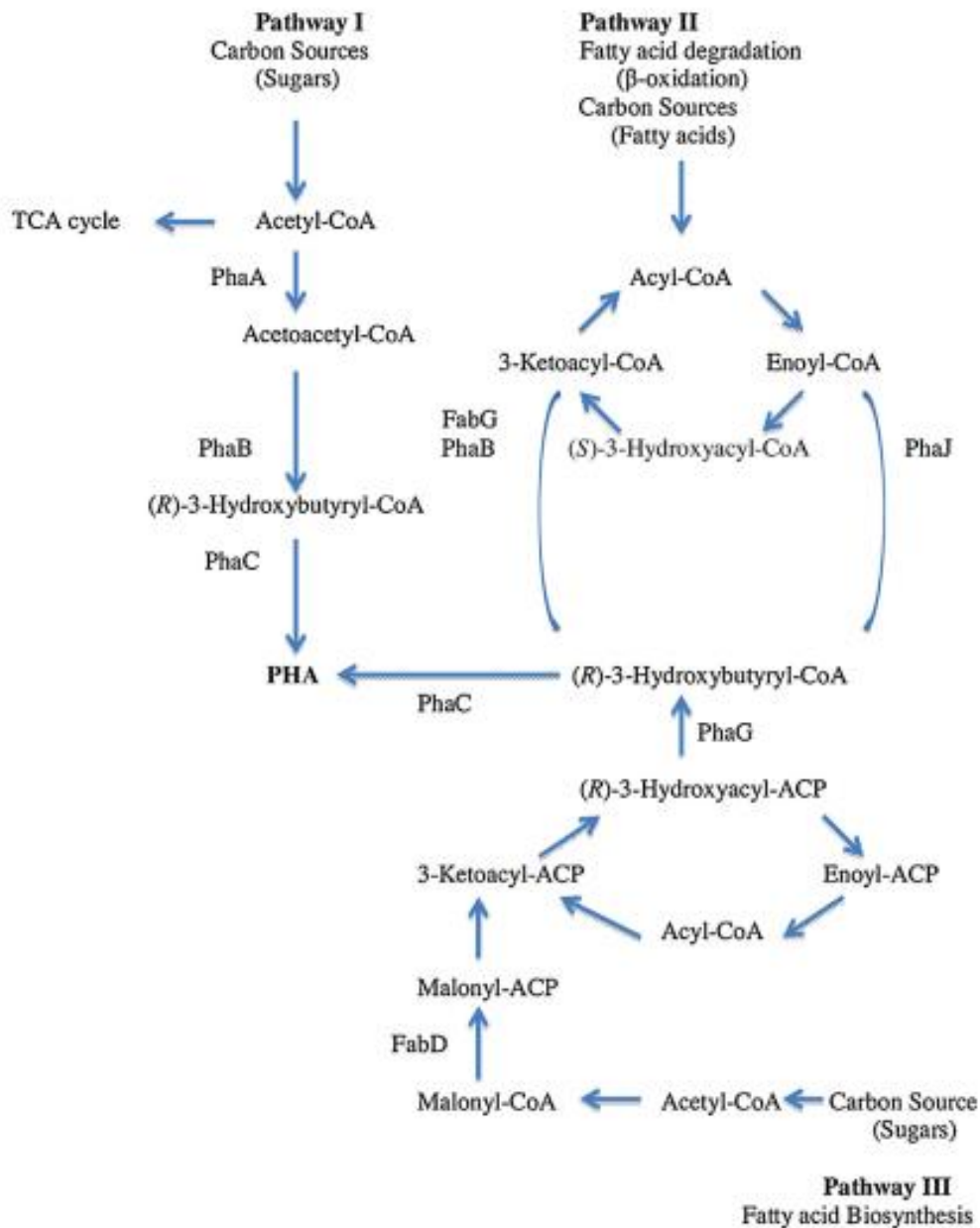
PHA terpolymer: PHA terpolymer được biết đến là dạng vật liệu tốt hơn so với các copolymer khác. Việc liên kết nhiều hơn một loại monomer thứ cấp vào chuỗi polymer sẽ cải thiện được các đặc tính của vật liệu. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng PHA terpolymer P(3HB-co-3HV-co-3HHx) có độ vô định hình cao hơn, không phát hiện thấy đỉnh nóng chảy trong terpolymer với 39 mol% 3HV và 3 mol% 3HHx, trong khi độ bền kéo là 12 MPa và độ giãn dài khi đứt là 408%. Trong khi đó P(3HBco-3HV-co-4HB) với 93 mol% 4HB và 3 mol% 3HV thể hiện độ giãn dài 430%, độ bền kéo 33 MPa và Young's modul là 127 MPa, tương tự như LDPE. Terpolymer với 55 mol% 4HB và 34 mol% 3HV cho thấy Young's modul là 618 MPa, tương tự như của polypropylene [14,15].

1.1.3. Con đường sinh tổng hợp PHA

Ba con đường sinh tổng hợp PHA phổ biến được trình bày ở Hình 1.2. Thành phần monomer của PHA phụ thuộc một phần đến nguồn carbon được sử dụng trong lên men. Con đường I được biết đến nhiều nhất trong số các con đường sinh tổng hợp PHA. Trong con đường này, các monomer 3HB được tạo ra do sự ngưng tụ của hai phân tử acetyl-CoA từ chu trình TCA để tạo thành acetoacetyl-CoA do enzyme-ketothiolase xúc tác. Acetoacetyl CoA reductase tác động lên acetoacetyl-CoA để tạo thành 3-hydroxybutyryl-CoA. Cuối cùng, PHA synthase xúc tác quá trình trùng hợp thông qua quá trình este hóa 3 hydroxybutyrylCoA thành poly (3-hydroxybutyrate) (P(3HB)). PHBV được sản xuất trong các điều kiện tương tự nhưng với sự hiện diện của axit propionic với hợp chất ban đầu là 3-ketovaleryl-CoA [16, 17]. Con đường II đặc trưng bởi phản ứng β -oxy hoá các axit béo trước, sau đó enzyme PHA synthase sẽ xúc tác quá trình polymer hoá. Ví dụ điển hình của con đường tổng hợp này được ghi nhận ở loài *Pseudomonas aeruginosa*. Ở *A. caviae*, chất trung gian của phản ứng β -oxy hóa, trans-2-enoyl-CoA được chuyển thành (R)-hydroxyacyl-CoA bởi một (R)-enoyl-CoA hydratase đặc hiệu. Con đường III được quan tâm đáng kể vì nó giúp tạo ra các monomer để tổng hợp PHA từ các nguồn carbon đơn giản, rẻ tiền không liên quan về cấu trúc như glucose, sucrose và fructose. Chất trung gian (R) -3-hydroxyacyl từ con đường sinh tổng hợp axit béo được chuyển đổi từ dạng protein mang acyl (ACP) của chúng thành dạng CoA bởi enzyme acyl-ACP-CoA transacylase (được mã hóa bởi phaG).

Trình tự của các gene *phaC* mới mã hóa cho enzyme PHA synthase có thể dẫn đến sự tổng hợp các PHA có thành phần monomer mới. Nguồn gene mới này thường được thu nhận từ các chủng vi khuẩn phân lập tại các hệ sinh thái khác nhau [18,19,20]. DNA metagenome tách chiết từ quần xã vi sinh vật đất được sử dụng để

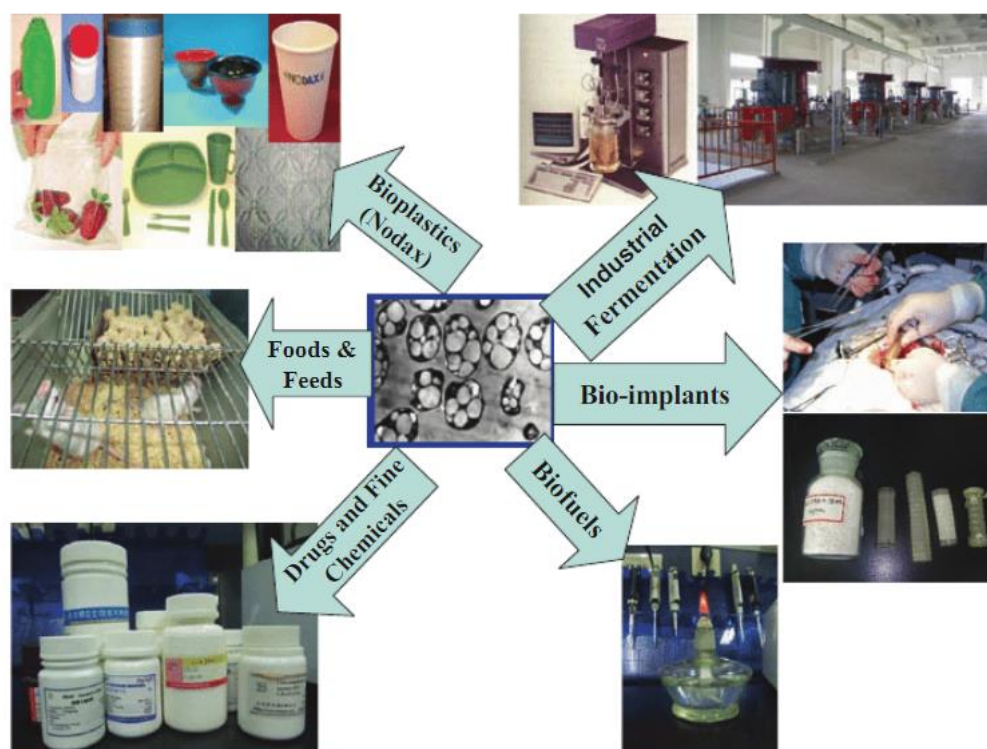
tạo thư viện metagenome nhằm sàng lọc các gene *phaC* mới [21]. Tách dòng và biểu hiện các gene *phaC* này sẽ có cơ hội tìm kiếm được các enzyme PHA synthase mới (*PhaC1* và *PhaC2*). Các dòng gene *phaC* mới đã được tách dòng trong cosmid pRK7813 [22, 23] và biểu hiện trong *P. putida* LS46 tạo thành chủng tái tổ hợp *P. putida* LS46123. Chủng tái tổ hợp tổng hợp được copolymer với tỷ lệ 50 mol % đơn vị chuỗi ngắn (3-HB và 3-HV) gắn với các chuỗi PHA dài trung bình khác nhau. Các polymer PHA với thành phần đơn phân khác nhau sẽ có các đặc tính vật lý và nhiệt độ khác nhau phù hợp với các định hướng ứng dụng [24].



Hình 1.2: Các con đường sinh tổng hợp PHA trong tế bào [25]

1.1.4. Ứng dụng của PHA

Trong 10 năm qua, PHA đã được phát triển nhanh chóng để tìm kiếm các ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau (Hình 1.3) [26]. PHA có các đặc tính phong phú tùy thuộc vào cấu trúc. Các chất đồng phân tạo, chất đồng trùng hợp ngẫu nhiên và chất đồng trùng hợp khối của PHA có thể được sản xuất tùy thuộc vào loài vi khuẩn và điều kiện phát triển. Với hơn 150 monome PHA khác nhau đã được báo cáo, PHA với các đặc tính nhiệt và cơ học linh hoạt đã được phát triển [27]. Sự đa dạng như vậy đã cho phép phát triển các ứng dụng khác nhau, bao gồm nhựa phân hủy sinh học thân thiện với môi trường cho mục đích đóng gói, sợi, thiết bị cấy ghép có thể phân hủy sinh học và tương thích sinh học, bao gói thuốc, v.v



Hình 1.3: Các ứng dụng của polyhydroxyalkanoat (PHA) trong các lĩnh vực khác nhau [26]

1.2. Các nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp PHA dạng copolymer

Việc tổng hợp PHA rất quan trọng trong quá trình phân hủy sinh học vì các con đường trao đổi chất có liên quan đến quá trình đồng hóa sinh học. PHA thương mại thường tổng hợp từ các chủng *Escherichia coli* tái tổ hợp nhưng các loại PHA đa dạng về đặc tính hóa lý lại thường được thu nhận được từ các chủng vi sinh vật trong tự nhiên như các chủng thuộc loài *Ralstonia eutropha* [28] hay còn gọi là *A. eutrophus*, *Wautersia eutropha* hoặc *Cupriavidus necator*. *Azotobacter* sp., *Bacillus*

sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Clostridium* sp., *Syntrophomonas* sp., *Halomonas* sp., *Haloferax* sp., *Aeromonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Thermus thermophilus*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Saccharophagus degradans*, *Comamonas* sp. *A. latus* hay còn gọi là *Azohydromonas lata*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zobellella denitrificans*, bùn hoạt tính, *Cyanobacteria*, *Chromobacterium* sp., *Erwinia* sp.,[25]. Chi *Pseudomonas* được công bố là những loài có khả năng sinh tổng hợp PHA chuỗi dài [29].

Gần đây, nhóm nghiên cứu của Sedlacek và cộng sự đã công bố có thể kiểm soát định hướng quá trình tổng hợp PHA có các thành phần monomer khác nhau ở chủng vi khuẩn ưa nhiệt mới *Aneurinibacillus* sp. H1. Đặc biệt chủng này có thể tổng hợp copolymer của 3-hydroxybutyrate (3HB), 4-hydroxybutyrate (4HB) và 3-hydroxyvalerate (3HV) với các phân đoạn 4HB và 3HV cao đáng kể [30].

Chủng *Alcaligenes eutropha* có khả năng sinh tổng hợp các loại copolymer của PHB và PHV có số mol% khác nhau khi lên men trên các nguồn cơ chất khác nhau, đặc biệt tỷ lệ monomer 3HV có thể lên đến 71 mol% [31,32]. Sản phẩm Nodax™ thương mại được sản xuất bởi Meridian (Bainbridge, GA, USA) là copolymer của axit béo 3HB và 3-hydroxyhexanoate (3HHx) với tỷ lệ khác nhau [33]. Các chủng tái tổ hợp của *P. putida* GPP104 mang gen *PHA synthase* của *Aeromonas hydrophila* chỉ có thể gia tăng thêm 14 mol% 3HHx vào copolymer [34]. Sự kết hợp của các monomer 3HHx và 3-hydroxyocatanoate (3HO) với monomer 3HB tạo ra những thay đổi đáng kể về tính chất nhiệt và vật lý của các copolymer này. *Pseudomonas putida* LS46 tổng hợp PHA chuỗi trung bình bao gồm các monomer 3HHx, 3HO, 3HD và/ hoặc 3-hydroxydodecanoate (3HDD) theo các tỷ lệ khác nhau [33]. Bộ gen của *P. putida* LS46 đã được xác định trình tự. Các gen điều hòa và protein liên quan đến tổng hợp PHA được xác định bằng phương pháp transcriptomic và proteomic [35,36,37,38]. Enzyme PHA synthase type II (PhaC1 - mã hóa bởi gen *phaC1*) được biểu hiện trong *P. putida* không thể thêm các monomer 3HB vào các chuỗi polymer PHA trung bình.

Tính đặc hiệu của cơ chất trong quá trình tích lũy PHA quyết định thành phần monomer. Một số chủng vi khuẩn như *Aeromonas caviae* và *Pseudomonas stutzeri* có PHA synthase có khả năng đáp ứng với nhiều loại cơ chất. Chủng tái tổ hợp biểu hiện PHA synthase này ở *Ralstonia eutropha* tổng hợp copolymer dạng SCL- và MCL-PHA [39]. Tổ hợp đột biến trong *P. putida*, *P. oleovorans*, và *P. aeruginosa* được công bố tổng hợp PHA mang các monomer 3HB, 3HHx, 3HO, 3HD, hoặc 3HDD [40]. Hai chủng vi khuẩn phân lập từ tự nhiên *Pseudomonas* sp. 61-3 và *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 tích lũy copolymers giữa 3HB và HHx, HO, và HD

[41,42]. Trong khi đó enzyme PhaC1 của 2 chủng *Aeromonas hydrophila* và *Aeromonas caviae* có khả năng gắn thêm cả 2 loại monomer 3HB và 3HHx vào chuỗi PHA [43,44,45]. Việc tối ưu hóa codon của PHA synthase (phaC2ps) ở chủng *P. stutzeri* cũng giúp tăng cường sự kết hợp 3HB trong copolymer [46].

1.3. PHA từ nhóm vi sinh vật ưa mặn

Sự thích nghi của nhóm vi sinh vật ưa mặn trong điều kiện khắc nghiệt đã mang lại cho chúng những tiềm năng và lợi thế độc đáo để sản xuất PHA. Ưu điểm quan trọng nhất là nhóm vi sinh vật này yêu cầu độ mặn cao do đó sẽ giảm nguy cơ tạp nhiễm trong quá trình lên men so với các nhóm vi sinh vật khác [47]. Chi phí thu hồi PHA cũng thấp hơn nữa vì tế bào có thể dễ dàng bị ly giải ở trong các dung dịch đệm có pH trung tính do áp suất thẩm thấu nội bào cao [48]. Hơn nữa, so với các vi khuẩn không ưa mặn, nhóm vi khuẩn ưa mặn thường có khả năng sinh tổng hợp PHA từ các nguyên liệu thô rẻ tiền khác nhau [49]. Từ những lý do trên cho thấy nhóm vi sinh vật ưa mặn được coi là một ứng cử viên đầy hứa hẹn cho việc sản xuất PHA. Công ty có tên Bluepha ở Trung Quốc đang sản xuất polyhydroxybutyrate (PHB) và poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) bằng cách sử dụng các loài thuộc chi *Halomonas*. Tuy nhiên, vẫn còn một số thách thức khi sử dụng các chủng vi sinh vật ưa mặn để sản xuất PHA ở quy mô lớn. Ví dụ, việc xử lý nước thải lên men mặn rất khó khăn [50], nồng độ muối cao của môi trường dẫn đến hiện tượng ăn mòn thiết bị lên men. Với sự phát triển của các ngành công nghệ môi trường và vật liệu, các chiến lược lên men nhóm vi sinh vật ưa mặn đã từng bước khắc phục những nhược điểm này. Nước thải nhiễm mặn có thể được xử lý bằng một số nhóm vi khuẩn biển [51] trong khi các thiết bị lên men chịu muối có thể được làm bằng nhựa, gốm sứ hoặc thép cacbon [52]. Đặc biệt, việc áp dụng các kỹ thuật di truyền vào sự phát triển của các chủng ưa mặn biến đổi gen có khả năng nâng cao hiệu quả của việc sản xuất PHA ở quy mô lớn.

Nghiên cứu về quá trình tổng hợp PHA bởi các vi sinh vật ưa mặn đang được tăng tốc. Trong số những loài ưa mặn, vi khuẩn cổ *Haloferax mediterranei* và các loài *Halomonas* spp. đã được nghiên cứu rộng rãi về đặc tính sinh tổng hợp PHA hiệu quả. Cho đến nay, *H. mediterranei* đã được báo cáo có thể tổng hợp PHBV và poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) (PHBV4HB) [53]; Các loài *Halomonas* có thể tích lũy PHB, PHBV và poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (P3HB4HB) [54,55,56]. Đến năm 2010, sự tích lũy PHA đã được báo cáo ở một số loài vi khuẩn cổ ưa mặn khác bao gồm *Halostagnicola* sp., *Haloterrigena* sp., *Halobiforma* sp., *Haloarcula* sp., *Halobacterium* sp., *Halococcus* sp., *Halorubrum* sp., *Natrinema* sp. và ở các chủng vừa ưa mặn vừa ưa kiềm bao gồm

Natronobacterium sp., *Natronococcus* sp. [9,10,11,12,13]. Đối với các loài vi khuẩn, hầu hết các nhà sản xuất PHA ưa mặn thuộc họ *Halomonadaceae*, một số ít thuộc họ *Bacillaceae*. Trong số gần 12 chi (tính đến tháng 5 năm 2017) của họ *Halomonadaceae*, chi *Halomonas* được biết là tích lũy PHA dạng chuỗi ngắn. Hầu hết các chủng *Halomonas* sp. có nhu cầu NaCl thấp hơn (3 – 15%) để tăng trưởng tối ưu so với nhóm vi khuẩn cổ ưa mặn nhưng ở nồng độ đủ để kiểm soát sự nhiễm khuẩn. *Halomonas boliviensis*, một vi khuẩn ưa kiềm và ưa kiềm vừa phải, có khả năng tổng hợp PHB hiệu quả ở hàm lượng trung bình 50% (khối lượng) bằng cách sử dụng glucose, sucrose, maltose, xylose cũng như cám lúa mì [23,24,28]. Tuy nhiên, không giống như *H. mediterranei*, hầu hết các chủng vi khuẩn ưa mặn cần tiền chất 3HV để sản xuất PHBV. *H. bluephagenesis* TD01 tạo ra PHBV khi axit propionic hoặc axit valeric được cung cấp thêm với glucose [31]. *Halomonas marina* tạo ra PHBV với 12,8 mol% 3HV trong môi trường glucose có bổ sung axit valeric [32]. Tương tự, *Halomonas profundus* tạo ra PHBV với các phần mol khác nhau của 3HV khi có mặt axit valeric và axit propionic [33]. Gần đây, một chủng ưa mặn sản xuất PHB có tên là *Vibrio proteolyticus* đã được phân lập từ biển Hàn Quốc và nó cũng được phát hiện để tạo ra PHBV chứa 15,8 mol% 3HV khi axit propionic được thêm vào làm đồng cơ chất của fructose [34]. Tuy nhiên, chủng *Halomonas campisalis* lại có thể tích lũy PHBV với 3,6 mol% 3HV từ maltose [35]. Năm 2015, *Yangia* sp. ND199, thuộc họ *Rhodobacteraceae*, được báo cáo là tích tụ PHBV với phạm vi 1-7 mol% 3HV từ nguồn carbon không liên quan bao gồm glucose, maltose, sucrose và glycerol [36]. Cho đến nay, các nghiên cứu về tổng hợp PHBV bằng nhóm vi khuẩn Gram dương còn khá hạn chế. Khác với các chi khác, chi *Bacillus* sp ưa mặn mới được ghi nhận về việc tổng hợp PHA dạng homopolymer dạng PHB [57]. Mặc dù vậy, các chi *Bacillus* là một trong những vi khuẩn Gram dương đầu tiên được ghi nhận có khả năng sản xuất PHA, mang nhiều lợi thế làm chủng sản xuất trong lên men tổng hợp PHA do có khả năng sử dụng đa dạng các nguồn cơ chất (bao gồm cả các phế phụ liệu nông lâm nghiệp, thủy sản,...). Cấu trúc copolymer phụ thuộc vào điều kiện lên men và nguồn carbon cơ chất. Khả năng tổng hợp copolyme từ cấu trúc các nguồn carbon không liên quan cho thấy các loài thuộc chi *Bacillus* có tiềm năng sản xuất PHA dạng copolyme mới. Chính vì vậy việc tìm kiếm các chủng thuộc chi *Bacillus* ưa mặn có khả năng tổng hợp copolymer là điều cần thiết.

1.4. Tình hình nghiên cứu trong nước về PHA

Các nghiên cứu về phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng tích lũy PHA, đặc biệt là nhóm vi sinh vật chịu mặn đã được nhóm nghiên cứu của PGS. TS. Đoàn Văn Thước thuộc Đại học Sư phạm 1 triển khai từ khoảng 10 năm trở lại

đây với rất nhiều các công bố trên các tạp chí trong nước và quốc tế. Nhóm nghiên cứu của PGS. Thược đã thu thập được tập hợp đa dạng các chủng vi khuẩn Gram dương (các chủng thuộc chi *Bacillus*), Gram âm (*Halomonas boliviensis*, *Yangia* sp. ND218, *Salinivibrio* sp M318, *Ralstonia* sp M91 ...) từ một số hệ sinh thái rừng ngập mặn tại các tỉnh Nam Định, Quảng Ninh, Cần Giờ hoặc từ các bể làm mắm, vựa muối tại các địa phương. Trong tập hợp đó, nhóm nghiên cứu cũng đã sàng lọc và tìm được các điều kiện nuôi cấy thích hợp để thu nhận được PHA dạng copolymer [P(3HB-co-3HV)] và [P(3HB-co-4HV)] cho một số các chủng vi khuẩn như *Yangia* sp 199, ND218, ND153, VK75, VK98 và VK129 [52,58]. Với mỗi chủng vi khuẩn, các tiền chất để tổng hợp PHA dạng copolymer là khác nhau. Khi sử dụng fructose là nguồn carbon duy nhất để nuôi cấy 100 chủng có hoạt tính tích lũy PHA thì chỉ có 2 chủng vi khuẩn ND199 và ND218 phân lập từ Nam Định sinh tổng hợp copolymer (PHBV) với hàm lượng lần lượt là 34% và 24% so với khối lượng khô tế bào. Tỷ lệ monomer 3HV/3HB chỉ chiếm có 2 – 3 mol%. Sau khi thay đổi nguồn carbon như kết hợp giữa glucose và muối propionate hay valerate trong quá trình lên men, nhóm nghiên cứu đã thu được 7 chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHBV với hàm lượng tích lũy PHA dao động từ 11 – 71% so với khối lượng khô tế bào. Tuy nhiên tỷ lệ monomer 3HV/3HB cũng khá thấp chỉ khoảng 5 – 15 mol%. Đặc biệt, chủng ND153 ban đầu chỉ tổng hợp homopolymer PHB nhưng sau khi bổ sung propionate đã tổng hợp thêm các monomer 3HV và tỷ lệ 3HV tăng tuyến tính (từ 1 – 30 mol%) khi nồng độ propionate trong môi trường nuôi cấy tăng từ 0,2 – 1 g/l [59]. Hai chủng ND199 và ND218 sau khi thay đổi cơ chất lên men đã nâng được tỷ lệ monomer 3HV lên 44 và 21 mol% nhưng hàm lượng tích lũy PHA tổng thì lại giảm xuống 11 – 12% so với khối lượng khô tế bào [60]. Một trong những chủng vi khuẩn được nhóm tập trung nghiên cứu sâu là *Yangia* sp ND199. Nhiều chiến lược lên men để thu nhận PHBV từ chủng này đã được ra đời. Khi nuôi cấy trong bình tam giác, chủng này chỉ tạo ra lượng sinh khối 6,37 g/l với hàm lượng P(3HB-co-3HV) tích lũy là 43,1%. Tuy nhiên khi nuôi chủng này trong nồi lên men, lượng sinh khối tăng lên 9,1 g/l nhưng hàm lượng P(3HB-co-3HV) tích lũy lại giảm còn 37%. Quy trình lên men gián đoạn 2 pha đã nâng cao hàm lượng sinh khối khô lên 55,8 g/l với hiệu suất tích lũy PHBV đạt 67% sau 51 giờ lên men. Tuy nhiên tỷ lệ monomer 3HV chỉ đạt có 3,2 mol% [61]. Hơn nữa, trong quá trình lên men có bổ sung các tiền chất như 1,4-butanediol, γ -butyrolactone hay sodium 4-hydroxybutyrate thì sản phẩm PHA tích lũy được có thành phần chứa monomer 4HV với tỷ lệ 4 – 7.1 mol% [62].

Bên cạnh nhóm VSV ưa mặn, nhóm nghiên cứu của PGS. Thược cũng mở rộng quá trình tìm kiếm các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHA ở các hệ sinh thái

khác và cũng đạt được nhiều kết quả có tiềm năng ứng dụng. Chủng *Ralstonia* sp. M91, *Salinivibrio* sp. M318 có khả năng chuyển hóa dầu cá từ phế phụ phẩm ngành chế biến thủy sản thành PHA. Trong khi chủng *Ralstonia* sp. M91 chỉ tích lũy loại homopolymer (PHB) với hiệu suất tích lũy 2,43 g/l khi nuôi cấy trong bình tam giác và tăng lên 2,73 g/l khi nuôi cấy trong hệ thống lên men 10L có chứa môi trường mang 15 g/l dầu cá [61] thì chủng *Salinivibrio* sp. M318 lại có khả năng tích lũy PHA dạng copolymer [P(3HB-co-3HV)] hoặc [P(3HB-co-4HB)] khi bổ sung thêm các tiền chất của PHA vào môi trường lên men. Tỷ lệ của monomer 3HV dao động từ 13,3 – 24,7 mol% và 4HB từ 5,2 – 5,9 mol% [62]. Kết quả phân lập từ nước thải của làng nghề sản xuất bún Mạch Tràng đã tìm thấy chủng vi khuẩn MT33 có khả năng sinh tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV). Hàm lượng sinh khối khô (5,08 g/l) và hàm lượng PHBV cao nhất (67 %) đạt được sau 36 giờ nuôi cấy trong điều kiện tối ưu với phân đoạn 3HV đạt 3 mol% [60]. Các chủng thuộc chi *Bacillus* như *Bacillus megaterium* D8, *B. cereus*, *B. paranthracis* cũng đã được phân lập và sàng lọc khả năng tích lũy PHB khi sử dụng tinh bột sắn, dịch thủy phân rom rạ với hiệu suất tích lũy từ 46,4 – 66,2% [47-48].

Các nhóm nghiên cứu phía Nam cũng đã công bố một số kết quả phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHA nhưng chủ yếu ở dạng PHB. Năm 2015 nhóm nghiên cứu của tác giả Huỳnh Văn Hiếu và cộng sự tại Trường Đại học Nguyễn Tất Thành phân lập và sàng lọc một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHB bằng thuốc nhuộm Sudan black B từ các mẫu đất, nước, bùn cống rãnh ở khu vực TP Hồ Chí Minh. Sáu chủng sàng lọc được phân làm 2 chi là *Enterobacter* và *Bacillus* [49]. Nhóm nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thành Luân và cộng sự đã thu mẫu nốt sần cây họ đậu như rễ cây đậu phộng, đậu bắp, cây cỏ đậu tại Bình Dương. Kết quả đã tìm thấy 5 chủng vi khuẩn có khả năng tạo ra nhựa sinh học và phân loại chủng có khả năng sản xuất nhựa cao nhất (đạt 39,84%) sau 48 giờ nuôi cấy thuộc loài *Rhizobium gallicum* [50].

Trong dự án đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu tạo màng polymer sinh học từ chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp và bước đầu thử nghiệm làm giá đỡ nuôi cấy mô trong Y học”, Khoa Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Nguyễn Tất Thành đã bước đầu phân lập được một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHB thuộc chi *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Leclercia*. Đồng thời tính tương thích sinh học của PHB ở vi mô *in vitro* trên các dòng tế bào như nguyên bào sợi, tế bào biểu mô, tế bào cơ trơn, tế bào gốc trung mô, tế bào xương, tế bào tủy xương, tế bào sụn,... cũng đã được nhóm khảo sát. Viện kỹ thuật Y Khoa (Bộ Y tế, Liên bang Nga) (số 388-99, 24.12.1999) đã cấp chứng nhận độc tính cho các

sản phẩm từ PHB, chứng nhận này cho phép PHB được ứng dụng vào y tế như vật liệu tương thích sinh học, không độc hại và thích hợp cho cấy ghép mô ở người. Kết quả này mang đến tiềm năng ứng dụng điều trị phỏng, vết thương lâu lành trên người bằng băng dán sinh học từ màng sinh học PHB (<https://cnsh.ntt.edu.vn/nghien-cuu-khoa-hoc/61-nghien-cuu-khoa-hoc/410-polymer-sinh-hoc-phb-poly-hydroxybutyrate-tong-hop-tu-vi-sinh-vat>).

Tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, những nghiên cứu đầu tiên về việc sàng lọc, lựa chọn chủng sản xuất PHB đã được tiến hành từ những năm 2008 – 2009. Nhóm nghiên cứu của PGS. TS Trần Đình Mẫn, TS. Phạm Thanh Hà đã lựa chọn được chủng vi khuẩn *Alcaligenes latus* VN1 phân lập từ đất nhiễm dầu có khả năng tích lũy PHB khoảng 40% so với khối lượng khô của tế bào. Chủng này sau đó được gây đột biến bằng cách chiếu tia UV, thu được thể đột biến *A. latus* VN1-20 có hoạt tính tích lũy PHB lên 55,6% [51]. Thể đột biến *A. latus* VN1-20 đã được thử nghiệm lên men trên nguồn carbon tinh bột sắn (40 g/l) bằng qui trình nuôi cấy hai giai đoạn trên môi trường dinh dưỡng và môi trường khoáng bị giới hạn nitơ. Sinh khối khô sau quá trình lên men đạt ~ 15 g/l với năng suất tích lũy PHB đồng hình đạt ~ 75%. Sau tinh sạch thu được sản phẩm PHB có khối lượng phân tử cao, mang những tính chất ưu việt của vật liệu polymer tiềm năng cho ứng dụng, hoà hợp tốt với chitosan tạo sản phẩm blend đã cải thiện được nhiệt độ nóng chảy của PHB, có khả năng phân huỷ sinh học hoàn toàn trong thời gian ngắn [63]. Năm 2018 nhóm nghiên cứu của GS.TS Đặng Diễm Hồng đã phân lập được ba chủng vi khuẩn Gram âm ở rừng ngập mặn Giao Thủy, Nam Định, trong đó có một chủng thuộc chi *Halomonas* có khả năng tích lũy PHB lên đến 50,23% so với sinh khối khô sau 60 giờ nuôi cấy [64].

Gần đây, nhóm nghiên cứu của TS. Lã Thị Huyền của Viện Công nghệ sinh học cũng có công bố trên Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm kết quả sàng lọc 6 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng sản xuất của nhựa polymer phân huỷ sinh học, trong đó chủng *Bacillus* sp. DV01 tích lũy cao nhất, đạt 23,9% so với sinh khối khô [65]. Viện Công nghệ sinh học vừa hoàn thành nhiệm vụ chủ trì đề tài “Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học tái tổ hợp sinh tổng hợp bioplastic từ phụ phẩm chế biến thủy sản”, mã số ĐT.08.19/CNSHCB thuộc Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020 của Bộ Công thương. Kết quả đề tài đã tạo được 3 chủng tái tổ hợp *B. megaterium* pPSPHAR1/1, pPSPHAC5/1 và gRNAPHAZ/1 có khả năng tích lũy PHA lần lượt là > 70%, >50% và > 50%. Tuy nhiên cả 3 chủng tái tổ hợp chỉ tích lũy homopolymer PHB. Sản phẩm PHB blend tốt với chitosan, có khả năng phân huỷ hoàn toàn sau 2 tháng chôn lấp

ngoài môi trường và cũng đã đánh giá tính an toàn đối với dòng tế bào nguyên bào sợi [53].

Như đã trình bày ở trên phần lớn các chủng vi khuẩn phân lập được chỉ tổng hợp duy nhất một loại P3HB, chỉ một số ít các chủng tổng hợp copolymer, thuộc các chi như *Methilobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillaceae*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Halomonas* và *Rhodococcus*. Ngoài ra các loài cổ khuẩn như *Haloferax mediteranei*, xạ khuẩn *Streptomyces* hay các vi khuẩn tía quang hợp cũng được ghi nhận có khả năng tổng hợp PHAs. Hiệu suất tổng hợp copolymer của các chủng không chỉ phụ thuộc vào đặc điểm sinh học của chủng mà còn phụ thuộc khá nhiều vào điều kiện nuôi cấy và lên men. Việt Nam là một trong những đất nước có tính đa dạng sinh học cao nhất trên Thế giới, do đó chúng ta có thể chủ động tìm kiếm và khai thác các chủng vi sinh vật từ các hệ sinh thái khác nhau có khả năng tổng hợp nhựa sinh học nhằm chủ động sản xuất các loại vật liệu ứng dụng trong các ngành công nghiệp. Chính từ những cơ sở đã phân tích ở trên, chúng tôi đặt vấn đề **“Tuyển chọn các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa sinh học Polyhydroxyalkanoate (PHA) dạng copolymer phân lập ở Việt Nam”**.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu nước biển (3 mẫu), mẫu trầm tích (5 mẫu) của vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa được đánh số từ 1-8 (Bảng 2.1, Hình 2.1)

Bảng 2.1: Đặc điểm mẫu nước và trầm tích biển vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa

STT	Ký hiệu	Vị trí lấy mẫu	Đặc điểm mẫu	Điều kiện thu mẫu (độ sâu, nhiệt độ, độ mặn, pH)
1	1	Bờ biển	Màu nâu, dạng cát	20 cm, 30°C, 30‰, 7,4
2	2	Đáy biển	Màu trắng, cát	8 m, 30°C, 37‰, 7,9
3	3	Đáy biển	Màu trắng, cát	12 m, 30°C, 37‰, 7,8
4	4	Đáy biển	Màu trắng, cát	20 m, 30°C, 37‰, 7,8
5	5	Vùng rễ cây đậu biển và muống biển	Màu nâu đen, đất cát san hô	Cách bề mặt 5-10cm, 30°C, 21‰, 7,5
6	6	Ngoài bờ kè	Màu trắng, cát san hồ	Độ sâu 0,5m, 30°C, 27‰, 7,8
7	7	Ngoài bờ kè	Màu nâu, đất cát san hô	Độ sâu 5 – 10 cm, 30°C, 25‰, 7,9
8	8	Vùng rễ cây lạc tiên ngoài bờ kè	Màu nâu, đất cát san hô	Độ sâu 5 – 10 cm, 30°C, 23‰, 7,7



Hình 2.1: Hình ảnh mẫu nước và mẫu trầm tích được lấy ở vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa.

Thời gian nghiên cứu: Các nghiên cứu được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm, trong thời gian từ 01/2022 – 09/2022.

2.2. Dụng cụ, thiết bị máy móc, hóa chất

2.2.1. Dụng cụ

Đĩa petri ϕ 9, ống nghiệm, micropipette (1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l), ống falcon (50ml), đầu côn (1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l), ống eppendorf (1,5 ml; 2,2 ml), bình Schott (250 ml, 500 ml), que cấy, đèn cồn, ống đông, giấy đo pH, đĩa thủy tinh...

2.2.2. Thiết bị máy móc

- Các thiết bị khử trùng, vô trùng: Tủ sấy (DHG-9140 B, Trung Quốc), nồi hấp thanh trùng (Hirayama, Nhật Bản), lò vi sóng (Sharp, Trung Quốc)
- Các thiết bị nuôi cấy và giữ giống: Tủ ấm, máy lắc ổn nhiệt (Wise Cube, Hàn Quốc), tủ lạnh 5°C (Sharp, Trung Quốc), tủ lạnh -20°C (Frigor, Đan Mạch)
- Các thiết bị ly tâm: Máy ly tâm Eppendorf (Hermle, CHLB Đức), máy ly tâm Universal 320 (Hettich, CHLB Đức).
- Thiết bị khuếch đại gene (ABI – Singapore), máy điện di, máy giải trình tự gen ABI 3130 (ABI – Mỹ)

- Máy đo quang phổ (LaboMed, Mỹ), Hệ thống sắc ký lỏng cao áp HPLC (Agilent 1290 infinity II, CHLB Đức)

- Các thiết bị khác: Máy vortex (Dlab, Trung Quốc), máy khuấy từ (Dlab, Trung Quốc), cân điện tử (G&G, Nhật Bản), tủ cấy sinh học (Sanyo, Nhật Bản), kính hiển vi huỳnh quang (Nikon C1, Nhật Bản), kính hiển vi điện tử (Olympus CH2, Nhật Bản).

2.2.3. Hóa chất

- Kit GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Fisher, CH Litva)
- Agarose (Sigma-Aldrich, CHLB Đức)
- Axít crotonic (Sigma-Aldrich, CHLB Đức)
- Nile blue A (Sigma-Aldrich, CHLB Đức)
- PHBV chứa 12% 3HV (Sigma-Aldrich, CHLB Đức)
- Các hóa chất khác sử dụng trong pha chế môi trường nuôi cấy và phân tích đều đạt tiêu chuẩn tinh khiết ở điều kiện phòng thí nghiệm.

2.2.4. Môi trường nuôi cấy

- Môi trường Salinity LB [g/l]: bacto tryptone 5, cao nấm men 10, NaCl 30, pH 7,2.
- Môi trường Salinity LB agar: có thành phần tương tự môi trường Salinity LB và bổ sung 20 g/l agar.
- Môi trường Salinity HT [g/l]: glycerol 30, bacto tryptone 5, cao nấm men 1, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005, MnSO_4 0,005, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02, NaCl 30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2, K_2HPO_4 1.6, pH 7.
- Môi trường Salinity HT agar: có thành phần tương tự môi trường Salinity HT và bổ sung 20 g/l agar
- Môi trường khoáng cơ bản [g/l]: $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,36, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, NaCl 30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, cao nấm men 1, nguồn cơ chất 1.

Các môi trường trên đều được khử trùng ở 121 °C trong 20 phút trước khi sử dụng.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn từ các mẫu nước và trầm tích biển

Phân lập vi khuẩn trực tiếp trên môi trường dinh dưỡng đặc hiệu cho vi khuẩn ưa mặn LB agar (có nồng độ muối cuối cùng là 3%). Các mẫu được đồng nhất, sau đó hút 1 ml dịch đồng nhất để chuyển vào ống nghiệm có chứa 9 ml dung dịch nước muối sinh lý (0,89% NaCl) và đánh dấu độ pha loãng 10^{-1} . Tiếp tục pha loãng mẫu đến 10^{-4} . Sau đó từ 3 ống nghiệm có độ pha loãng cuối cùng hút 500 μ l dịch và cấy đều lên các đĩa petri chứa môi trường Salinity LB agar. Mỗi nồng độ pha loãng được cấy vào 3 đĩa petri. Ủ nuôi các đĩa ở nhiệt độ 37 °C, trong vòng 24 đến 72 giờ. Theo dõi và chọn lọc các khuẩn lạc riêng rẽ mọc trên đĩa tại thời điểm sau 24h, 48h, 72h nuôi. Cấy tách chuyển nhiều lần trên đĩa Salinity LB agar để làm thuần. Những khuẩn lạc vi khuẩn tinh sạch được cấy chuyển sang ống nghiệm thạch nghiêng chứa môi trường Salinity LB và giữ ở tủ lạnh 5 °C cho bước sàng lọc khả năng tích lũy nhựa.

Xác định số lượng vi khuẩn

Số lượng vi khuẩn có trong 1 g hoặc 1 ml mẫu phân lập (N) được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1.n_2)d}$$

Trong đó:

$\sum C$: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa đã chọn.

V : Thể tích dịch nuôi cấy trên mỗi đĩa tính bằng ml.

n_1 : Số đĩa của độ pha loãng thứ nhất được giữ lại.

n_2 : Số đĩa của độ pha loãng thứ hai được giữ lại.

d : Hệ số pha loãng tương ứng của độ pha loãng thứ nhất.

2.3.2. Đánh giá sơ bộ khả năng tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn biển

Phương pháp nhuộm tế bào với thuốc nhuộm Sudan black theo phương pháp của Hartman (1940) [66]. Các chủng vi khuẩn được cấy vạch trên đĩa petri chứa môi trường tối thiểu Salinity HT Agar ở 37 °C trong 48 - 72 giờ. Dung dịch Sudan black B (0.1 g Sudan black B trong 100 ml ethanol 96 %) được rót vào đĩa để nhuộm đường cấy vạch trong 1 phút, sau đó tiến hành rửa lại nhiều lần với dung dịch ethanol 96 % cho tới khi môi trường thạch không còn màu xanh đen của Sudan black B. Các chủng có đường cấy bắt màu với thuốc nhuộm Sudan black sau đó được đánh dấu để tiếp tục kiểm tra bằng phương pháp nhuộm với Nile blue A.

Phương pháp nhuộm tế bào với Nile blue A được thực hiện theo phương pháp của Spiekermann và cộng sự (1999) [67]: Sử dụng lam kính sạch và nhỏ một giọt nước vô trùng, sau đó lấy 1 chấm vòng que cấy sinh khối chủng vi khuẩn đã nuôi trong môi trường Salinity HT sau 48 giờ, hòa tan và dàn đều. Làm khô nhanh trên ngọn lửa đèn cồn trước khi nhỏ 20 μ l Nile blue A (0,25 mg/ml), dàn đều và ủ ở 55 °C trong 10 phút. Sau đó mẫu được cố định với axit axetic 8 % trong 1 phút và rửa lại bằng nước cất. Mẫu được làm khô tự nhiên và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Nikon C1 ở bước sóng 460 nm. Tế bào tích lũy PHA sẽ có màu cam sáng khi bắt màu với Nile blue A.

2.3.3. *Lên men sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển*

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được cấy nhân giống từ ống thạch nghiêng sang môi trường Salinity LB ở 37 °C trong 24 giờ, sau đó chuyển giống với tỷ lệ 5% (v/v) vào các bình tam giác 1 lít chứa 250 ml môi trường Salinity HT vô trùng. Quá trình lên men các chủng được thực hiện ở 37 °C, 200 rpm trong 48 giờ. Kết thúc lên men, dịch lên men được ly tâm ở điều kiện 6000 rpm trong 30 phút. Dịch lên men được loại bỏ còn sinh khối tế bào được rửa lại bằng dung dịch muối sinh lý (NaCl 0,89%) trước khi sấy khô hoặc phá để thu nhựa. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 6 lần với 3 mẫu được sử dụng để xác định khối lượng khô tế bào và 3 mẫu được sử dụng để xác định hàm lượng PHA tích lũy nội bào.

2.3.4. *Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển*

2.3.4.1. *Ảnh hưởng của pH lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển*

Giống của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được chuẩn bị trên môi trường Salinity LB và được chuyển sang bình tam giác chứa 250 ml môi trường Salinity HT với tỷ lệ giống 5%. Các bình chứa môi trường Salinity HT đã được điều chỉnh pH ban đầu về giá trị 4 – 9. Quá trình lên men diễn ra ở 37 °C, 200 rpm trong 48 giờ. Kết thúc lên men, xác định khối lượng sinh khối khô và hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào để tìm giá trị pH tối ưu cho từng chủng.

2.3.4.2. *Ảnh hưởng của nhiệt độ lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển*

Dịch nhân giống của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được cấy chuyển sang bình tam giác chứa 250 ml môi trường Salinity HT với tỷ lệ 5%. Quá trình lên men được tiến hành ở giá trị pH tối ưu của mỗi chủng, 200 rpm trong 48 giờ, với các lô

thí nghiệm ở 25, 30, 37 và 45 °C. Đánh giá khối lượng sinh khối khô và hàm lượng PHA tích lũy sau khi kết thúc lên men.

2.3.4.3. *Ảnh hưởng của tỷ lệ giống lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển*

Các chủng được nhân giống và được cấy chuyển sang bình tam giác chứa 250 ml môi trường Salinity HT có pH tối ưu với mỗi chủng. Tỷ lệ tiếp giống được thay đổi 2,5%, 5% và 7,5%. Quá trình lên men được thực hiện ở 37 °C, 200 rpm trong 48 giờ. Đánh giá khối lượng sinh khối khô và hàm lượng PHA tích lũy sau khi kết thúc lên men.

2.3.4.4. *Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển*

Quá trình lên men sinh tổng hợp PHA của các chủng được thực hiện trên bình tam giác 1 lít chứa 250 ml môi trường ở Salinity HT có pH tối ưu với mỗi chủng ở điều kiện 37 °C, tỷ lệ giống 5% trong 48 giờ. Các bình tam giác được đặt trong máy lắc ổn nhiệt điều chỉnh tốc độ lắc 100, 150, 200 và 250 rpm. Kết thúc quá trình lên men cân khối lượng sinh khối khô và xác định hàm lượng PHA tích lũy.

2.3.4.5. *Ảnh hưởng của nồng độ glycerol lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển*

Khối lượng sinh khối khô và hàm lượng PHA tích lũy của các chủng vi khuẩn biển được đánh giá sau khi lên men trên bình tam giác 1 lít chứa 250 ml môi trường ở Salinity HT có pH tối ưu với mỗi chủng ở điều kiện 37 °C, 200 rpm, tỷ lệ giống 5% trong 48 giờ. Nồng độ glycerol trong thành phần môi trường Salinity HT được thay đổi trong các lô thí nghiệm từ 10, 20, 30 và 40 g/l.

2.3.5. *Xác định khối lượng tế bào khô (CDW)*

Các ống fancel dung tích 50 ml được sấy khô đến khối lượng không đổi sau đó cân để xác định khối lượng ban đầu (M_0) của từng ống. Cặn tế bào thu được từ dịch lên men sau khi rửa loại bỏ muối sẽ được sấy ở 60 °C cho đến khi khối lượng không đổi và cân xác định khối lượng (M). Khối lượng tế bào khô được tính theo công thức: $CDW (mg/ml) = (M - M_0)/250$.

2.3.6. *Tách chiết PHA*

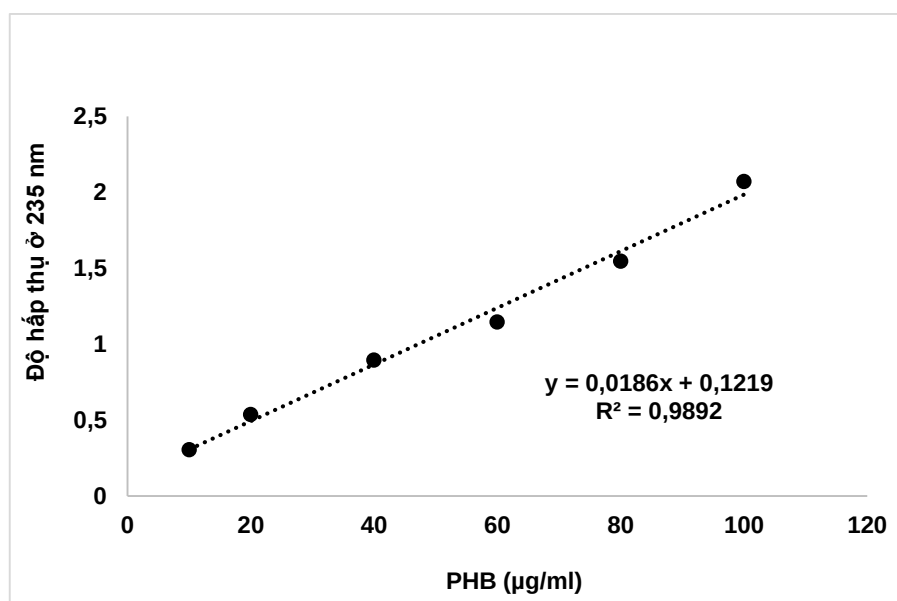
Quá trình tách chiết PHA được thực hiện theo mô tả của Mascarenhas và Aruna (2021) [68]. Cụ thể như sau: Sinh khối tươi tế bào được rửa 2 lần với dung dịch muối sinh lý (NaCl 0,89 %) để loại muối. Hòa lại tế bào trong nước cất với thể tích thích hợp và tiến hành gia nhiệt bằng lò vi sóng công suất 140 W trong 15 phút.

Quá trình gia nhiệt được dừng sau mỗi 10 giây cho đến khi hết thời gian xử lý. Bổ sung dung dịch ethanol/acetone 1:1 (v/v) và ủ trong 2 giờ trước khi chiết bằng chloroform. Lắc mạnh trong 5 - 6 giờ để nhựa sinh học hòa tan hoàn toàn. Thu pha chứa chloroform sang ống thủy tinh mới và bổ sung methanol lạnh (thể tích gấp 5 - 8 lần so với dịch chloroform). Giữ mẫu ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 30 phút. Ly tâm thu cặn PHA ở 12.000 rpm trong 20 phút. Bổ sung 2 lần dung dịch ethanol 70% để loại dung môi, ly tâm thu cặn rồi sấy khô ở $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong tủ hút.

2.3.7. Định lượng PHA

Hàm lượng PHA được xác định bằng phương pháp axit crotonic của Law và Slepecky (1961) [69]. Nguyên lý của phương pháp dựa vào sự chuyển hoá của PHB thành axit crotonic và hợp chất này có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 235 nm. PHB chuẩn (Sigma Aldrich) được sử dụng làm chất chuẩn trong phản ứng chuyển hoá thành axit crotonic với hàm lượng dao động từ 10 - 100 ($\mu\text{g/ml}$). Từ kết quả độ hấp thụ tuyến tính với độ hấp thụ ở bước sóng 235 nm của các mẫu có nồng độ PHB khác nhau đã xây dựng được đường chuẩn PHB (Hình 2.2).

Các mẫu sinh khối tế bào của các chủng tuyển chọn được bổ sung chloroform để hòa tan PHA trong tế bào. Lượng nhỏ của dịch chiết (0,05 - 0,1 ml) được chuyển vào ống nghiệm khô để bay hơi dung môi. Bổ sung 10 ml dung dịch H_2SO_4 và gia nhiệt hỗn hợp ở $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 10 phút để chuyển hoá hoàn toàn PHA thành axit crotonic, hỗn hợp sau đó được để nguội ở nhiệt độ phòng. Pha loãng dịch thủy phân bằng dung dịch 98% H_2SO_4 rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 235 nm.



Hình 2.2: Đường chuẩn PHB được xác định theo phương pháp axit crotonic [69]

Hiệu suất tích lũy PHA được tính theo công thức $H = m_1/m_2 \times 100\%$, trong đó m_1 là khối lượng PHA tích lũy và m_2 là khối lượng khô tế bào.

2.3.8. Xác định thành phần PHA

Kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp (HPLC) được sử dụng để xác định thành phần của PHA do các chủng vi khuẩn biển tuyển chọn tích lũy theo mô tả của Duvigneau và cộng sự (2021) [70]. Khoảng 10 ml dịch chứa PHA thu được từ 250 ml dịch lên men được phân hủy trong 10 ml axit sulfuric đậm đặc ở 100 °C trong 30 phút trong nồi cách thủy. Sau đó, làm lạnh các ống nghiệm trên nước đá trong 5 phút và được pha loãng bằng 40 ml thể tích H_2SO_4 0,014 N, trộn nhanh và lọc bằng màng lọc cellulose acetate với kích thước lỗ màng 0,45 μm . 10 μl dịch lọc được bơm lên cột reverse phase Inertsil 100A ODS-3 (kích thước hạt 5 μm , 250 $\times$ 4,6 mm) và được đẩy ra khỏi cột bằng hỗn hợp dung môi H_2SO_4 0,025% : acetonitrile với tỷ lệ 92:8, tốc độ 1 ml/phút ở 60 °C. Chất chuẩn được sử dụng bao gồm axit crotonic và PHBV có tỷ lệ 12% 3HV (Sigma-Aldrich, Đức).

2.3.9. Xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi ở 37 °C trên đĩa môi trường Salinity LB Agar. Sau 24 giờ tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc.

Tế bào được làm tiêu bản và nhuộm Gram trước quan sát dưới kính hiển vi điện tử Olympus CH2 ở độ phóng đại 100X.

2.3.10. Xác định nhu cầu sử dụng oxy

Một vòng que cấy từ ống thạch nghiêng giữ giống các chủng vi khuẩn tuyển chọn được cấy vào ống nghiệm chứa 5 ml môi trường Salinity LB. Nuôi tĩnh ở 37 °C trong 48 giờ. Quan sát vị trí các đám tế bào (biofilm) mọc trong ống nghiệm. Nếu đám tế bào nổi trên bề mặt dịch môi trường là các chủng có nhu cầu oxy cao (ưa hiếu khí). Nếu đám tế bào lung chùng ống nghiệm thì các chủng có thể sinh trưởng ở điều kiện môi trường có oxy giới hạn (vi hiếu khí).

2.3.11. Hoạt tính catalase

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi ở 37 °C trên đĩa môi trường Salinity LB Agar. Sau 24 giờ tiến hành nhỏ dung dịch H_2O_2 3 % lên bề mặt đĩa thạch. Nếu có xuất hiện bọt khí trên khuẩn lạc của chủng là phản ứng dương tính, ngược lại nếu không có xuất hiện bọt khí là phản ứng âm tính.

2.3.12. *Hoạt tính thủy phân tinh bột, CMC và gelatin*

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được cấy điểm trên các đĩa môi trường khoáng cơ bản có bổ sung các cơ chất với nồng độ cuối cùng là 1 g/l để cảm ứng khả năng sinh tổng hợp các enzyme thủy phân tương ứng của tế bào. Các cơ chất được sử dụng là tinh bột tan, CMC và gelatin. Sau 48 giờ ủ ở 37 °C, các đĩa petri được nhỏ các dung dịch Lugol 1% cho nguồn cơ chất tinh bột tan, Congo red cho CMC và axit trichloacetic 5 % cho gelatin. Quan sát vòng halo trong xung quanh khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn. Nếu xuất hiện vòng halo là phản ứng dương tính, không có vòng halo là âm tính.

2.3.13. *Khả năng sử dụng các nguồn đường*

Một số nguồn đường đơn C5 và C6 được sử dụng để lên men các chủng vi khuẩn tuyển chọn, bao gồm glucose, fructose, saccharose, arabinose và xylose. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong ống nghiệm chứa 5 ml môi trường khoáng cơ bản có bổ sung một loại đường với nồng độ 1% (w/v). Toàn bộ các ống nghiệm được nuôi ở 37 °C, 200 rpm trong 48 giờ. Quan sát vị trí và mức độ phát triển của các chủng thông qua chỉ số mật độ quang OD₆₀₀. OD₆₀₀ < 0,1 là không phát triển (-), 0,1 < OD₆₀₀ < 0,3 là phát triển yếu (±), 0,3 < OD₆₀₀ < 0,4 là có phát triển (+), 0,4 < OD₆₀₀ < 0,6 là phát triển tốt (++), OD₆₀₀ > 0,6 là phát triển rất tốt (+++).

2.3.14. *Tách chiết DNA tổng số của các chủng vi khuẩn*

DNA tổng số của các chủng vi khuẩn biến được tách chiết bằng Kit GeneJET Genomic Purification (Thermo Fisher, Mỹ) với quy trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau khi tách chiết được chạy điện di trên gel agarose 0,8% với dòng điện 100 V để kiểm tra chất lượng. Ngoài ra nồng độ DNA được tính toán ở máy quang phổ NanoDrop dựa vào độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm theo công thức:

$$\text{Nồng độ DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \cdot f \cdot x\varepsilon$$

Trong đó:

A_{260} : chỉ số hấp thụ tại bước sóng 260 nm

f : độ pha loãng

$x\varepsilon$: chỉ số hấp thụ tại bước sóng 260 nm của sợi kép DNA = 50 $\mu\text{g/ml}$.

Độ tinh sạch của DNA được đánh giá thông qua tỷ lệ $A_{260}: A_{280}$. Tỷ lệ này $\geq 1,6$ là DNA có đủ chất lượng để tiếp tục các thí nghiệm sau.

2.3.15. Khuếch đại gene 16S rRNA của các chủng vi khuẩn

DNA tổng số của các chủng vi khuẩn được sử dụng làm khuôn để khuếch đại gen 16S rRNA bằng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') [71]. Thành phần phản ứng PCR với thể tích 50 μ l được chuẩn bị bao gồm: đệm Taq polymerase (10x): 5 μ l; dNTPs (10 mM): 2 μ l; Dream Taq polymerase (5000 U/ml): 0,3 μ l; mồi xuôi 27F (10 pmol): 1 μ l; mồi ngược 1429R (10 pmol): 1 μ l; DNA khuôn (20 ng): 2 μ l; nước: 38,7 μ l. Phản ứng được thực hiện với chu trình nhiệt như sau:

95 °C: 5 phút,	}	35 chu kỳ
95 °C: 1 phút		
55 °C: 45 giây		
72 °C: 90 giây		
72 °C: 10 phút		
4 °C: ∞		

Kết thúc phản ứng, sản phẩm được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8 % rồi được tinh sạch bằng Kit GenJET PCR Purification (Thermo Fisher, Mỹ).

2.3.16. Giải trình tự gene 16S rRNA của các chủng vi khuẩn

Trình tự các đoạn gene 16S rRNA được giải mã bằng máy giải trình tự gen tự động ABI PRISM 3100. Kết quả sẽ được xử lý bằng các phần mềm tin sinh Chromas. Trình tự nucleotide hoàn chỉnh được xác định bằng cách sử dụng công cụ BLAST NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh mức độ tương đồng của trình tự gen 16S được giải với trình tự của các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng gen trên National Center for Biotechnology Information (NCBI). Từ kết quả đó xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm MEGA X trong phương pháp maximum- likelihood.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn từ các mẫu nước và trầm tích biển

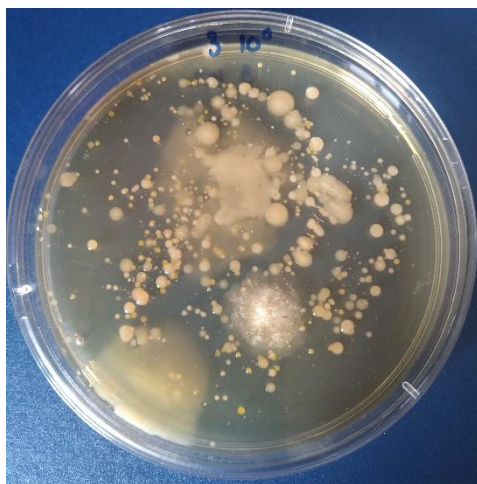
Từ 3 mẫu nước biển và 5 mẫu trầm tích của vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa, tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn biển như mô tả trong phần phương pháp phân lập. Sau 24 – 72 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37 °C, các mẫu phân lập xuất hiện nhiều loại khuẩn lạc có hình dạng và kích thước khác nhau (Hình 3.1). Các khuẩn lạc riêng rẽ được tách và làm sạch trước khi cấy sang các ống nghiệm thạch nghiêng chứa môi trường Salinity LB agar phục vụ các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả phân lập ở Bảng 3.1 cho thấy số lượng vi khuẩn trong các mẫu dao động trong khoảng từ $1,0 \times 10^1$ CFU/ml đến $6,7 \times 10^5$ CFU/ml và tổng số đã thu nhận được 44 chủng vi khuẩn riêng rẽ.



Mẫu 1



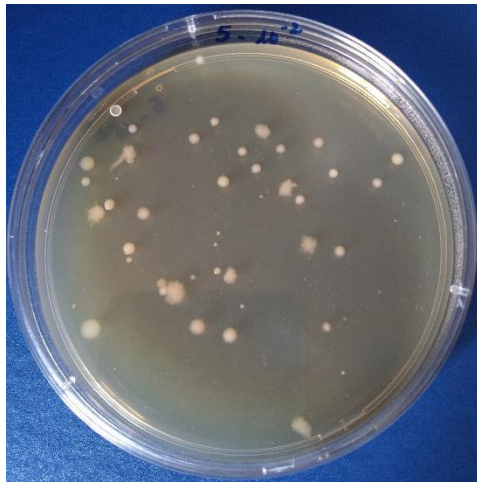
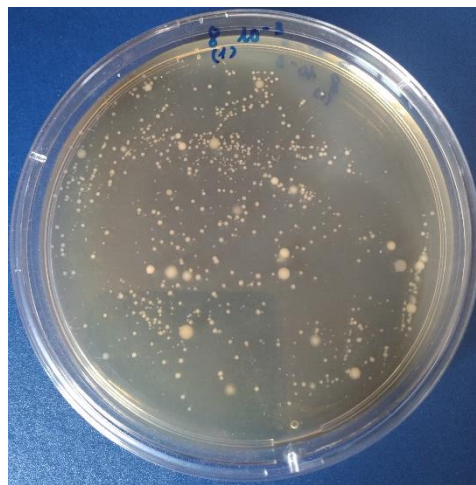
Mẫu 2



Mẫu 3



Mẫu 4

**Mẫu 5****Mẫu 6****Mẫu 7****Mẫu 8**

Hình 3.1: Hình ảnh phân lập các chủng vi khuẩn ưa mặn từ các mẫu nước và trầm tích vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa.

Theo các công bố trước đây về mật độ và số lượng các quần xã vi khuẩn của các hệ sinh thái nước mặn có thể thay đổi, phụ thuộc vào nhiệt độ, nồng độ muối, sự phong phú của các chất dinh dưỡng hữu cơ và các thông số hóa lý khác. Tuy nhiên mật độ trung bình của quần xã vi khuẩn biển dao động từ 10^3 đến 10^6 CFU/ml [72]. Kết quả từ Bảng 3.1 cho thấy mật độ vi khuẩn của các mẫu nghiên cứu cũng thay đổi từ 10^2 đến 10^5 , trừ mẫu số 2 là mẫu được lấy ở vùng đáy biển dạng cát vàng sang, có độ sâu 8 m chỉ có mật độ vi khuẩn thấp 10^1 CFU/ml. So với các mẫu nước mặt như mẫu số 1, 7 và 8 có mật độ vi khuẩn cao hơn (10^4 - 10^5) thì các mẫu đáy có mật độ vi khuẩn thấp hơn. Kết quả này phù hợp với lý thuyết về sự hiện diện của các vi sinh vật thường giảm khi tăng độ sâu của nước. Hơn nữa, sự phân bố theo chiều ngang và chiều dọc của các quần thể vi khuẩn trong trầm tích còn bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau, chẳng hạn như bản chất hóa lý của trầm tích, sự hiện diện nồng độ chất hữu cơ cao và các hiện tượng thủy văn như mặt phân cách của các khối nước [73,74].

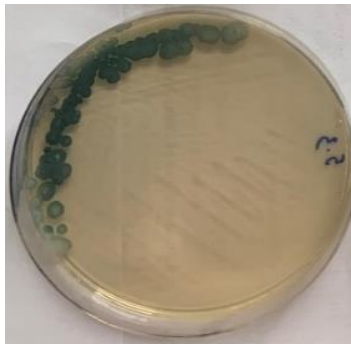
Bảng 3.1. Số lượng vi khuẩn phân lập từ các mẫu nước biển và trầm tích của vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa

Tên mẫu	Mật độ vi khuẩn [CFU/ml]	Số chủng phân lập	Kí hiệu chủng
Mẫu 1	$3,44 \times 10^5$	6	Từ 1.1 đến 1.6
Mẫu 2	$1,0 \times 10^1$	4	Từ 2.1 đến 2.4
Mẫu 3	$1,2 \times 10^3$	5	Từ 3.1 đến 3.5
Mẫu 4	$4,3 \times 10^2$	5	Từ 4.1 đến 4.5
Mẫu 5	$2,28 \times 10^3$	6	Từ 5.1 đến 5.6
Mẫu 6	$8,1 \times 10^3$	6	Từ 6.1 đến 6.6
Mẫu 7	$3,1 \times 10^4$	7	Từ 7.1 đến 7.7
Mẫu 8	$6,7 \times 10^5$	5	Từ 8.1 đến 8.5
Tổng số chủng phân lập		44	

3.2. Sàng lọc nhanh các chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHA

Để sàng lọc nhanh các chủng có khả năng tích lũy nhựa, phương pháp nhuộm khuẩn lạc và tế bào đã được sử dụng. Trong tập hợp 44 chủng vi khuẩn biển đã tuyển chọn có 6 chủng (ký hiệu gồm 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6) có bắt màu xanh đen với thuốc nhuộm Sudan black (Hình 3.2A). Các chủng này tiếp tục được nhuộm với Nile blue A để đánh giá mức độ bắt màu của các hạt PHA trong tế bào. Nile Blue A là loại thuốc nhuộm huỳnh quang được dùng để nhuộm các hạt PHA trong tế bào, cho phép chúng bắt màu cam sáng dưới kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng 460 nm. Cường độ bắt sáng của các hạt PHA tỷ lệ thuận với hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào [75]. Kết quả trên Hình 3.2B cho thấy cả 6 chủng đều bắt màu tốt và có màu cam sáng rõ ràng trên nền đen, điều này có nghĩa chúng đều có khả năng tích lũy PHA cao trong tế bào.

Sáu chủng tuyển chọn có khả năng sinh tổng hợp PHA được giữ giống trong glycerol 30% ở -80°C để tiếp tục sử dụng cho các thí nghiệm sau đó.



1.6



5.3



5.6



6.2

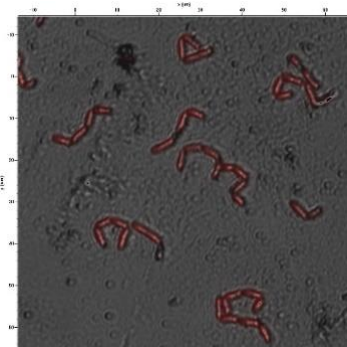


6.5

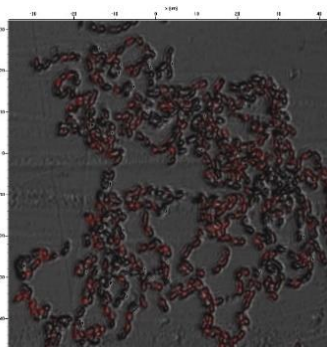


6.6

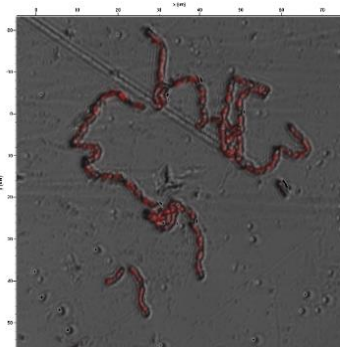
Hình 3.2A: Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn biển 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6 bắt màu với dung dịch Sudan black B (A)



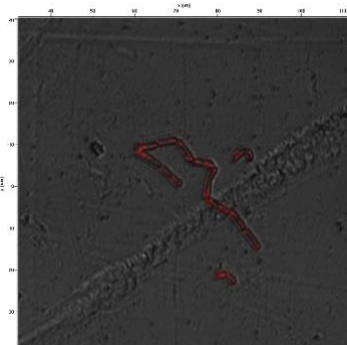
1.6



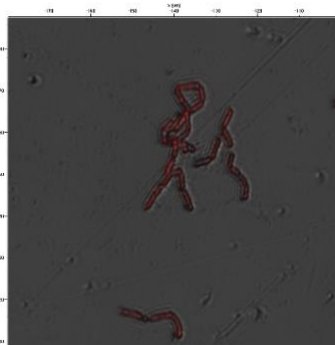
5.3



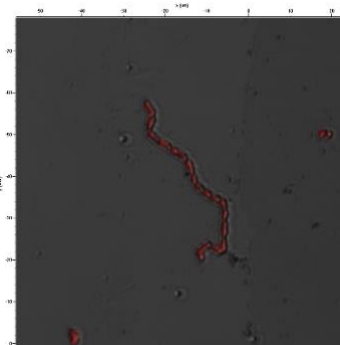
5.6



6.2



6.5



6.6

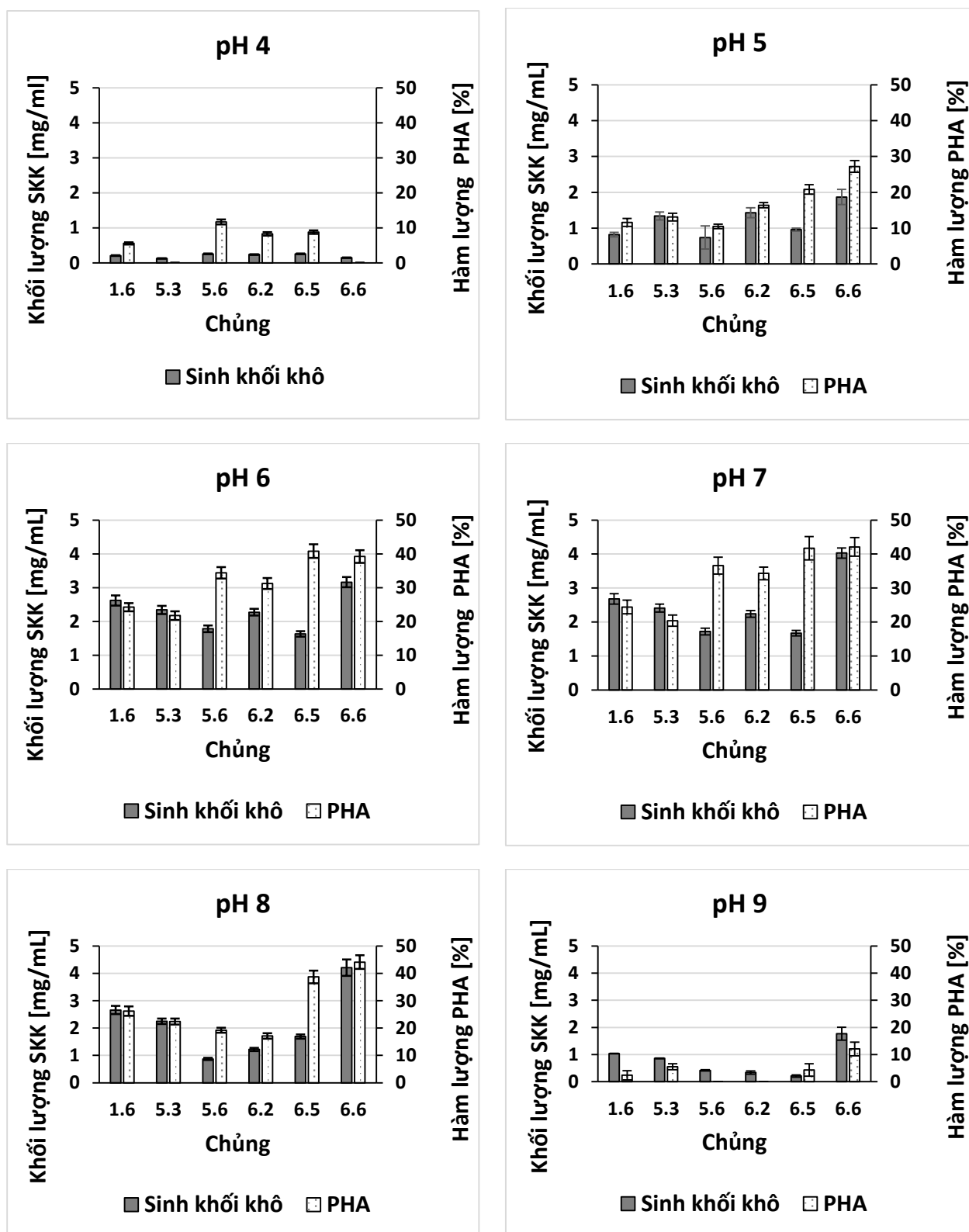
Hình 3.2B: Tế bào của các chủng vi khuẩn biển 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6 được nhuộm với dung dịch Nile Blue A và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang đồng tiêu Nikon C1 ở bước sóng 460 nm.

3.3. Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, tỷ lệ giống, độ thoáng khí và nồng độ cơ chất lên quá trình sinh trưởng và tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Vi sinh vật sinh trưởng tốt nhất ở điều kiện tối ưu. Quá trình sinh trưởng của vi sinh vật sẽ giảm, thậm chí sẽ ngừng ở các giới hạn cao hơn hoặc thấp hơn điều kiện tối ưu. PHA là sản phẩm dự trữ của vi sinh vật trong điều kiện dinh dưỡng bị cạn kiệt, tuy nhiên hiệu suất tích lũy PHA cũng giảm khi vi sinh vật không sinh trưởng hoặc sinh trưởng quá yếu, chính vì vậy mối tương quan giữa sinh trưởng và tích lũy PHA là hai hàm số quan trọng mà cần phải được quan tâm khi nghiên cứu về PHA từ vi sinh vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn hai yếu tố vật lý ảnh hưởng lớn nhất đến quá trình sinh trưởng và tích lũy PHA của 6 chủng vi khuẩn tuyển chọn là pH và nhiệt độ.

3.3.1. Ảnh hưởng của pH

Giá trị pH ban đầu là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng của vi sinh vật cũng như các hoạt động trao đổi chất và tổng hợp các chất chuyển hóa của chúng, ví dụ như PHA [76]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy các chủng vi khuẩn khác nhau có khả năng tích lũy PHA tối ưu từ pH 6 – 9. Trong nghiên cứu này, 3 giá trị pH ban đầu của môi trường lên men được điều chỉnh về 4, 5, 6, 7, 8 và 9 để đánh giá mức độ ảnh hưởng lên sự sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng tuyển chọn. Kết quả tại Hình 3.3 cho thấy cả 6 chủng đều sinh trưởng rất yếu ở pH 4, do đó hiệu suất tích lũy PHA ở giá trị pH axit này cũng rất thấp, từ 5,6 – 11,7 % so với sinh khối khô, thậm chí ở 2 chủng 5.3 và 6.6 còn không xác định được hàm lượng nhựa. Mặc dù chủng 5.6 vẫn tổng hợp được nhựa ở pH axit, tuy nhiên chủng này sinh trưởng yếu ở cả 3 giá trị pH: 4, 5 và 9, do đó hiệu suất tổng hợp PHA là không cao. Chủng 1.6, 5.3 và 6.5 đều sinh trưởng tốt ở pH 6 – 8 và hiệu suất tổng hợp PHA cũng đạt tối ưu ở hai giá trị pH này. Trong khi đó chủng 6.2 lại khá nhạy cảm với pH môi trường lên men. Ở giá trị pH 6 chủng sinh trưởng tốt với hàm lượng sinh khối khô đạt 2,27 mg/ml và tích lũy được 31,2 % PHA nội bào, tuy nhiên khi nâng giá trị pH lên 8, hàm lượng sinh khối khô giảm chỉ còn 1,22 mg/ml kéo theo hiệu suất tích lũy PHA cũng chỉ còn 17,1%. Đặc biệt nhất là chủng 6.6 phát triển tốt nhất ở pH 8 (4,21 mg/ml sinh khối khô) và hiệu suất tích lũy PHA cũng đạt cao nhất (44,1%) ở giá trị pH này. Khi nâng pH lên 9 thì hiệu suất sinh trưởng của cả 6 chủng đều giảm dù các chủng vẫn tích lũy nhựa .



Hình 3.3: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn

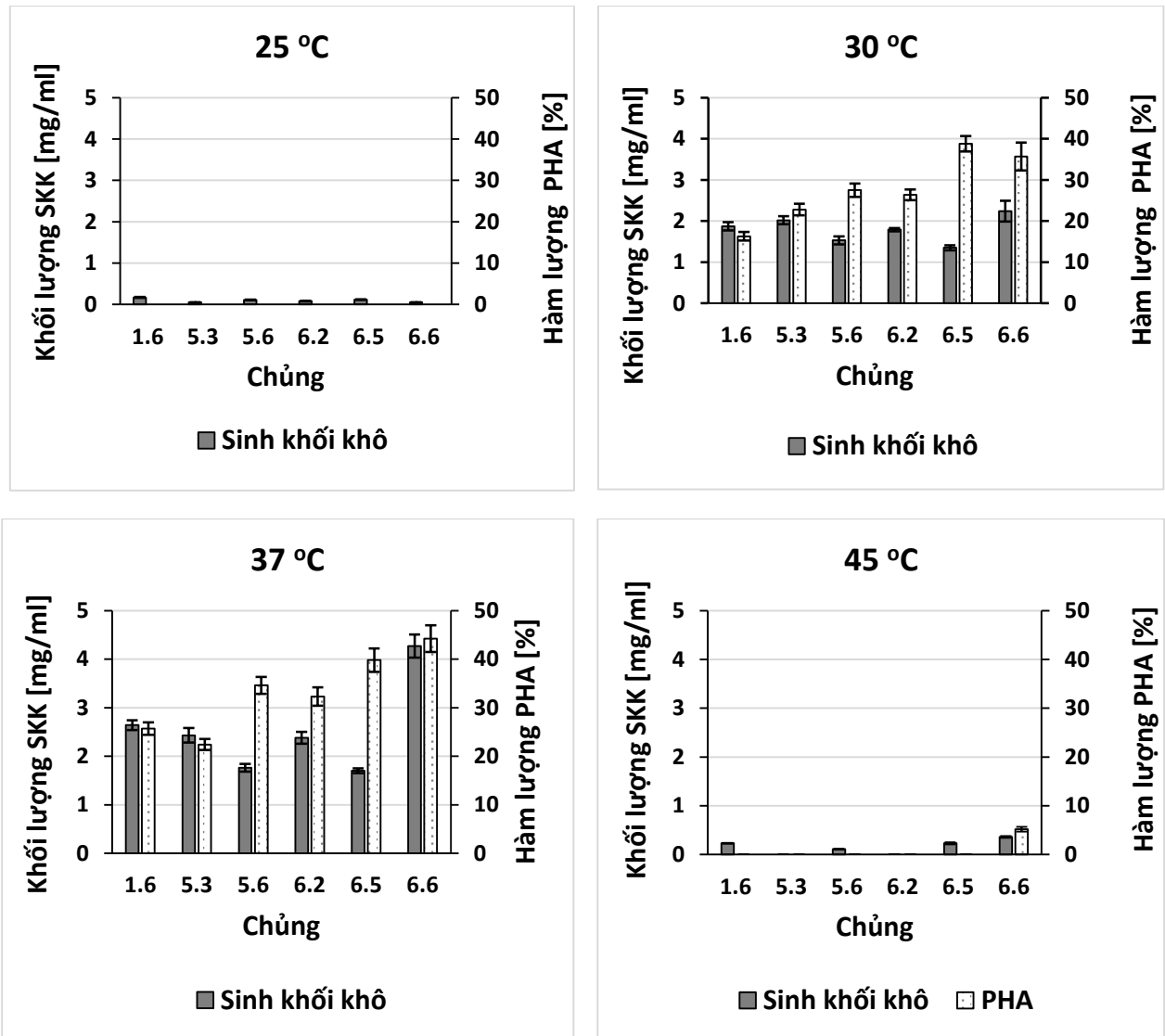
Nhiều công bố cho thấy pH tối ưu để sản xuất PHA thường là 8. Ở một số chủng vi khuẩn Gram dương thuộc chi *Bacillus* và *Streptomyces*, khi giá trị pH dưới 8 có khả năng làm giảm khả năng tích lũy PHA [77]. Shena và cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của pH

môi trường lên men lên tích lũy PHA của chủng *B. cereus* phân lập từ nước thải cho thấy ở pH 8 chủng tích lũy được cao nhất 382 $\mu\text{g/ml}$ PHB [78]. Tương tự, chủng *B. cereus* NRRL-B-3711 tổng hợp của PHB tối đa là 50% ($8,4 \pm 0,06$ g/l) pH 8 [79]. Một đại diện của nhóm vi khuẩn Gram âm là *Ensifer* sp. HD34 có thể tạo ra sản lượng PHA tối đa là 54,49 % (w/v) ($\sim 5,0$ g/l) trong môi trường tối ưu có giá trị pH ban đầu là 9.0. Nghiên cứu cho thấy khối lượng khô tế bào khi nuôi cấy ở các pH ban đầu là 6, 7 và 8 đều cao hơn ở pH 9, tuy nhiên hàm lượng PHA ở pH 9,0 mới đạt giá trị cao nhất [80]. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu về PHA thu nhận từ *Pseudomonas pseudoalcaligenes* và *Bacillus* spp. [81,82].

Những kết quả này có thể được giải thích là ở các giá trị pH cao tế bào vi khuẩn có thể tạo ra sự cảm ứng để sinh ra nguồn năng lượng dồi dào, tạo điều kiện cho sự hấp thụ cơ chất khi nuôi cấy. Tuy nhiên ở các chủng có pH tối ưu rộng thì hiệu suất tổng hợp PHA thấp hơn so với các chủng khác, vì pH có thể tác động đến các enzym gây thoái hóa của chính vi khuẩn sinh tổng hợp nhựa [76]. Trên thực tế giá trị pH trung tính thường được sử dụng cho độ pH ban đầu của môi trường để sản xuất PHA của các chủng vi khuẩn.

3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ, giống như các yếu tố vật lý và hóa học thiết yếu khác luôn là một yếu tố giới hạn tiềm năng. Đặc biệt, nhiệt độ nên được xem như một yếu tố tương tác, thường trực, vì nó ảnh hưởng đến tất cả các quá trình hóa học và sinh hóa trong tế bào, đến sự phát triển của vi sinh vật, tốc độ hô hấp và sự đồng hóa các loại carbon hữu cơ, nhưng nó không phải lúc nào cũng là yếu tố duy nhất hoặc thậm chí là yếu tố chi phối. Mọi loài vi sinh vật đều có các đặc điểm nhiệt độ tối thiểu, tối đa và tối ưu, được gọi là nhiệt độ cơ bản. Kết quả từ Hình 3.4 cho thấy ở nhiệt độ 25 °C và 45 °C (ngưỡng dưới và ngưỡng trên của sinh trưởng), cả 6 chủng vi khuẩn gần như không sinh trưởng và không tích lũy nhựa. Các chủng đều sinh trưởng tốt từ 30 – 37 °C và tốt nhất ở 37 °C với khối lượng sinh khối khô đạt từ 16,3 – 38,8 mg/ml. Ở nhiệt độ này, các chủng cũng tích lũy nhựa cao nhất với hàm lượng từ 25,7 – 44,2 %, ngay kể cả với hai chủng sinh trưởng yếu là 5.6 và 6.5. Kết quả này tương tự với hầu hết các công bố về các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa ưa ấm [80,83,84].

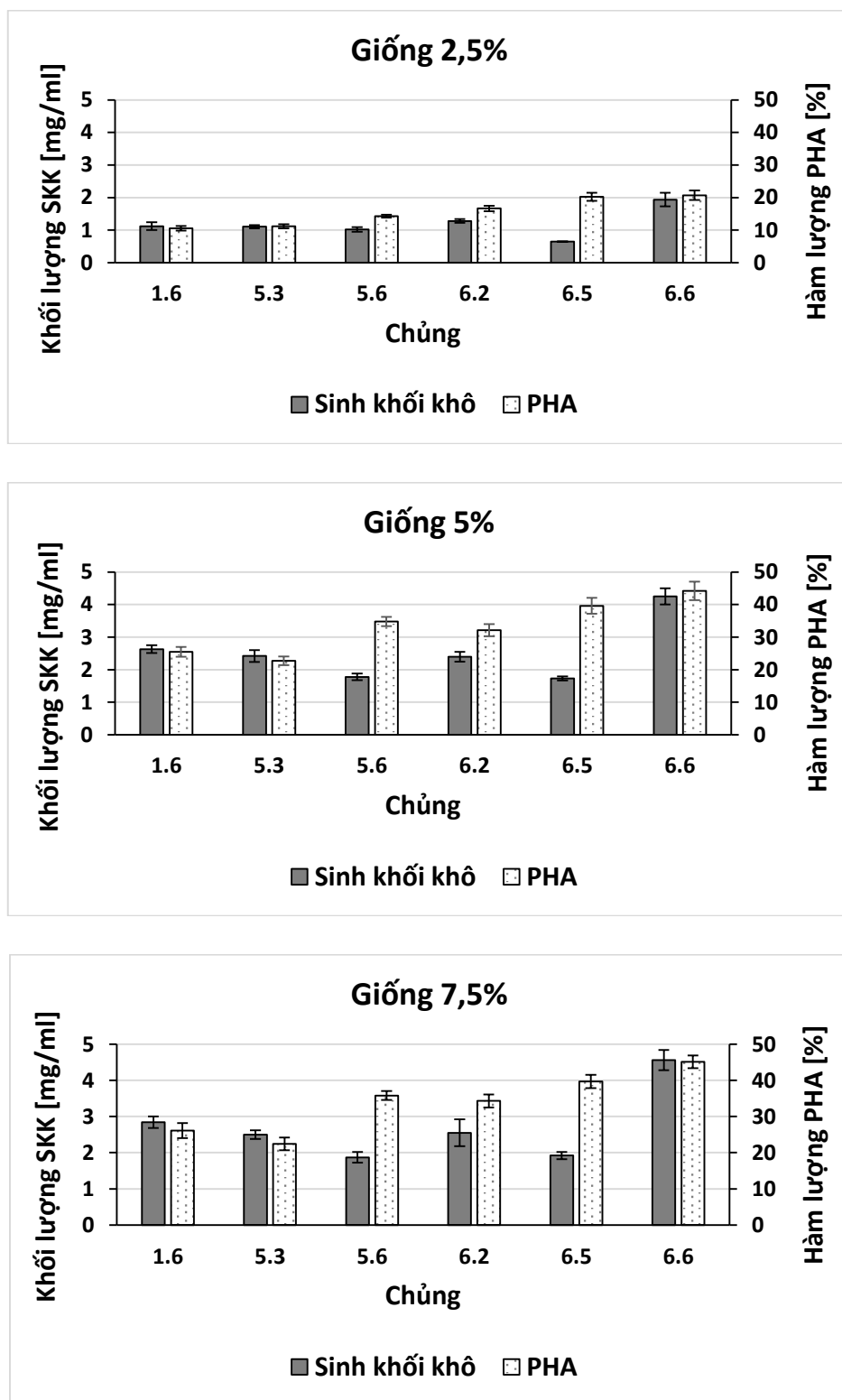


Hình 3.4: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn.

Trừ các nhóm vi sinh vật thuộc hệ sinh thái đặc biệt trong môi trường biển, đại dương như ở tầng đáy sâu hàng trăm đến hàng nghìn mét hay tại các giếng dầu thì phần lớn các vi sinh vật biển dị dưỡng thuộc loại ưa ấm, có khả năng sinh trưởng từ 25 – 45°C và sinh trưởng tốt nhất ở 30 – 37°C [85]. Các chủng trong nghiên cứu này đều được phân lập ở vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa, nơi có nhiệt độ trung bình cả năm là 26,3°C, mùa đông ít lạnh. Các mẫu nước là các mẫu nước mặt và trầm tích biển có độ sâu từ 8 – 20 m, do đó các chủng vẫn thuộc nhóm ưa ấm. So với các chủng vi khuẩn ưa mặn được tìm thấy ở trong nước, chủng *Yangia* sp ND199 phân lập từ mẫu đất rừng ngập mặn tỉnh Nam Định cũng sinh trưởng và tích lũy PHA thích hợp ở nhiệt độ 32°C [58]. Nhiệt độ từ 30 – 35°C cũng là nhiệt độ sinh trưởng thích hợp nhất cho 3 chủng vi khuẩn VK75, VK 98 và VK 129 phân lập từ rừng ngập mặn tỉnh Quảng Ninh với khối lượng sinh khối khô dao động từ 3,3 – 4,3 mg/ml và hàm lượng PHA tích lũy được từ 50 – 67% so với sinh khối khô [52].

3.3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống

Cũng tương tự như pH và nhiệt độ, tỷ lệ giống cũng là một trong những yếu tố được khảo sát để đánh giá tác động của nó lên sinh trưởng và tích lũy nhựa. Ở thí nghiệm này, 3 nồng độ được khảo sát, bao gồm 2,5 %, 5% và 7,5 %.



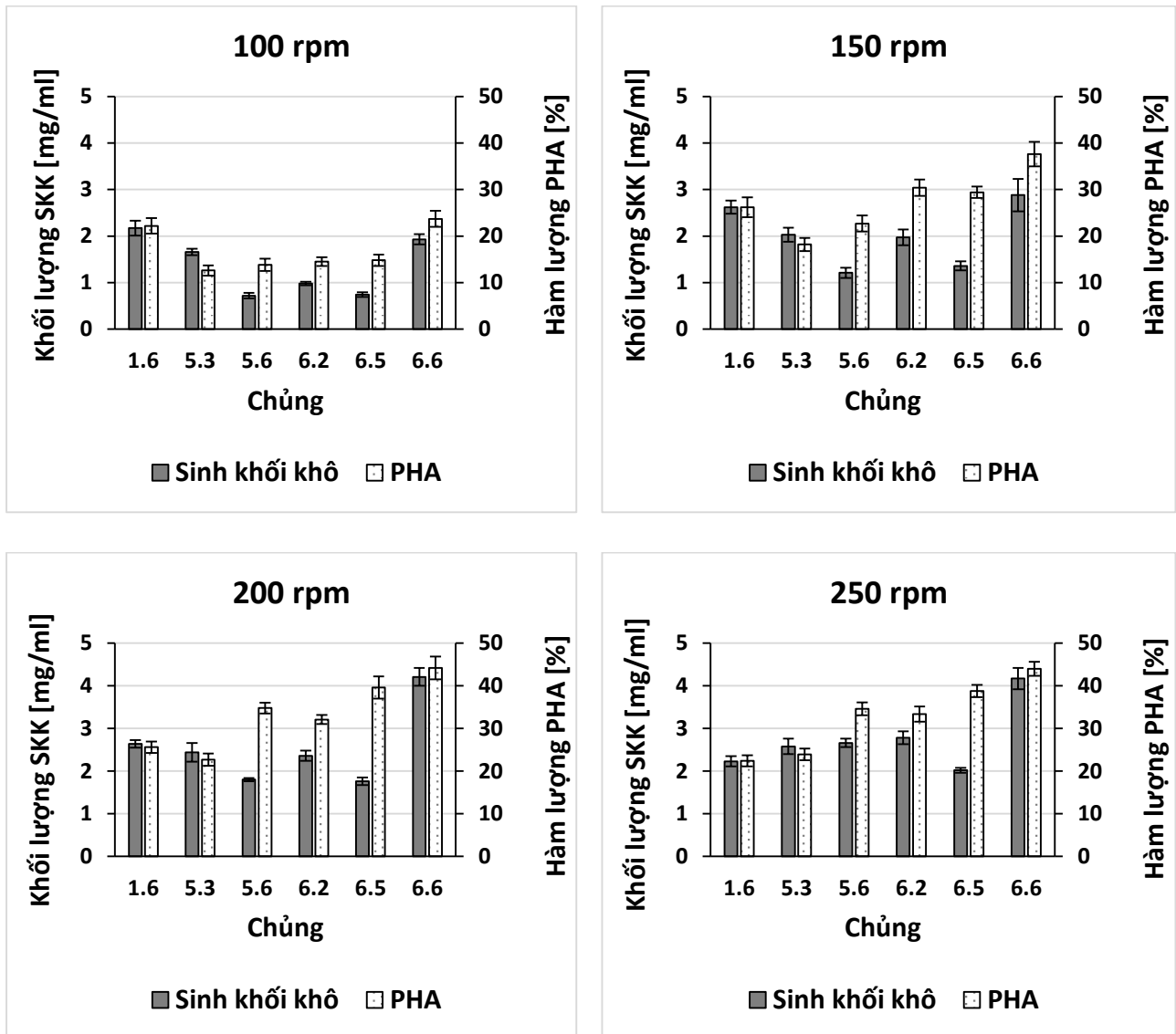
Hình 3.5: Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn

Kết quả từ Hình 3.5 cho thấy ở tỷ lệ giống 7,5 % cả 6 chủng đều có khối lượng sinh khối khô và hàm lượng PHA tích lũy được cao nhất. Do PHA là sản phẩm thứ cấp của tế bào vi sinh vật lại tích lũy ở dạng nội bào, vì vậy với tỷ lệ tiếp giống thấp (2,5 %) thì khối lượng sinh khối tế bào thu được cũng thấp (0,65 – 1,937 mg/ml SKK), dẫn đến hiệu suất tích lũy nhựa cũng thấp (10,54 – 20,7 %). Mặc dù ở lô thí nghiệm với tỷ lệ tiếp giống 7,5 % cho kết quả khối lượng sinh khối khô và hàm lượng PHA tích lũy cao nhất nhưng so với mẫu được tiếp giống với tỷ lệ 5 % thì mức độ chênh không đáng kể (1-5%). Do đó tỷ lệ giống 5% được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Trong quy trình lên men vi sinh vật, tỷ lệ giống phù hợp cũng góp phần vào sự thành công của quá trình sản xuất, đảm bảo năng suất sản phẩm (sinh khối tế bào, hàm lượng các hợp chất trao đổi bậc 1, bậc 2,...) mà lại tránh được sự tạp nhiễm. Trong công nghệ lên men, tùy thuộc vào mục tiêu, đặc điểm sinh học của chủng sản xuất, đặc tính của sản phẩm, quy mô sản xuất, phương pháp lên men,... tỷ lệ tiếp giống thường dao động từ 5 – 15 % (v/v hoặc v/w) [83]. Ở quy mô phòng thí nghiệm, tỷ lệ giống thường nhỏ ~ 3 – 5 % (v/v) nhưng ở quy mô lên men lớn hơn, tỷ lệ giống được sử dụng cũng sẽ lớn hơn (7,5 – 15 %) và giống sẽ được nhân qua nhiều cấp (2 – 3 cấp) để đảm bảo về thể tích, mật độ và tuổi giống.

3.3.4. Ảnh hưởng của độ thoáng khí

Tốc độ lắc đã được chứng minh có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA. Năm 2008, Myshkina và cộng sự đã công bố tác động của tốc độ lắc đến sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng *Azotobacter chroococcum* 7B. Ở tốc độ 250 rpm, khối lượng sinh khối đạt 7,66 g/l với hàm lượng PHB tích lũy 75,3 % (~ 5,8 g/l PHB). Tuy nhiên cả 2 chỉ số này đều giảm ở tốc độ lắc 190 rpm với khối lượng sinh khối chỉ đạt 3,13 g/l, hàm lượng PHB 74,1 % (~ 2,3 g/l PHB) [87]. Trong thí nghiệm này các chủng được thử nghiệm ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của chúng. Kết quả từ Hình 3.6 cho thấy chủng 1.6 hầu như không bị ảnh hưởng nhiều của các tốc độ lắc khác nhau đến sinh trưởng và tích lũy nhựa với chỉ số khối lượng sinh khối khô dao động từ 2,17 – 2.64 mg/ml và hàm lượng PHA từ 22,2 – 26.2 %. Trong khi đó cả 5 chủng còn lại (5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6) đều có nhu cầu oxy rất cao do tất cả các chủng vi khuẩn biến tuyền chọn đều là các chủng vi khuẩn hiếu khí. Ở tốc độ lắc 250 rpm, cả 5 chủng đều đạt hai hàm chỉ số (sinh trưởng và tích lũy PHA) cao nhất, thậm chí cả các chủng vốn được đánh giá là sinh trưởng yếu ở các thí nghiệm trước như 5.6 và 6.5. (khối lượng sinh khối khô đạt lần lượt 2,66 và 2,02 mg/ml). Tuy nhiên đối với chủng 6.6 vốn sinh trưởng và tích lũy PHA mạnh nhất thì không thấy có sự khác biệt giữa tốc độ lắc 200 và 250 rpm (khối lượng sinh khối khô đạt $4,19 \text{ mg/ml} \pm 0,02$ và hàm lượng nhựa đạt $44,1 \pm 0,2\%$). Hương và cộng sự cũng ghi nhận không có sự khác biệt đáng kể về sinh trưởng của chủng *Cupriavidus* sp. USMAA1020 (DSM 19416) nhưng khả năng tích lũy copolymer P(3HB-

co-4HB) lại khác nhau có ý nghĩa ở các tốc độ lắc 150, 200 và 250 rpm. Cụ thể, hàm lượng PHA tích lũy ở các tốc độ lắc này lần lượt là 28, 50 và 63 % (tương ứng với 3,1; 4,8 và 6,5 g/l PHA) [88].

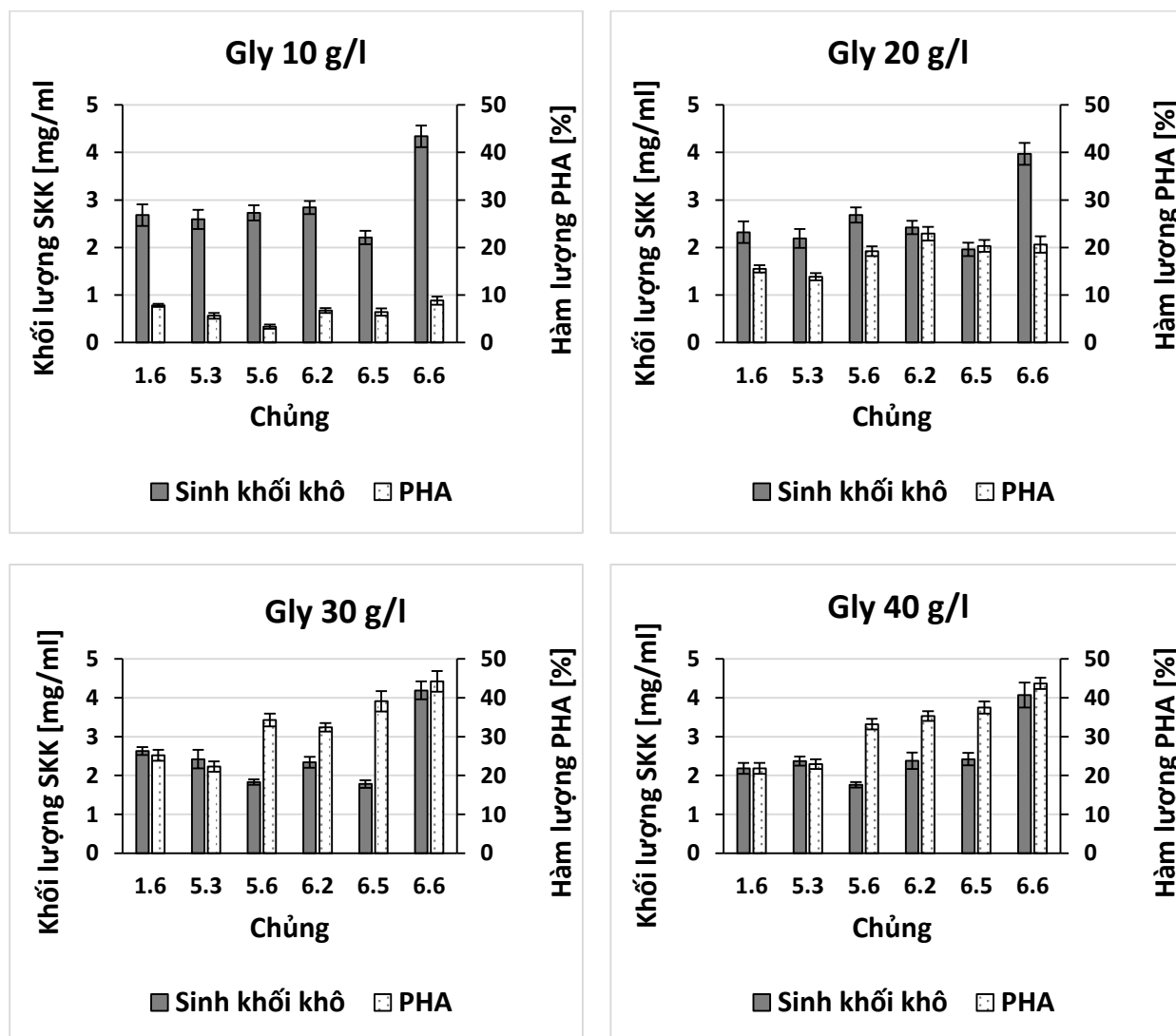


Hình 3.6: Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn

3.3.5. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

Trong các nghiên cứu đã được công bố, quá trình sinh tổng hợp PHA diễn ra khi trong môi trường dinh dưỡng dư thừa nguồn carbon nhưng lại thiếu hoặc cạn nguồn nitơ hoặc phosphate. Cơ bản các nguồn carbon đã được sử dụng để làm nguồn cơ chất các chủng vi sinh vật tích lũy PHA là các loại carbon hydrate, chất béo, các loại cồn như glycerol. Glycerol là loại phế phụ phẩm dồi dào từ quá trình sản xuất diesel sinh học, được ứng dụng làm phụ gia thực phẩm, mỹ phẩm, và dược phẩm. Tuy nhiên các ứng dụng glycerol làm

nguồn nguyên liệu để sản xuất các sản phẩm có giá trị như cụm hoá chất kiến tạo axit succinic, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, axit citric, axit acetic, axit lactic, bioethanol, n-butanol hay các polyester PHA thông qua các quy trình công nghệ sinh học hiếu khí và kỵ khí ngày càng thu hút sự quan tâm của các nhà nghiên cứu trên thế giới [89].



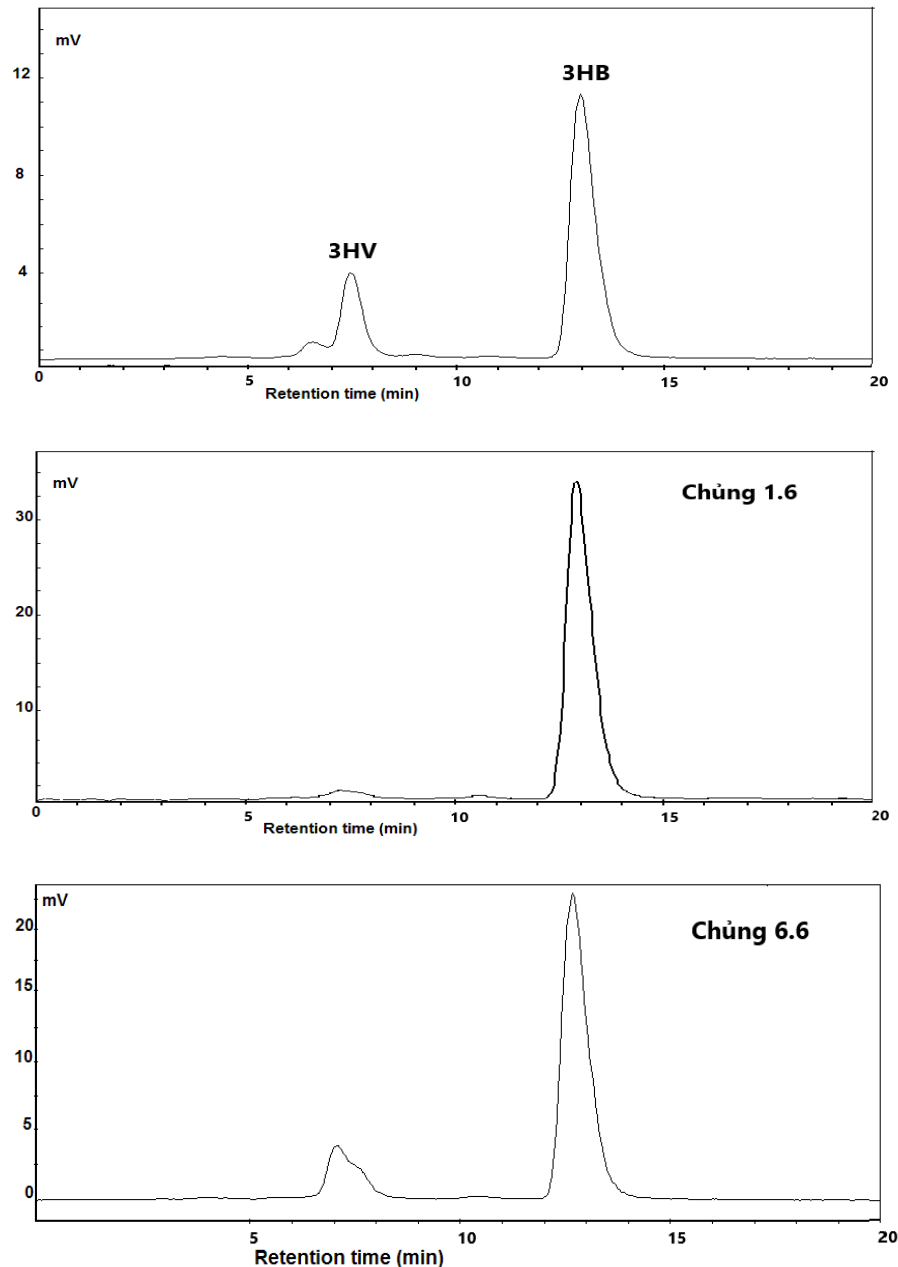
Hình 3.7: Ảnh hưởng của nồng độ glycerol đến sinh trưởng và tổng hợp PHA của 6 chủng vi khuẩn biển tuyển chọn

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng glycerol là nguồn carbon để nuôi cấy các chủng vi khuẩn biển sinh tổng hợp PHA với nồng độ dao động từ 10 – 40 g/l. Kết quả từ Hình 3.7 cho thấy ở nồng độ glycerol 10 g/l, quá trình sinh trưởng của các chủng diễn ra mạnh mẽ nhưng hiệu suất tích lũy PHA thấp (3,3-8,8%) do sự cân đối giữa các thành phần carbon, nitơ và phosphate trong thành phần môi trường. Khi nồng độ glycerol nâng lên 20 – 30 g/l, quá trình sinh trưởng của các chủng không có sự khác biệt nhiều so với lô thí nghiệm nồng độ glycerol 10%, tuy nhiên hiệu suất tích lũy PHA lại tăng lên đáng kể

gấp 2-3 lần (15,5 – 22.9% ở nồng độ 20 g/l và 22,3 – 44.2% ở nồng độ 30 g/l). Tuy nhiên khi nồng độ glycerol đạt 40 g/l thì khối lượng sinh khối khô và hiệu suất PHA không có sự khác biệt đáng kể với nồng độ 30 g/l. Chủng *Pseudomonas putida* KT2440 là chủng vi khuẩn được biết có khả năng tổng hợp PHA có độ dài chuỗi trung bình với hiệu suất đạt đến 75% so với khối lượng khô. Chủng này cũng đạt tối đa khối lượng sinh khối và nhựa PHA (3,95 g/l) khi lên men với glycerol nồng độ 40 g/l [90]. Vượt trên nồng độ này, cả hai chỉ tiêu đều giảm do nồng độ glycerol cao cũng có thể là nguyên nhân gây ức chế sự sinh trưởng cũng như tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn [91]. Bên cạnh đó, nhiều các chủng vi khuẩn đã được công bố khả năng tích lũy PHA đa dạng khi sử dụng glycerol là nguồn carbon với nồng độ ≥ 20 g/l [92].

3.4. Xác định thành phần PHA

Đặc tính cơ lý của vật liệu phụ thuộc vào thành phần hóa học của vật liệu đó. Họ PHA là một họ lớn với hơn 150 loại axit polyhydroxyaklanoic do sự tổ hợp của các loại monomer khác nhau. Các monomer phổ biến có thể kể đến 3HB, 3HV, 3HP, 4HB, 4HV, Hx và HO [6]. Do đó việc xác định thành phần và nồng độ các monomer là cần thiết. Cho đến nay có nhiều phương pháp xác định thành phần PHA được thực hiện bằng các kỹ thuật. So với các phương pháp phân tích khác, phương pháp sắc ký khí (GC) vẫn được sử dụng là phương pháp phổ biến nhất để định lượng và phân tích thành phần PHA do cung cấp các phép đo chi tiết và chính xác hơn dù phải sử dụng các dung môi có hại cho môi trường như chloroform, dichloromethane hoặc diethylethane. Tuy nhiên thành phần PHA nội bào cũng có thể được xác định bằng kỹ thuật sắc ký lỏng (LC) [93] và quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) [94]. Phương pháp thay thế phương pháp GC là phương pháp sắc ký lỏng (LC) đã được thử nghiệm trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). So với phương pháp GC, phương pháp LC ít tốn thời gian hơn trong việc chuẩn bị mẫu. Hơn nữa, các mẫu cho LC có thể được thực hiện trực tiếp từ môi trường nuôi cấy, trong khi phép đo GC cần sinh khối khô. Trong nghiên cứu của Duvigneau và cộng sự đã chứng minh được phương pháp LC hiệu quả trong việc xác định thành phần PHA bao gồm cả dạng heteropolymer có chứa monomer 3HB và 3HV, trong thời gian ngắn và chi phí hợp lý hơn phương pháp GC [70]. Trong nghiên cứu này chúng tôi phân tích thành phần PHA thu nhận được của các chủng vi khuẩn biển bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp. Kết quả tại Hình 3.8 cho thấy thời gian lưu mẫu của 3HB và 3HV lần lượt là 13,01 phút và 7,56 phút. Dựa vào thời gian lưu mẫu và diện tích của các peak trong sắc ký đồ của các chủng vi khuẩn biển, thành phần PHA và nồng độ các monomer thu được từ các chủng được biểu diễn ở Bảng 3.2. Kết quả từ Bảng 3.2 cho thấy 5/6 chủng tổng hợp homopolymer PHB và chỉ có 1/6 chủng (chủng 6.6) tổng hợp PHA ở dạng heteropolymer với 5,2 mol% 3HV.



Hình 3.8: Sắc ký đồ thành phần PHA của chất chuẩn PHBV (chứa 12% 3HV) và 2 chủng vi khuẩn biến đại diện 1.6 và 6.6 phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng cao áp Agilent 1290 infinity II.

PHB là loại PHA được nghiên cứu đầu tiên và rộng rãi nhất cho đến nay. PHB có tính kết tinh cao, tính thấm oxy thấp, giòn, cứng do đó việc ứng dụng PHB còn nhiều hạn chế [9]. Khắc phục các nhược điểm về đặc tính cơ lý của PHB, các heteropolymer PHA như PHBV có các tính chất phù hợp hơn để làm các loại vật liệu ứng dụng trong dược phẩm và y tế như độ kết tinh thấp, giảm độ cứng, tăng độ bền kéo và linh hoạt hơn. Mặt khác phần trăm số mol của 3HV rất quan trọng trong việc xác định các tính chất của copolymer. Phần trăm số mol càng cao thì tính chất cơ nhiệt càng lớn, càng dễ dàng phối chế với các loại vật liệu khác như cellulose, tinh bột biến tính để tạo màng và sợi có độ đàn

hồi cao [13]. Tuy nhiên con đường tổng hợp 3HV trong tế bào khác với tổng hợp 3HB. Cơ chất của 3HB là acetyl-CoA nhưng 3HV lại cần cơ chất khác là propionyl-CoA. Việc tổng hợp 3HV phụ thuộc vào 2 yếu tố chính là bản thân chủng sản xuất và các tiền chất được bổ sung như axit propionic, axit valeric [95]. Năm 2020, Balakrishna và cộng sự cũng thu nhận được 2,8 g/l PHBV (~ 71,15 % PHA so với sinh khối khô) từ chủng *Bacillus aryabhatai* nhưng không rõ thông tin về tỷ lệ 3HV khi sử dụng nguồn carbon là glucose có bổ sung axit propionic. [96]. Tại Việt Nam, nhóm của PGS. TS. Đoàn Văn Thước cũng thu thập được khá nhiều chủng sinh tổng hợp PHBV trên nhiều loại cơ chất khác nhau. Sử dụng fructose làm nguồn carbon, từ tập hợp 100 chủng chỉ tìm thấy có 2 chủng tổng hợp 3HV với tỷ lệ 2 – 3 mol%. Khi bổ sung tiền chất như các muối propionate hay valerate thì hiệu suất sàng lọc đã tăng lên được 7 chủng với tỷ lệ 5 – 15 mol% 3HV. Mặt khác, nhiều chiến lược lên men đã được sử dụng nhằm làm tăng được tỷ lệ 3HV lên 21 – 44 mol% nhưng hàm lượng tích lũy PHA tổng giảm xuống chỉ còn 11 – 12 % [59, 97]. Trong nghiên cứu này, từ tập hợp 6 chủng tổng hợp PHA mới tìm thấy có 1 chủng tích lũy PHBV với nồng độ 3HV đạt 5,2 mol% trên nguồn cơ chất là glycerol. Tuy hàm lượng tích lũy PHA cũng như nồng độ 3HV chưa phải rất cao so với các công bố trước nhưng đây là những kết quả bước đầu tìm được chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHBV. Để nâng cao hàm lượng PHA cũng như nồng độ monomer 3HV của chủng thì các nghiên cứu chuyên sâu hơn cần tiếp tục được thực hiện. Kết quả này cũng góp phần làm phong phú thêm nguồn gen vi sinh vật biển tổng hợp nhựa sinh học.

Bảng 3.2: Thành phần và nồng độ các monomer của PHA thu nhận từ các chủng vi khuẩn biển.

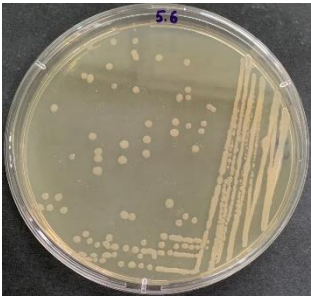
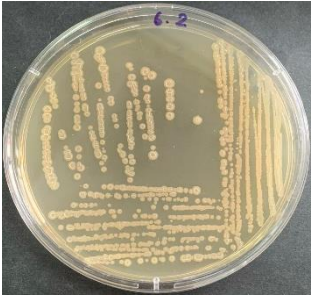
Chủng	3HB [mol %]	3HV [mol %]
1.6	98,2	-
5.3	98,4	-
5.6	97,7	-
6.2	98,6	-
6.5	98,4	-
6.6	94,8	5,2

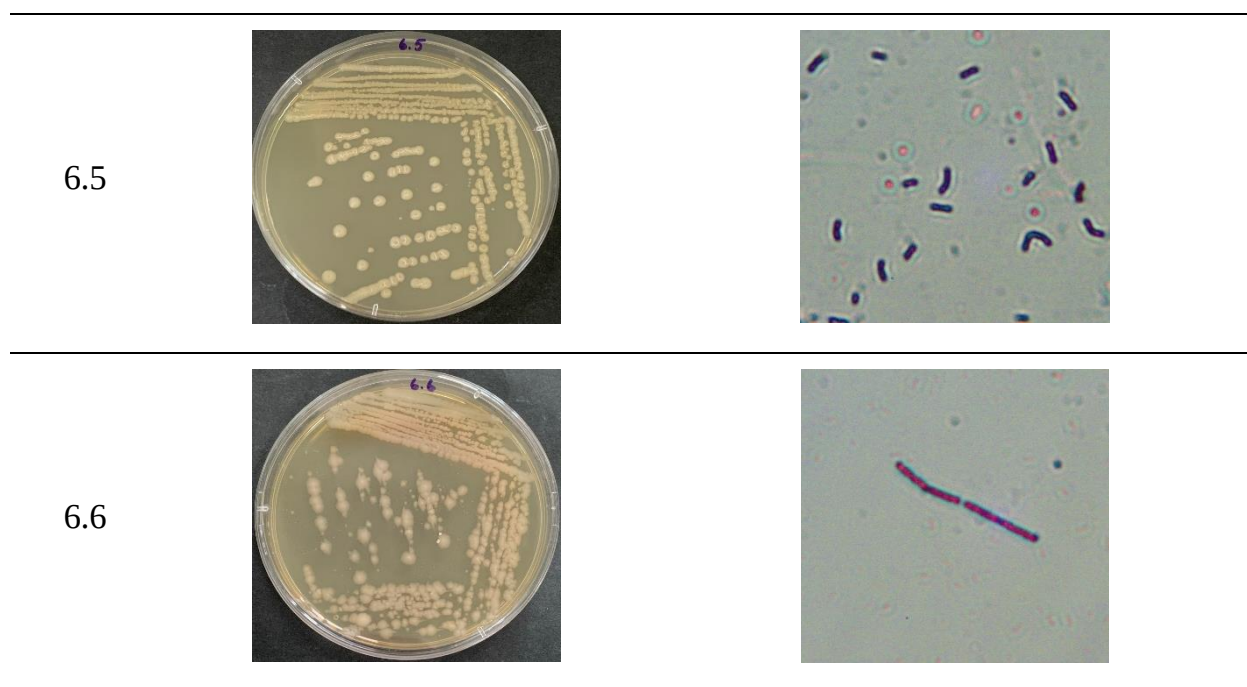
3.5. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn biển tích lũy PHA

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi ở 37°C trên môi trường LB thạch với nồng độ NaCl 3%, sau 24 giờ tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc. Hình dạng tế bào

được quan sát bằng kính hiển vi điện tử Olympus CH2 sau khi nhuộm Gram theo như mô tả trong phần phương pháp. Kết quả đặc điểm sinh học của 6 chủng tuyển chọn được tóm tắt tại Bảng 3.3, 3.4 và 3.5 cho thấy cả 6 chủng vi khuẩn được tuyển chọn đều là vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, tế bào hình que, sinh nội bào từ, có phản ứng catalase dương tính. Theo Khoá phân loại của Bergey thì các chủng này đều thuộc chi *Bacillus* [98].

Bảng 3.3: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn biển tuyển chọn.

Chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào ở độ phóng đại 100X
1.6		
5.3		
5.6		
6.2		



Bảng 3.4: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHA

(+: dương tính)

Chủng	1.6	5.3	5.6	6.2	6.5	6.6
Gram	+	+	+	+	+	+
Tế bào	Que, chuỗi ngắn	Que, chuỗi ngắn	Que, chuỗi dài	Que, chuỗi dài	Que, chuỗi dài	Que, chuỗi dài
Nội bào tử	+	+	+	+	+	+
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng	Trắng sữa	Trắng sữa	Trắng sữa	Trắng sữa	Trắng sữa
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn, hơi lõm ở tâm, bề mặt trơn bóng, mép tròn đều	Tròn, bề mặt lõm bóng, mép tròn đều	Tròn, hơi lõm ở tâm, bề mặt bóng nhầy, mép tròn đều	Tròn dẹp, bề mặt nhẵn, mép tròn đều	Tròn, hơi lõm ở tâm, bề mặt nhẵn, mép tròn đều	Hình dạng không đồng nhất, mặt bên dày, mép nhẵn

Bảng 3.5: Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của các chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHA

(+: dương tính; ± dương tính yếu; -: âm tính)

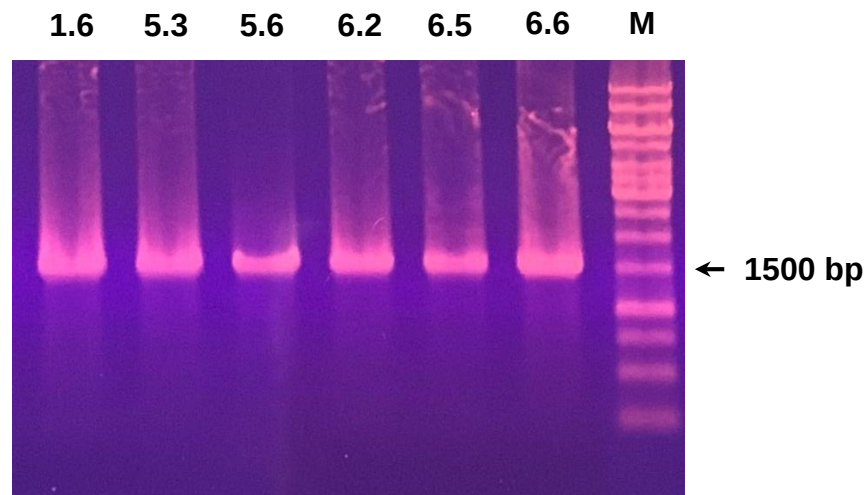
Chủng	1.6	5.3	5.6	6.2	6.5	6.6
Nhu cầu oxy	±	+	+	+	+	+
Sinh catalase	+	+	+	+	+	+
Thủy phân tinh bột	+	+	+	+	+	±
Thủy phân CMC	+	-	-	±	±	+
Thủy phân gelatin	+	+	+	±	+	±
Sử dụng glucose	+	+	+	+	+	+
Sử dụng fructose	+	+	+	±	+	+
Sử dụng saccharose	±	±	+	+	+	+
Sử dụng arabinose	-	-	±	+	+	±
Sử dụng xylose	-	-	-	+	-	-

Ngoài phương pháp truyền thống xác định loài dựa trên đặc điểm hình thái sinh lý sinh hóa, chúng tôi tiến hành định danh theo phương pháp sinh học phân tử giải trình tự vùng gen 16S rRNA để phân loại các chủng tuyển chọn. Trình tự gene 16S rRNA có kích thước khoảng 1500 bp đã được sử dụng rộng rãi trong việc phân loại và xác định vi khuẩn và vi khuẩn cổ để khuếch đại được gene 16S rRNA, DNA tổng số của các chủng được tách chiết. Kết quả từ Bảng 3.6 cho thấy DNA tổng số của tất cả các chủng đều có nồng độ và độ tinh sạch đảm bảo làm khuôn để tổng hợp gene 16S rDNA.

Bảng 3.6: Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số tách chiết từ các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Chủng	Nồng độ DNA tổng số [ng/μl]	A ₂₆₀ :A ₂₈₀
1.6	123,4	1,76
5.3	168,3	1,82
5.6	154,1	1,72
6.2	152,6	1,80
6.5	147,2	1,75
6.6	151,7	1,73

Bằng cặp mồi 27F/1492R, đã khuếch đại thành công được đoạn gen 16S rRNA đặc hiệu có kích thước khoảng 1500bp. Kích thước của đoạn gen được nhân bản phù hợp với tính toán lý thuyết khi thiết kế cặp mồi. Sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt, mỗi chủng đều có một băng sáng rõ duy nhất trên gel điện di với kích thước đúng với tính toán lý thuyết. Kết quả điện di của 6 chủng tuyển chọn được thể hiện ở Hình 3.5.

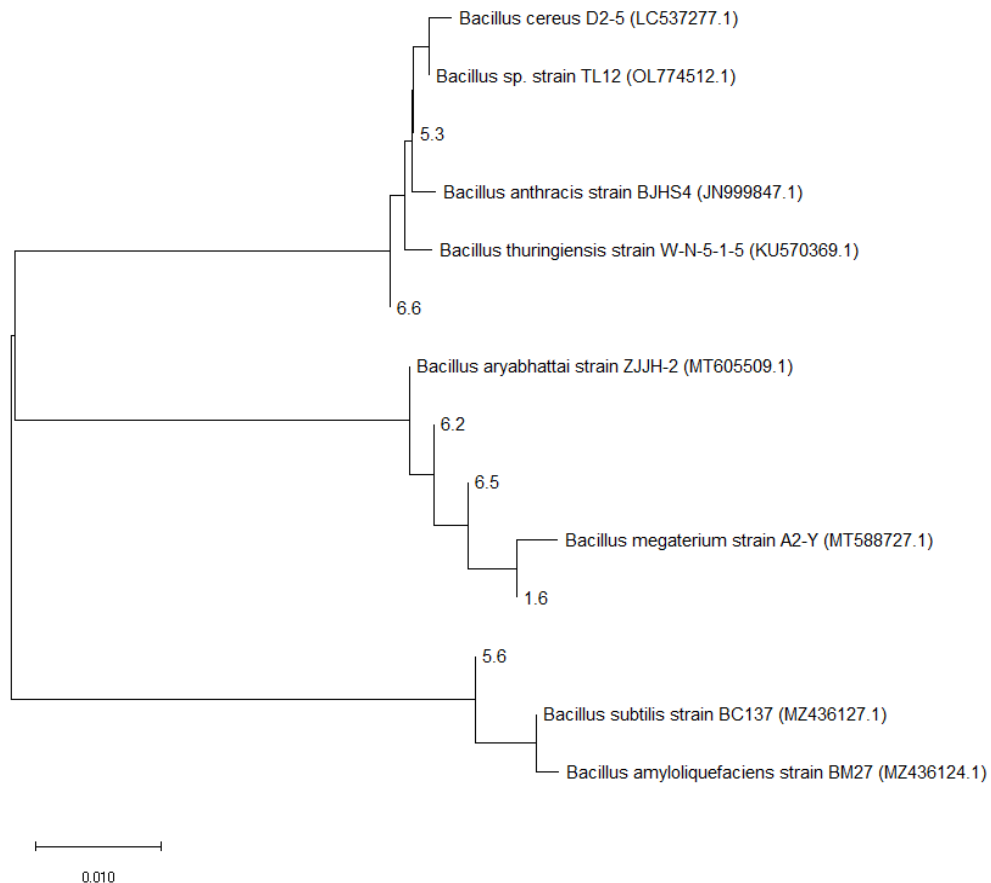


Hình 3.9: Sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rARN của các chủng có khả năng tích lũy PHA trên gel agarose 0,8%

(M: thang chuẩn GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher)).

Trình tự gen 16S rRNA của 6 chủng tuyển chọn sẽ được xử lý bằng các phần mềm tin sinh như Chromas, BLAST và MEGA X. Kết quả từ Hình 3.10 cho thấy tất cả các chủng đều thuộc chi *Bacillus*, trong đó chủng 1.6, 5.3 và 5.6 lần lượt có độ tương đồng cao nhất với các loài *B. megaterium*, *B. cereus* và *B. subtilis*. Còn 3 chủng 6.2, 6.5 và 6.6 có trình tự giống với các loài *Bacillus* spp khác. Việc so sánh trình tự gen 16S rRNA gần như hoàn chỉnh của một chủng phân lập với trình tự của các chủng loại của tất cả các loài sinh vật nhân sơ trong ngân hàng gene nhằm thiết lập mối quan hệ phân loại giữa các chủng

sinh vật nhân sơ. Với mức độ giống nhau $\geq 98,65\%$ hiện được công nhận là điểm giới hạn để phân định đến loài [99]. Tuy nhiên với sự phát triển của ngành công nghệ sinh học hiện nay để phân loại được chính xác đến loài cần phải xác định thêm nhiều chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa nữa cũng như giải trình tự một số marker phân tử khác như gene 23S *rRNA*, *rpoB*, *gyrB*, *dnaK*, *dsrAB*, *amoA*, *amoB*, *mip*, *horA*, *hitAM*, *recA*, *ica*, *frc. oxc*, 16S-23S *rDNA* ISR và IS256 [100].



Hình 3.10: Cây phát sinh chủng loại các chủng 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6 được xây dựng bằng phần mềm MEGA X trong phương pháp maximum-likelihood.

Chi *Bacillus* là vi khuẩn được biết đến đầu tiên thuộc nhóm gram dương có khả năng tích lũy PHA [101]. Các loài thuộc chi này như: *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*,...được phát hiện có khả năng tích lũy PHA [101,102,103,104]. Với ưu điểm linh hoạt và các tính chất vật lý khác, PHA tách chiết từ chi *Bacillus* được sử dụng trong cấy ghép y tế có thể phân hủy sinh học dần hồi [14]. Chi *Bacillus* mang nhiều lợi thế trong khả năng lên men ở các môi trường nghèo dinh dưỡng và khả năng sử dụng đa dạng rất nhiều nguồn carbon cơ chất khác nhau để tổng hợp PHA, do đó nó là đối tượng tiềm năng cho các nghiên cứu sản xuất PHA [105].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Từ 8 mẫu nước biển và trầm tích của vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa, đã phân lập được 44 chủng vi khuẩn, trong đó đã sàng lọc được 6 chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHA.
2. Ở điều kiện nuôi cấy thích hợp, các chủng vi khuẩn tuyển chọn tổng hợp PHA với hiệu suất từ 22,4 – 44,2% ở điều kiện nhiệt độ (37 °C) và pH lên men phù hợp (6 – 8). Trong đó đặc biệt là chủng 6.6, cho hiệu suất sản sinh PHA cao vượt trội đạt 44,2% khi nuôi cấy trong môi trường lên men Salinity HT, ở điều kiện nhiệt độ 37°C và pH 8.
3. PHA thu nhận từ chủng 6.6 là dạng copolymer có thành phần 3HV với tỷ lệ 5,2 mol%.
4. Dựa vào đặc điểm sinh học và trình tự gen 16S rRNA cả 6 chủng vi khuẩn tuyển chọn có độ tương đồng cao với các loài thuộc chi *Bacillus*.

KIẾN NGHỊ

1. Tìm điều kiện nuôi cấy thích hợp để nâng cao tỷ lệ 3HV của chủng 6.6
2. Nghiên cứu các đặc tính cơ lý của các loại PHA từ các chủng phân lập

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Lại Thị Hồng Nhung, Phan Thị Tuyết Minh, Phạm Thị Trang, Đào Hải Yến, Nguyễn Kim Thoa. *Sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus spp* biến sinh tổng hợp *Polyhydroxyalkanoate**. Tuyển tập Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2022.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Market Analysis report, Plastic Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (PE, PP, PU, PVC, PET, Polystyrene, ABS, PBT, PPO, Epoxy Polymers, LCP, PC, Polyamide), By Application, By End-use, By Region, And Segment Forecasts, 2021 – 2028; ID: 9.
2. Muhammadi S., Muhammad A., Shafqat H., 2015, Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4), pp. 56-77.
3. Yaradoddi, J.S., Hugar S., Banapurmath N.R., Hunashyal A.M., Sulochana M.B., Shettar A.S., Sharanabasava V.G., 2019, Alternative and Renewable Bio-based and Biodegradable Plastics. In: Martínez, L., Kharissova, O., Kharisov, B. (eds) Handbook of Ecomaterials. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68255-6_150
4. Steinbüchel A and Valentin HE., 1995, Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, *FEMS Microbiology Letters*, 128(3), pp. 219–228.
5. Visakh PM., 2015, Chapter 1: Starch: State-of-the-Art, New Challenges and Opportunities in Starch-based Blends. Composites and Nanocomposites, *RSC Green Chem*, pp. 1-16.
6. Meereboer KW et al, 2020, Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites, *Green Chem*, 22, pp. 5519-5558.
7. Pachekoski WM et al, 2009, Thermal, mechanical and morphological properties of poly(hydroxybutyrate) and polypropylene blends after processing, *Mater Res*, 12, pp. 159–164.
8. Reddy CSK et al, 2003, Polyhydroxyalkanoates: an overview, *Bioresour Technol*, 87(2), pp. 137-46.
9. Sudesh K et al, 2000, Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, *Prog. Polym. Sci*, 25, pp. 1503–1555.
10. Philip S., Keshavarz T., Roy I., 2007, Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 82, pp. 233–247.
11. Martin DP and Williams SF., 2003, Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial, *Biochem. Eng. J*, 16, pp. 97–105.
12. Guedri-Knania L., Gardette J.L., Jacquet M., Rivaton A. 2004. Photoprotection of poly(ethylene-naphthalate) by zinc oxide coating. *Surf Coat Technol*. 180–181, 71-75.

13. Kim YB and Lenz RW., 2001, Polyesters from microorganisms, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 71, pp. 51-79.
14. Chanprateep S and Kulprecha S, 2006, Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04, *J Biosci Bioeng*, 101(1), pp. 51-56.
15. Bhubalan K., Lee W-H., Loo C-Y., Yamamoto T., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K., 2008, Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors, *Polym. Degrad. Stab*, 93, pp. 17–23.
16. Chen Q., Wang Q., Wei G., Liang Q., Qi Q., 2011, Production in *Escherichia coli* of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources, *Appl Environ Microbiol*, 77(14), pp. 4886-93.
17. Tao TL., Cui FJ., Chen XX., Sun WJ., Huang DM., Zhang J., Yang Y., Wu D., Liu WM., 2018, Improved mycelia and polysaccharide production of *Grifola frondosa* by controlling morphology with microparticle Talc, *Microb Cell Fact*, 17(1), pp. 1.
18. Sasidharan RS., Bhat SG., Chandrasekaran M., 2016, Amplification and sequence analysis of phaC gene of polyhydroxybutyrate producing *Vibrio azureus* BTKB33 isolated from marine sediments, *Ann Microbiol*, 66, pp. 299–306.
19. Ling SC., Tsuge T., Sudesh K., 2011, Biosynthesis of novel polyhydroxyalkanoate containing 3 Hydroxy-4- methylvalerate by *Chromobacterium* sp. USM2, *J Appl Microbiol*, 111, pp. 559–571.
20. Ng LM and Sudesh K, 2004, Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA) producer *Aquitalea* sp. USM4 (JCM 19919) and characterization of its PHA synthase, *J Biosci Bioeng*, 122, pp. 550–557.
21. Cheng J., Pinnell L., Engel K., Neufeld JD., Charles TC., 2014, Versatile broad-host-range cosmids for construction of high quality metagenomic libraries, *J Microbiol Methods*, 99, pp. 27–34.
22. Schallmeyer M., Ly A., Wang C., Meglei G., Voget S., Streit WR., Driscoll BT., Charles TC., 2011, Harvesting of novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase encoding genes from a soil metagenome library using phenotypic screening, *FEMS Microbiol Lett*, 321, pp. 150-156.
23. Cheng J and Charles TC., 2016, Novel polyhydroxyalkanoate copolymers produced in *Pseudomonas putida* by metagenomic polyhydroxyalkanoate synthases, *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, pp. 7611-7627.
24. Sharma PK et al, 2017, Synthesis and Physical Properties of Polyhydroxyalkanoate Polymers with Different Monomer Compositions by Recombinant *Pseudomonas*

- putida* LS46 Expressing a Novel PHA Synthase (PhaC116) Enzyme Appl Sci, 7, pp. 242.
25. Anjum A., Zuber M., Zia KM., Noreen A., Anjum MN., Tabasum S., 2016, Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers, A review of recent advancements. *Int J Biol Macromol*, 89, pp. 161-174.
 26. Chen GQ., (2009a), A polyhydroxyalkanoates based bio- and materials industry, *Chem Soc Rev*, 38, pp. 2434–2446.
 27. He WN., Zhang ZM., Hu P., Chen GQ., 1999, Microbial synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by strain DG17 from glucose, *Acta Polym Sin*, 6, pp. 709–714.
 28. Marangoni C et al, 2002, Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in Whey and Inverted Sugar with Propionic Acid Feeding, *Process Biochemistry*, 38, pp. 137-141.
 29. Ramsay BA et al, 1994, A method for the isolation of microorganisms producing extracellular long-side-chain poly (β -hydroxyalkanoate) depolymerase, *J Environ Polym Degr*, 2, pp. 1-7.
 30. Sedlacek P et al, 2020, Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–2, *Material Study on the Produced Copolymers. Polymers*, 12, pp. 1298.
 31. Kunioka M and Doi Y., 1990, Thermal degradation of microbial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules*, 23, pp. 1933–1936.
 32. Noda I et al, 2010, Nodax™ Class PHA Copolymers: Their properties and applications. In *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*; Chen, G.-Q., Ed.; Microbiology Monographs; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 14, pp. 238–255.
 33. Avella M et al, 2000, Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy) butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers, *J Mater Sci*, 35, pp. 523–545.
 34. Qiu YZ et al, 2005, Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from gluconate and glucose by recombinant *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida*, *Biotechnol Lett*, 27, pp. 1381–1386.
 35. Sharma PK et al, 2012, Kinetics of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by a novel isolate of *Pseudomonas putida* LS46, *Can J Microbiol*, 58, pp. 1–9.

36. Sharma PK et al, 2013, Draft genome sequence of medium chain length polyhydroxyalkanoate producing *Pseudomonas putida* LS46, *Genome Announc*, 18, e00151113.
37. Sharma PK et al, 2014, Genome features of *Pseudomonas putida* LS46, a novel polyhydroxyalkanoate producer and its comparison with other *P. putida* strains, *AMB Express*, 4, pp. 37.
38. Fu J et al, 2015, Effects of impurities in biodiesel-derived glycerol on growth and expression of heavy metal ion homeostasis genes and gene products in *Pseudomonas putida* LS46, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, pp. 5583–5592.
39. Fu J et al, 2015, Quantitative ‘Omics analyses of medium chain length polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida* LS46 cultured with waste glycerol and waste fatty acids, *PLoS ONE*, 10, e0142322.
40. Naimsiri N et al, 2004, Engineering of chimeric class polyhydroxyalkanoate synthases, *Appl Environ Microbiol*, 70, pp. 6789–6799.
41. Matsusaki H et al, 2000a, Biosynthesis and properties of poly(3Hydroxybutyrate-co-3Hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3, *Biomacromolecules*, 1, pp. 17–22.
Matsusaki H et al, 2000b, Biosynthesis of poly-(3Hydroxybutyrate-co-3Hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas* sp. 61-3, *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, pp. 401–409.
42. Matsumoto K et al, 2001, Biosynthesis of poly(3Hydroxybutyrate-co-3Hydroxyalkanoates) copolymer from sugars by recombinant *Ralstonia eutropha* harboring the *phac1ps* and the *phagps* genes of *Pseudomonas* sp. 61-3, *Biomacromolecules*, 2, pp. 934–939.
43. Fukui T and Doi Y., 1997, Cloning and analysis of the poly(3Hydroxybutyrate-co-3Hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*, *J Bacteriol*, 179, pp. 4821–4830.
44. Tsuge T et al, 2007, Variation in copolymer composition and molecular weight of polyhydroxyalkanoate generated by saturation mutagenesis of *Aeromonas caviae* PHA synthase, *Macromol Biosci*, 7, pp. 846–854.
45. Park SJ and Lee SY., 2004, Biosynthesis of poly-(3Hydroxybutyrate-co-3Hydroxyalkanoates) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains, *Appl Biochem Biotechnol*, 114, pp. 335–346.
46. Gao X et al, 2012, Production of copolyesters of 3Hydroxybutyrate and medium-chain-length 3Hydroxyalkanoates by *E. coli* containing an optimized PHA synthase gene, *Microb Cell Fact*, 11, pp. 130.

47. Van Thuoc D et al, 2021, Polyhydroxyalkanoate production from rice straw hydrolysate obtained by alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis using *Bacillus* strains isolated from decomposing straw, *Bioresour Bioprocess*, 8, pp. 98.
48. Doan Van Thuoc et al, 2020, Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from raw cassava starch by *Bacillus megaterium* D8, *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Sư phạm Hà Nội: Khoa học Tự nhiên*, 10(65).
49. Huỳnh Văn Hiếu et al, 2016, Ảnh hưởng của rỉ đường lên sự tăng trưởng và tích lũy PHB của một số chủng vi khuẩn phân lập tại TP Hồ Chí Minh, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật và Công nghệ Việt Nam*, 5(6), tr. 54-58.
50. Nguyễn Thành Luân et al, 2018, 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, *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm*, 14(1), tr. 12-19.
51. Phạm Thanh Hà et al, 2008, Tạo đột biến nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp Poly- β -hydroxybutyrate của vi khuẩn *Alcaligenes latus*, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 6(4), tr. 489-496.
52. Đoàn Văn Thuộc, Nguyễn Thị Vóc, 2016, Isolation of halophilic bacterial strains from Mangrove soil samples for Polyhydroxyalkanoate production, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 32(1), pp. 79-85.
53. Nguyễn Thị Đà, 2021, Báo cáo tổng hợp nghiệm thu đề tài “Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học tái tổ hợp sinh tổng hợp bioplastic từ phụ phẩm chế biến thủy sản”, mã số ĐT.08.19/CNSHCB thuộc Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020.
54. Geyer R et al, 2017, Production, use, and fate of all plastics ever made, *Sci. Adv*, 3(7), pp. 25–29.
55. Storz H and Vorlop KD., 2013, Bio-based plastics: status, challenges and trend, *Landbauforsch·Appl Agric Forestry Res*, 4 (63), pp. 321-332.
56. Rudin A and Choi P., 2013, In The Elements of Polymer Science & Engineering, Elsevier, pp. 521–535.
57. Dhangdhariya JH, Dubey S, Trivedi HB, et al. Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's dry sea mix as a novel growth medium. *Int J Biol Macromol*. 2015;76(p):254–261
58. Huu Phong T et al., 2016, Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by *Yangia* sp. ND199 from different carbon sources, *Int J Biol Macromol*, 84, pp. 361-366.
59. Doan VT, Quillaguamán J., 2014, Improving culture conditions for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Bacillus* sp. ND153, a

- bacterium isolated from a mangrove forest in Vietnam, *Ann Microbiol*, 64(3), pp. 991-997.
60. Trần Hữu Phong et al, 2015, Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) của chủng vi khuẩn MT33 phân lập từ nước thải, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 53(4), tr. 408-417.
 61. Thuoc DV, Anh VT, 2021, Bioconversion of Crude Fish Oil Into Poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia* sp. M91, *Appl Biochem Microbiol*, 57, pp. 219–225. 15
 62. Van Thuoc D et al, 2019, Utilization of waste fish oil and glycerol as carbon sources for polyhydroxyalkanoate production by *Salinivibrio* sp. M318, *Int J Biol Macromol*, 41, pp. 885-892.
 63. Phạm Thanh Hà, 2010, Báo cáo tổng hợp nghiệm thu đề tài Nghiên cứu tìm nguồn nguyên liệu rẻ tiền cho việc sản xuất hiệu quả polymer sinh học (PHB) từ chủng vi khuẩn đột biến *Alcaligenes latus*, Đề tài cấp VAST 2008-2009.
 64. Hoàng Thị Lan Anh et al, 2018, Khả năng sinh tổng hợp pyruvate và poly-(3-hydroxybutyrate) của vi khuẩn ưa mặn phân lập từ rừng ngập mặn Giao Thủy, Nam Định, *Tạp chí Sinh học*, 40(2), tr. 184–192.
 65. Nguyễn Thị Đà, Nguyễn Trọng Linh, Nguyễn Thu Trang, Trần Mạnh Hải, Lê Thị Huyền, 2020, *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, 3(3), tr. 165-172.
 66. Hartman TL., 1940, The use of Sudan black B as a bacterial fat stain, *Stain, Technol*, 15, pp. 23–28.
 67. Spiekermann P., Rehm BH., Kalscheuer R., Baumeister D., Steinbüchel A., 1999, A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds, *Arch Microbiol*, 171(2), pp. 73-80.
 68. Mascarenhas J., Aruna K., Rep. 2021, Production and Optimization of Polyhydroxyalkanoate Obtained from *Bacillus megaterium* JHA, *J.Appl. Biotechnol*, 8, pp. 346–360.
 69. Law JH., Slepecky RA., 1961, Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid, *J Bacteriol*, 82(1), pp. 33-6.
 70. Duvigneau S., Kettner A., Carius L., Griehl C., Findeisen R., Kienle A., 2021, Fast, inexpensive, and reliable HPLC method to determine monomer fractions in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(11), pp. 4743-4749.
 71. Frank JA., Reich CI., Sharma S., Weisbaum JS., Wilson BA., and Olsen GJ., 2008, “Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes”, *Appl. Environ. Microbiol*, Vol 74, pp. 2461–2470.

72. Cavallo RA., Rizzi C., Voza T., Stabili L., 1999, Viable heterotrophic bacteria in water and sediment in 'Mar Piccolo' of Taranto (Ionian Sea, Italy), *Journal of Applied Microbiology*, 86, pp. 906–916.
73. Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. and Thingstad, F. (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* 10, 257–263;
74. Bianchi, A. and Garcin, J., 1993, In stratified waters the metabolic rate of deep-sea bacteria decreases with decompression, *Deep Sea Research*, 40, pp. 1703–1710.
75. Goudarztalejerdi A., Tabatabaei M., Eskandari MH., Mowla D., Iraj A., 2015, Evaluation of bioremediation potential and biopolymer production of pseudomonads isolated from petroleum hydrocarboncontaminated areas, *Int J Environ Sci Technol*, 12(9), pp. 2801-2808.
76. Bora L., 2012, Polyhydroxybutyrate production accumulation in *Bacillus megaterium* and optimization of process parameters using response surface methodology, *J. Polym. Environ.*, 21, pp. 415-420.
77. Valappil, S.P., A.R. Boccaccini, C. Bucke and I. Roy, 2007a, Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insight from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, pp. 1-17.
78. Sneha P., Changam SS., Balakumuran MD., 2017, Optimization, purification and characterization of Polyhydroxybutyrate(PHB) produced by *Bacillus cereus* isolated from sewage, *Intern J ChemTech Res*, 10(7), pp. 884-904.
79. Rehman AU., Aslam A., Masood R., Aftab MN., Ajmal R., Haq IU., Production and characterization of a thermostable bioplastic (Poly-b-hydroxybutyrate) from *Bacillus cereus* NRRL-B-3711, *Pak J Bot*, 48(1), pp. 349-356.
80. Khamkong T., Penkhrue W., Lumyong S., 2022, Optimization of Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Newly Isolated *Ensifer* sp. Strain HD34 by Response Surface Methodology, *Processes* 2022, 10, pp. 1632.
81. Zihayat B., Shakibaie M., Sabouri-Shahrbabak S., Doostmohammadi M., Ameri A., Adeli-Sardou M., Forootanfar H., 2019, Medium optimization for polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain Te using D-optimal design. *Biocatal, Agric. Biotechnol*, 18, pp. 101001.
82. Thapa C., Shakya P., Shrestha R., Pal S., Manandhar P., 2018, Isolation of polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria, optimization of culture conditions for PHB production, extraction and characterization of PHB, *Nepal J. Biotechnol*, 6, pp. 62–68.

83. Jiang Y., Marang L., Kleerebezem R., Muyzer G., van Loosdrecht MC., 2011, Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor, *ISME J.* 2011, 5(5), pp. 896-907.
84. Dubey S., Mishra S., 2021, Efficient Production of Polyhydroxyalkanoate Through Halophilic Bacteria Utilizing Algal Biodiesel Waste Residue, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9, pp. 624859.
85. Pomeroy LR., Wiebe WJ., 2001, Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria, *Aquat Microb Ecol* 2001, 23, pp. 187-204.
86. Chisti Y., 2014, Fermentation (industrial), Basic considerations, *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 751-761.
87. Myshkina VL., Nikolaeva DA., Makhina TK., Bonartsev AP., Bonartseva GA., 2008, Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B, *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 44(5), pp. 533-538.
88. Huong KH., Azuraini MJ., Aziz NA., Amirul AA., 2017 Jul, Pilot scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) biopolymers with high molecular weight and elastomeric properties, *J Biosci Bioeng*, 124(1), pp. 76-83.
89. Chozhavendhan S., Kumar RP., Elavazhagan S., Barathiraja B., Jayakumar M., Varjani SJ., 2018, Utilization of crude glycerol from biodiesel S industry for the production of value-added bioproducts, Singhanian R., Agarwal R., Kumar R., Sukumaran R. (Eds.), *Waste to Wealth. Energy, Environment, and Sustainability*, 978-981-10-7430-1, Springer, Singapore: pp. 65-82
90. Li Y., Yang S., Jin D., Jia X., 2020, Optimization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas putida* KT2440 from co-metabolism of glycerol and octanoate, *The Canadian Journal of Chemical engineering*, 99(3), pp. 657-666.
91. Das M., Grover A., 2022, Fermentation optimization and mathematical modeling of glycerol-based microbial poly(3-hydroxybutyrate) production, *Process. Biocheml*, 71, pp. 1-1.
92. Koller M., Obruča S., 2022, Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates from glycerol: A review. 2022, *Biocatalysis and agricultural biotechnology* 2022 v, 42, pp. 102333.
93. Grubelnik A., Wiesli L., Furrer P., Rentsch D., Hany R., Meyer VR., 2008, A simple HPLC-MS method for the quantitative determination of the composition of bacterial medium chain-length Polyhydroxyalkanoates, *J Sep Sci*, 31, pp. 1739–1744.

94. Hong K., Sun S., Tian W., Chen GQ., Huang W., 1999, A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 51, pp. 523–526.
95. Policastro G., Panico A., Fabbicino M., 2021, Improving biological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) co-polymer: a critical review, *Rev Environ Sci Biotechnol*, 20, pp. 479–513.
96. Balakrishna Pillai A., Jaya Kumar A., Kumarapillai H., 2020, Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) in *Bacillus aryabhattai* and cytotoxicity evaluation of PHBV/poly(ethylene glycol) blends, *3 Biotech*, 10, pp. 1–10.
97. Van-Thuoc D., Huu-Phong T., Thi-Binh N., Thi-Tho N., Minh-Lam D., Quillaguamán J., 2012, Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in Northern Vietnam, *Microbiologyopen*, 1(4), pp. 395-406.
98. Bergey D. H., Whitman W. B., De Vos P., Garrity G. M., Jones D., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol. 3*. New York: Springer.
99. Kim M., Chun J., 2014, Chapter 4 - 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server, *Methods in Microbiology*, 41, pp. 61-74.
100. Liu W, Li L., Khan MA., Zhu F., 2012, Popular molecular markers in bacteria, *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 2021(3), pp.14-7.
101. M. Singh, S. K. Patel, and V. C. Kalia, 2009, “*Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates”, *Microbial Cell Factories*, vol. 8, no. 1, pp. 38.
102. A. Rodríguez Contreras, M. Koller, M. Miranda de Sousa Dias, M. Calafell Monfort, G. Brauneegg, and M. S. Marqués Calvo, 2013, “High production of poly (3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain”, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 114, no. 5, pp. 1378-1387.
103. S. Mohapatra et al., 2017, “*Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges”, *Biochemistry and Biophysics Report*, vol. 12, pp. 206-213.
104. V. Gowda and S. Shivakumar, 2014, “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.
105. M. Thirumala, S. V. Reddy, and S. K. Mahmood, 2010, “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.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 1.6

>4575970__1_6_27F

GCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTT
CGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGAT
GATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCAT
TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTG
TTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTA
CCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGG
CGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCTC
ATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCAC
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGGCTTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
CTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTCTAGAGATAGAG
CGTTCCCCTTCGGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAG
CTCGTGTC

Phụ lục 2: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 5.3

>4575971_5_3_27F

GCAAGTCGAGCGAATGAATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGT
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTG
GGATAACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGCACCGC
ATGGTGCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCC
GCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGT
AAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACC
GTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGT
GGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAA

CGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA
 AGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTA
 GAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTG
 TCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG

Phụ lục 3: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 5.6

>4575972_5_6_27F

ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC
 GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT
 AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGG
 TTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG
 CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTA
 GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
 TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAG
 CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTG
 ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGC
 TCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG
 GAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA
 ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
 GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
 GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
 GAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC
 ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
 GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGA
 GATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
 GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
 CCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCANTCTAAGTGACTGCCGG
 TGACAACCGGAGGAAGGGGGGATGACGTCAATCATCATGCCCTTATGAC
 TGGGCT

Phụ lục 4: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 6.2

>4575973_6_2_27F

TGCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGA
 CGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGA
 CTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCC
 TTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTTCCGGCTATCACTTACAGATGGG
 CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG
 ATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG

ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGG
 TCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCG
 TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
 GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA
 AAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCA
 ACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAA
 AGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGA
 AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGC
 TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT
 CAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
 TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAC
 TCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCA
 TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGT
 GACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGGGGGGATGACGTCAATCATCAT
 GCCCCTTATGACTGGGCTACCACGTGCTACATG

Phụ lục 4: Trình tự gen 16s RNA của chủng 6.5

>4575974_6_5_27F

TAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGT
 TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTG
 GGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTC
 ATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCC
 GCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG
 CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
 AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGT
 AAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACC
 TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
 GCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
 TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
 GTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGC
 GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACG
 ATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAAC
 GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAA
 GGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
 AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTCTAG
 AGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGATGGTT
 GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
 CCGGTGACAACCGG

Phụ lục 6: Trình tự gen 16S rRNA của chủng 6.6

>4575975_6_6_27F

TGCAAGTCGAGCGAATGAATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAAC
 TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGCACCGCATGGTGC
 GAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGC
 ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCC
 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTA AAACTCT
 GTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGG
 TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCA
 GGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGAGGG
 TCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCC
 ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGA
 AGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA
 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
 TAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAG
 CACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAAC
 GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAG
 GGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG
 ATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
 CCTGGGCTACC



BÁO CÁO KHOA HỌC

HỘI NGHỊ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TOÀN QUỐC 2022

PROCEEDINGS

OF VIETNAM NATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY 2022

HÀ NỘI - 2022

MỤC LỤC

CÔNG NGHỆ GEN VÀ PROTEIN

1. TẠO DÒNG GEN, DỰ ĐOÁN CẤU TRÚC VÀ TÍNH CHẤT CỦA ENZYME ENDO- β -1,3-1,4-GLUCANASE TỪ <i>Paenibacillus polymyxa</i> AT4. Hoàng Tấn Quảng, Trần Thị Ngọc Trâm, Trần Thủy Lan, Nguyễn Thị Khánh Quỳnh, Trương Thị Phương Lan, Phạm Thị Diễm Thi	3
2. HOMOLOGY MODELING, MOLECULAR DOCKING AND SITE DIRECTED MUTAGENESIS OF PUTATIVE UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE FROM <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 USING GENISTEIN AS AN ACCEPTOR. Luan Luong Chu, My Linh Quyen, Jae Kyung Sohng, Nguyen Quang Huy	9
3. BIỂU HIỆN PROTEIN CHALCONE SYNTHASE (CHS) NGUỒN GỐC SÂM TÓ NỮ TRONG <i>E. coli</i> . Huỳnh Thị Thu Huệ, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Xuân Cảnh	15
4. THIẾT KẾ CẤU TRÚC TI- PLASMID CHỨA GEN MÃ HÓA DEACETYL VINDOLINE-4-O-ACETYLTRANSFERASE (DAT). Huỳnh Thị Thu Huệ, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Trần Thị Hương Giang, Nguyễn Thị Kim Liên, Trần Văn Tuấn, Nguyễn Huy Hoàng	21
5. NGHIÊN CỨU PHÂN BIỆT LAN HẢI HECMAN (<i>Paphiopedilum hermannii</i>) VÀ HẢI COCCI (<i>Paphiopedilum coccineum</i>) BẰNG HÌNH THÁI VÀ CHỈ THỊ PHÂN TỬ. Nguyễn Thị Hải Yến, Vũ Thanh Sắc, Ngô Xuân Quảng, Nguyễn Thị Loan, Đỗ Tiến Phát, Chu Hoàng Mậu	27
6. ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ DNA BARCODE TRONG PHÂN TÍCH DI TRUYỀN CÂY DƯỢC LIỆU TAM THẤT BẮC (<i>Panax notoginseng</i>) VÀ TAM THẤT HOANG (<i>Panax stipuleanatus</i>). Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Nguyễn Thị Mỹ Linh, Huỳnh Hữu Đức	35
7. ĐẶC ĐIỂM TRÌNH TỰ ĐOẠN GEN <i>matK</i> VÀ <i>rbcL</i> CỦA CÂY VÚ BÒ (<i>Ficus simplicissima</i> LOUR.). Hoàng Phú Hiệp, Vũ Văn Trung, Lục Văn Dương, Nguyễn Thị Thu Hà, Vũ Thị Thu Thủy, Chu Hoàng Mậu	42
8. NGHIÊN CỨU CHỈNH SỬA GEN <i>elF4E</i> Ở CÂY DƯA LEO (<i>Cucumis sativus</i> L.) BẰNG CÔNG NGHỆ CRISPR/CAS9. Nguyễn Thị Thanh Thảo, Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa, Nguyễn Thị Kim Thoa, Nguyễn Xuân Dũng	48
9. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN BIỆT MỘT SỐ DÒNG TRÀ HOA VÀNG (<i>Camellia</i> spp.) Ở VIỆT NAM BẰNG MÃ VẠCH DNA <i>rbcL</i> VÀ <i>trnH-psbA</i> . Nguyễn Thị Hương, Phạm Viết Thuận, Trần Thị Mộng Thi, Nguyễn Lâm Bảo Nghi, Nguyễn Thị Thu Nguyên, Nguyễn Minh Phương, Hồ Viết Thế	57
10. BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH TIỂU PHẦN N CỦA PROTEIN GLYPICAN 3 (GPC3-Nsub) DẠNG THỂ VUI TRÊN <i>Escherichia coli</i> . Ngô Lương Đăng Thức, Hoàng Ngọc Phương Mai, Nguyễn Đăng Quân, Võ Nguyễn Thanh Thảo	62
11. TÁCH CHIẾT COLLAGEN TỪ DA NGỰA. Phạm Thị Huệ, Bùi Thị Huyền, Phan Văn Chi, Lê Thị Bích Thảo	69
12. CLONING AND EXPRESSION OF NON-STRUCTURAL PROTEIN 1 (NS1) OF DENGUE VIRUS TYPE 4 IN <i>Escherichia coli</i> . Truong Quoc Phong, Nguyen Thi Bích Ngọc, Ngo Thu Huong	75
13. CODON OPTIMIZATION FOR EXPRESSION OF RECOMBINANT SARS-COV-2 NUCLEOCAPSID PROTEIN IN <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3). Truong Quoc Phong, Nguyen Thi Hien, Ngo Thu Huong	82
14. NHẬN DÒNG VÀ BƯỚC ĐẦU BIỂU HIỆN CHUỖI NHE BONT/A VÀ BONT/B TỪ CHỦNG <i>Clostridium botulinum</i> PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM. Khuất Hoàng Thủy Linh, Trần Thị Minh Nguyệt, Phạm Bảo Yên	88
15. XÂY DỰNG QUY TRÌNH REAL-TIME RT-PCR PHÁT HIỆN VIRUS MARBURG. Nguyễn Thị Thu Hoài, Nguyễn Thị Nga, Bùi Liêm Chính, Bùi Nguyên Hải, Vương Thanh Hương, Phùng Huyền Nhung, Phạm Thị Thu Hương, Trần Trọng Hội, Trần Thị Hạnh, Nguyễn Thị Thanh Huyền, Nguyễn Minh Anh, Lê Quang Hòa	94
16. HIỆU QUẢ LIÊN KẾT CỦA PROTEIN GAI CỦA CÁC BIẾN THỂ OMICRON TẠI VIỆT NAM. Huỳnh Phước, Lê Thị Yến, Nguyễn Thị Thương Huyền, Thái Kế Quân	101
17. MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN VÀ VAI TRÒ CỦA MỘT SỐ GEN YẾU TỐ PHIÊN MÃ VỚI TÍNH TẬP CHỐNG CHỊU LẠNH ẤM TRONG GIAI ĐOẠN SƠM Ở CÂY <i>Arabidopsis thaliana</i> . Lê Quỳnh Mai	107
18. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM TRONG HẤP PHỤ CỦA PROTEIN LÊN HẠT SILIC HỮU CƠ XÓP MESO. Hồ Mỹ Dung, Lê Thị Minh Phương, Vũ Thị Thơm, Lê Thị Hiền	113
19. TẠO DÒNG VI KHUẨN <i>Bacillus subtilis</i> MANG GEN MÃ HOÁ UREASE A TỪ CHỦNG LÂM SÀNG <i>Helicobacter pylori</i> . Nguyễn Thị Kim Cúc, Phạm Thị Lan, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Văn Duy	119
20. ĐẶC ĐIỂM TRÌNH TỰ GEN <i>trnL</i> PHÂN LẬP TỪ MẪU CÂY THUỘC CHI CẨM CÙ PHỤC VỤ MỤC ĐÍCH ĐỊNH DANH LOÀI. Nguyễn Thị Thu Nga, Hoàng Phú Hiệp, Manivanh Yongsas, Nguyễn Đức Hùng	125
21. TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN <i>AtRSMD</i> Ở CÂY <i>Arabidopsis thaliana</i> TRONG TẾ BÀO CHỦ <i>Escherichia coli</i> . Lê Nguyễn Tiểu Ngọc	131
22. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TƯƠNG TÁC CỦA PEPTIDE CO1 NHẪM ĐỊNH HƯỚNG TẾ BÀO M VỚI THỤ THỂ C5AR BẰNG PHƯƠNG PHÁP DOCKING PHÂN TỬ. Lê Mạnh Liêm, Đinh Thuận Thiên, Trần Văn Hiếu	138

152. NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN CHẤT LƯỢNG TRÀ TÚI LỘC HOA DÂM BỤT (<i>Hibiscus rosa sinensis</i> L.). Trần Thị Thanh Hương	990
153. ĐỊNH DANH, ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ MẪU NẤM LINH CHI ĐỎ (<i>Ganoderma</i> spp.) TRÊN THỊ TRƯỜNG VIỆT NAM. Nguyễn Thiên Ngân, Lê Thanh Nhà, Đinh Minh Hiệp	996
154. KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CAO CHIẾT TỪ HẠT HẠI LOÀI ỚT THUỘC CHI <i>CAPSICUM</i> PHÂN BỐ TẠI ĐẮK LẮK, VIỆT NAM. Lâm Khắc Kỳ, Lê Thị Thanh Tuyền, Thái Duy Toàn, Lưu Thị Ánh Nguyệt, Đinh Minh Hiệp	1004
155. KHẢO SÁT SINH TRƯỞNG MỘT SỐ DÒNG XOAN TA CHUYỂN GEN GS1 TRONG ĐIỀU KIỆN NITROGEN KHÁC NHAU. Ong Xuân Phong, Lý Khánh Linh, La Việt Hồng, Phạm Bích Ngọc	1011

CÔNG NGHỆ VI SINH VÀ MÔI TRƯỜNG

156. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI TẢO BIỂN DỊ DƯỞNG <i>Aurantiochytrium</i> sp. SC145 PHÂN LẬP TỪ VÙNG BIỂN ĐẢO SƠN CA, QUẦN ĐẢO TRƯỜNG SA, VIỆT NAM. Lê Thị Thơm, Nguyễn Cẩm Hà, Ngô Thị Hoài Thu, Hoàng Thị Minh Hiền, Vũ Thị Loan, Nguyễn Trọng Dân, Đặng Diễm Hồng	1019
157. HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VÀ NẤM CỦA 2 CHỦNG <i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>) <i>platensis</i> DL VÀ TL CỦA VIỆT NAM. Nguyễn Mạnh Đạt, Lê Anh Huy, Trịnh Thị Hiền, Nguyễn Thành Vinh, Trịnh Đình Khá, Cao Thị Huệ, Đặng Diễm Hồng	1026
158. LỰA CHỌN MÔI TRƯỜNG NUÔI THÍCH HỢP CHO NHÂN NUÔI CHỦNG <i>Spirulina platensis</i> ST CHỊU MẶN DƯỚI ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM VÀ PILOT. Đặng Diễm Hồng, Lê Thị Thơm, Nguyễn Cẩm Hà, Lê Anh Huy, Hoàng Thị Minh Hiền, Lưu Thị Tâm, Ngô Thị Hoài Thu	1033
159. TIỀM NĂNG KHÁNG KHUẨN VÀ PROBIOTIC CỦA VI KHUẨN <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> TNU_BD001 PHÂN LẬP TỪ NEM CHUA TẠI THÀNH PHỐ BUỒN MA THUỘT. Trần Thị Ngọc, Huỳnh Thị Hoa, Wang San Lang, Đoàn Chiến Thắng	1040
160. PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI SINH VẬT PHÂN GIẢI PROTEIN VÀ LIPID ĐỂ TẠO CHẾ PHẨM EM-TA LÊN MEN PHÉ PHỤ PHẨM CÁ TRA. Vũ Thị Lan Anh, Võ Thị Kiều Thanh, Phan Thị Kiều, Nguyễn Hữu Phúc, Nguyễn Duy Tân, Trần Thanh Thuận	1047
161. TÁCH CHIẾT VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG β -GLUCAN TỪ NẤM BÀO NGƯ XÁM (<i>Pleurotus ostreatus</i>). Võ Thị Kiều Thanh, Vũ Thị Lan Anh, Nguyễn Duy Tân, Trần Thanh Thuận	1055
162. NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN CHẾ PHẨM VI KHUẨN <i>Bacillus velezensis</i> ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM <i>Cercospora arachidicola</i> GÂY BỆNH ĐOM NẤU TRÊN LẠC. Lê Thanh Khang, Trần Yên Thảo	1061
163. ISOLATING ENDOPHYTIC <i>STREPTOMYCES</i> SPP. FROM THE ROOT OF <i>Houttuynia cordata</i> AND EVALUATING THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITIES. Nguyen Thi Quynh Nhu, Duong Bao Chau, Le Thi Phuong Thuy, Nguyen Thi Thu Hoai	1068
164. PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG THỰC KHUẨN THỂ LY GIẢI VI KHUẨN <i>Vibrio parahaemolyticus</i> GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP Ở TÔM. Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Đình Duy, Phạm Thị Lành, Đinh Duy Kháng, Đồng Văn Quyền	1075
165. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA SINH KHỐI TẢO LAM <i>Spirulina platensis</i> ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ SẢN SINH AXIT LACTIC CỦA <i>Lactobacillus acidophilus</i> . Nguyễn Thị Minh, Ngô Thị Hoài Thu, Tô Linh Hằng, Chu Nhật Huy, Đào Thị Ngọc Ánh, Trần Xuân Khôi, Hoàng Phương Hà	1081
166. XÁC ĐỊNH CÁC NHÓM VI SINH VẬT TRONG ĐẤT RỪNG PHÂN BỐ LAN HẢI ĐÀI CUỐN (<i>Paphiopedilum appletonianum</i> (Gower) Rolfe) VÀ CÁC CHỦNG CÓ HOẠT TÍNH CELLULASE CAO. Nguyễn Thế Trang, Hoa Thị Minh Tú, Phan Thị Tuyết Minh, Nguyễn Văn Sinh, Bùi Văn Thanh, Nguyễn Thị Vân Anh, Lê Anh Thư	1087
167. TUYỂN CHỌN VÀ NHÂN NUÔI VI KHUẨN NỘI SINH CÂY CÀ PHÊ VỚI CÓ HOẠT TÍNH PHÂN GIẢI PHOSPHATE KHÓ TAN, KHÁNG NẤM <i>Fusarium</i> VÀ <i>Rhizoctonia</i> . Ngô Văn Anh, Trần Thị Hà Trang, Nguyễn Anh Dũng	1094
168. OPTIMIZATION OF <i>ESCHERICHIA COLI</i> DNA EXTRACTION FOR THE ZNS NANOMATERIAL-BASED OPTICAL BIOSENSOR APPLICATIONS. Phan Kim Thi Vu, Mai Thi Tran	1100
169. ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH BỀ MẶT TẾ BÀO CỦA <i>Pichia kudriavzevii</i> YGM091- SÀNG LỌC TỪ CÁC CHỦNG NẤM MEN PHÂN LẬP TRONG SỮA DẺ LÊN MEN. Trần Kim Diệp, Võ Hoài Hiếu, Đinh Thị Thanh Vy, Nguyễn Huỳnh Kim Thoa, Nguyễn Hồng Hoàng, Võ Hà Tuyết Hạnh, Phan Nhã Hòa	1106
170. BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG <i>Saccharomyces boulardii</i> ĐỂ TẠO SẢN PHẨM PROBIOTIC TỪ NƯỚC ÉP HOA BỤP GIẤM (<i>Hibiscus sabdariffa</i>). Huỳnh Phan Phương Trang, Đỗ Thị Hiền	1112
171. PHÂN LẬP VI KHUẨN SINH CELLULOSE TỪ KOMBUCHA VÀ GIẤM NUÔI. Nguyễn Quỳnh Thy, Đỗ Thị Hoàng Tuyền	1119
172. NGHIÊN CỨU LÊN MEN <i>Bacillus siamensis</i> CP36 BẰNG NGUỒN PHỤ PHẨM THỦY SẢN TẠO SẢN PHẨM CHỨA CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỨC ĐẦY TĂNG TRƯỞNG VÀ SẢN LƯỢNG ỚT. Trần Thị Hà Trang, Ngô Văn Anh, Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Anh Dũng, Nguyễn Văn Bốn	1124

173. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG ĐẾN SINH TRƯỞNG CỦA <i>Chlorella sorokiniana</i> PHÂN LẬP TỪ NGUỒN NƯỚC THẢI CHĂN NUÔI HEO. Trần Tuấn Anh, Võ Thị Minh Thảo, Nguyễn Minh Khánh, Nguyễn Ngọc Phi, Phạm Thị Ái Niệm, Nguyễn Hoàng Sơn, Nguyễn Thị Thùy Dương, Lê Ngọc Cẩm, Nguyễn Thị Thảo Nguyên, Nguyễn Văn Tường, Phạm Nguyễn Pha Lê, Nguyễn Tử Minh, Hà Thị Loan.....	1130
174. PHÂN LẬP, CHỌN LỌC VÀ NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN LÊN MEN THÍCH HỢP CỦA CHỦNG GIẢ NẤM MEN SINH TỔNG HỢP POLYSACCHARIDE NGOẠI BẢO. Đặng Thị Hà Thu, Vũ Văn Hạnh, Nguyễn Thị Nguyệt, Nguyễn Thị Quỳnh Mai	1136
175. PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG <i>Bacillus</i> KHÁNG NẤM GÂY NHÓT BẠT TRONG AO NUÔI TÔM. Vũ Văn Hạnh, Đỗ Thị Lý, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Thị Nguyệt	1142
176. TUYỂN CHỌN VÀ NHÂN NUÔI VI KHUẨN <i>Bacillus</i> ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN <i>Aeromonas</i> sp. GÂY BỆNH TRÊN CÁ NƯỚC NGỌT. Nguyễn Thị Tuyền, Vũ Văn Hạnh, Nguyễn Thị Nguyệt.....	1149
177. PHÂN LẬP VÀ CHỌN LỌC CHỦNG <i>Bacillus</i> CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN TỪ RUỘT ĐỘNG VẬT BIỂN. Hoàng Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Vũ Văn Hạnh	1156
178. GROWTH CHARACTERISTICS ON CHITIN MONOMER OF <i>VIBRIO NATRIEIGENS</i> N5.3 ISOLATED FROM VIETNAMESE SEAWATER. Le Tuan, Vu Thi Kieu Oanh, Nguyen Tung Lam, Nguyen Tuan Viet, Cao Tran Ha Trang, Le Thanh Ha	1164
179. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI THUỐC TRỪ SÂU PROFENOFOS CỦA VI KHUẨN <i>Pseudomonas resinovorans</i> NM2 SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP HỆ THỐNG SẮC KÝ LỒNG GHÉP KHÓI PHỔ UPLC-MS/MS. Võ Thị Minh Thảo, Nguyễn Minh Khánh, Nguyễn Thị Hồng Nhung, Lê Huỳnh Tường Vi, Trần Tuấn Anh, Phạm Thị Ái Niệm, Nguyễn Ngọc Phi, Nguyễn Thị Hạnh Nguyên, Phạm Thị Phương Duyên, Phan Quang Hương, Hà Thị Loan.....	1170
180. NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN HẤP PHỤ KIM LOẠI ĐỒNG HIỆU QUẢ CỦA NẤM MEN <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PHÂN LẬP TẠI KHU VỰC KHAI THÁC THAN Ở QUẢNG NINH. Đoàn Thái Nhật Quang, Hồ Thị Xuân Túy, Đường Văn Hiếu, Lê Công Tuấn, Nguyễn Thị Kim Cúc, Nguyễn Văn Phú	1179
181. NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG DỊCH THỦY PHÂN PROTEIN THU HỒI TỪ PHÉ LIỆU TÔM TRONG SẢN XUẤT NƯỚC MẮM. Vũ Thị Kiều Oanh, Vương Huệ Hương, Lương Thị Hồng Nghiên, Nguyễn Tiến Thành, Lê Thanh Hà	1185
182. INVESTIGATING THE POTENTIAL MICROORGANISM FOR SOIL IMPROVEMENT USING A MODEL OF GLASS GRANULES. Nguyen Pham Huong Huyen, Nguyen Ngoc Tri Huynh, Nguyen Khanh Son, Pham Minh Tuan	1191
183. NGHIÊN CỨU TĂNG CƯỜNG BIỂU HIỆN GEN <i>phaC</i> VÀ GEN <i>phaR</i> NÂNG CAO KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP POLYHYDROXYBUTYRATE CỦA CHỦNG <i>Bacillus megaterium</i> DV01. Nguyễn Thị Đà, Nguyễn Thu An, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Trọng Linh, Trần Mạnh Hải	1196
184. KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN THỦY PHÂN PROTEIN TỪ PHÉ LIỆU TÔM ỨNG DỤNG COLORPROTEASE P200. Lê Thanh Hà, Vương Huệ Hương, Vũ Thị Kiều Oanh, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Quách Ngọc Tùng, Phí Quyết Tiến.....	1203
185. TUYỂN CHỌN VÀ PHÂN LOẠI CHỦNG VI KHUẨN LACTIC CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CYANUA. Vũ Thị Hạnh Nguyên, Lê Phương Chi, Phạm Quỳnh Anh, Quách Ngọc Tùng, Lê Thị Thanh Xuân, Nguyễn Trần Mai Anh, Phí Quyết Tiến	1209
186. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÝ SINH <i>Spodoptera litura</i> VÀ <i>Cylas formicarius</i> CỦA NẤM <i>Beauveria bassiana</i> . Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Trần Thủy Trang, Nguyễn Thị Thùy Dương, Trần Thị Phấn, Đinh Anh Hòa	1216
187. PHÂN LOẠI VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TIỀN XỬ LÝ DẶM MÀNH GỖ KEO CỦA CHỦNG NẤM <i>Microporus</i> sp. MS2 ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT BỘT CELLULOSE HÒA TAN. Nguyễn Thị Hồng Liên, Trần Thị Hương, Ngô Văn Hữu, Phan Huy Hoàng, Phan Thị Hồng Thảo	1222
188. NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH TẠO CHẾ PHẨM VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM <i>Rhizobium tropici</i> QN3-R3 TRÊN NỀN CHẤT MANG TỪ PHỤ PHẨM NÔNG NGHIỆP. Nguyễn Thị Hạnh Nguyên, Nguyễn Minh Khánh, Võ Thị Minh Thảo, Phạm Thị Phương Duyên, Trần Kim Thảo, Bùi Hòa My, Nguyễn Tấn Đức, Phan Quang Hương.....	1228
189. PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM CÓ KHẢ NĂNG CHỊU MẶN VÀ SINH TỔNG HỢP ENZYME Ở VÙNG ĐẤT NÔNG NGHIỆP TỈNH BẾN TRE. Trần Đức Long, Thi Thanh Thắng, Võ Trần Quốc Thắng, Lê Phước Thọ, Trương Phước Thiên Hoàng	1236
190. NGHIÊN CỨU HỆ VI SINH VẬT PHÂN GIẢI CARBAZOLE LÀM GIÀU TỪ ĐẤT NHIỄM DIOXIN TẠI SÂN BAY BIỂN HÒA, VIỆT NAM. Phạm Thị Huệ, Ngô Thị Thúy Hoàng, Nguyễn Quốc Định, Nguyễn Kim Nữ Thảo, Nguyễn Hồng Minh.....	1242
191. XÁC ĐỊNH ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHỦNG <i>Bacillus</i> ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ HÀM LƯỢNG TINH DẦU CÂY BẠC HÀ (<i>Mentha arvensis</i> L.) TRONG ĐIỀU KIỆN VƯỜN ƯƠM. Trịnh Thị Huyền Trang, Nguyễn Thị Hồng Phúc, Ka Mai Hương, Nguyễn Thị Lài, Nguyễn Đăng Bảo An.....	1248
192. KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH CHỦNG <i>Bacillus aryabhatai</i> HBCM 0104 ỨNG DỤNG TRONG PHÂN HỦY SINH HỌC PACLOBUTRAZOL <i>IN VITRO</i> . Nguyễn Thị Hồng Chuyên, Phan Mỹ Hạnh, Lê Thị Thùy Nhi	1255
193. PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN LACTIC CÓ KHẢ NĂNG LOẠI BỎ CHOLESTEROL. Nguyễn Văn Toàn, Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Thị Thùy Trang, Huỳnh Lâm Diễm My, Trần Thị Phương Nhi, Đạo Nữ Diệu Hồng, Phạm Hải Sơn, Nguyễn Thị Dung.....	1261

194. ENHANCEMENT OF POLYSACCHARIDE KRESTIN PRODUCTION IN <i>Trametes versicolor</i> BY USING MICROPARTICLE ENHANCED CULTIVATION AND LEDS LIGHT COLORS. Nguyen Thao Anh, Nguyen Thi Lan Anh, To Kim Anh, Pham Tuan Anh	1268
195. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM GÂY HẠI CHI TIẾT KÍNH ỒNG NHÒM CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM KHÁNG NẤM. Ngô Cao Cường, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Đỗ Thị Thu Hồng, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Nguyễn Thu Hoài, Phí Quyết Tiến	1275
196. ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ PHÂN LOẠI CHŨNG NẤM <i>Trichoderma harzianum</i> C5.4 GÂY HẠI KÍNH QUANG HỌC. Nguyễn Thị Thanh Lợi, Ngô Cao Cường, Đỗ Thị Thu Hồng, Quách Ngọc Tùng, Phí Quyết Tiến	1281
197. NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CHŨNG VI KHUẨN BẮN ĐỊA NHÂM ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ NƯỚC THẢI NHÀ MÁY CỒN RỈ ĐƯỜNG. Trần Liên Hà, Nguyễn Hà Ngọc Anh, Nguyễn Văn Cách	1288
198. PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN, THU HỒI SINH KHÔI CÁC CHŨNG VI TẢO CÓ KHẢ NĂNG XỬ LÝ AMONIUM VÀ PHOSPHATE TRONG NƯỚC SAU NUÔI TÔM. Lê Hùng Anh, Đỗ Thị Thanh Thảo, Phan Thị Phương Trang	1295
199. SÀNG LỌC CÁC CHŨNG VI KHUẨN <i>Bacillus</i> spp. BIẾN SINH TỔNG HỢP POLYHYDROXYALKANOATE. Lại Thị Hồng Nhung, Phan Thị Tuyết Minh, Phạm Thị Trang, Đào Hải Yến, Nguyễn Kim Thoa	1302
200. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH TRƯỞNG VÀ SINH BẢO TỬ CỦA CÁC CHŨNG <i>Bacillus subtilis</i> MANG KHÁNG NGUYÊN UREASE CỦA <i>Helicobacter pylori</i> . Nguyễn Thị Chính, Nguyễn Yến Linh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thị Kim Cúc, Nguyễn Văn Duy	1308
201. KHẢO SÁT SỰ CÓ MẶT CỦA VI KHUẨN THUỘC NGÀNH <i>Chloroflexi</i> TRONG MÔI TRƯỜNG ĐẤT Ở VIỆT NAM. Vũ Thị Kim Phấn, Đàm Thúy Hằng	1315
202. NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN THỦY PHẦN HẦU (<i>Crassostrea gigas</i>) BẰNG PROTEASE ĐỂ THU SẢN PHẨM THỦY PHẦN CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA. Nguyễn Văn Khôi, Quẩn Lê Hà	1321
203. SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH SINH CHẤT GIỮ ẨM SINH HỌC TỪ VI KHUẨN PHÂN LẬP TẠI CÁC VÙNG KHÔ CẦN CỦA VIỆT NAM. Nguyễn Thị Lan Anh, Trần Thị Minh Hiền, Nguyễn Thị Nguyệt, Trương Thị Ánh Hồng, Vũ Mai Phương, Phạm Quang Huy, Đặng Thị Cẩm Hà	1328
204. NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA MỘT SỐ CHŨNG <i>Lactobacillus</i> sp. PHÂN LẬP TỪ SẢN PHẨM THỊT LÉN MEN TRUYỀN THÔNG CỦA VIỆT NAM. Hoa Thị Minh Tú, Tạ Thị Ngọc, Nguyễn Kim Thoa, Trần Thanh Thủy, Phan Thị Tuyết Minh, Nguyễn Thế Trang	1336
205. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CAROTENOID PRODUCING YEAST. Luu Thi Huyen, To Kim Anh, Pham Tuan Anh	1342
206. TỶ LỆ VI KHUẨN <i>Escherichia coli</i> MANG GEN KHÁNG COLISTIN <i>MCR-1</i> PHÂN LẬP Ở TRẺ EM BỊ TIÊU CHẢY TỪ 0 ĐẾN 5 TUỔI TẠI BỆNH VIỆN NHI ĐỒNG 1 THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH. Lê Thị Nga, Hoàng Hoài Phương, Hồ Hữu Tĩnh, Nguyễn Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Thanh Trúc, Lê Hồng Phúc, Phan Thị Phương Trang	1347
207. NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA VÀ KHÁNG KHUẨN <i>IN VITRO</i> CỦA CAO CHIẾT ETHANOL VỎ CHUỐI GIÀ (<i>Musa acuminata</i>). Trương Quốc Tắt, Nguyễn Duy Khánh	1352
208. ẢNH HƯỞNG CỦA VI NHŨ CHITOSAN-DẦU NEEM ĐẾN HIỆU QUẢ KHÁNG BỆNH SÂN RỄ CÂY HỒ TIÊU (<i>Piper nigrum</i> L.). Nguyễn Thị Như Quỳnh, Trần Thị Thu Phương, Nguyễn Đình Tứ, Dương Đức Hiếu	1358
209. KHẢO SÁT TIỀM NĂNG KÍCH THÍCH TĂNG TRƯỞNG THỰC VẬT CỦA MỘT SỐ CHŨNG VI KHUẨN <i>Asaia</i> sp. Trần Thị Thu Phương, Bùi Thị Thu Vân, Nguyễn Thị Như Quỳnh, Vũ Thị Lan Hương	1364
210. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NITƠ ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY CÁT Ô NHIỄM DẦU CỦA NẤM MEN <i>Candida</i> sp. NM1. Kiều Thị Quỳnh Hoa, Vương Thị Nga, Nguyễn Thị Yên, Nguyễn Thu Trà, Nguyễn Thị Mến, Nguyễn Thị Diễm Quỳnh, Nguyễn Xuân Cảnh	1371
211. PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CÁC CHŨNG VI KHUẨN VÀ VI TẢO TỪ NƯỚC AO NUÔI CÁ NƯỚC NGỌT CÓ TIỀM NĂNG CẢI THIỆN CHẤT LƯỢNG MÔI TRƯỜNG NƯỚC. Lê Hùng Anh, Trần Xuân Ngọc Ánh, Phan Thị Phương Trang	1377
212. PHÂN LẬP NẤM MỐC SINH PECTINASE TỪ MỘT SỐ VỎ QUẢ VÀ MẶT HOA DỪA TẠI TIỀN GIANG. Đoàn Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Thị Anh Thư	1385

SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus* spp. BIỂN SINH TỔNG HỢP POLYHYDROXYALKANOATE

Lại Thị Hồng Nhung¹, Phan Thị Tuyết Minh¹, Phạm Thị Trang², Đào Hải Yến³, Nguyễn Kim Thoa^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Polyhydroxyalkanoate (PHA) là một trong những loại nhựa sinh học thu nhận từ vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng rộng rãi. Việt Nam là một đất nước có bờ biển dài, do vậy cơ hội khai thác sự đa dạng và các hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật biển vô cùng lớn. Trong nghiên cứu này, một số chủng vi khuẩn biển phân lập từ vùng biển Khánh Hòa được sàng lọc khả năng tổng hợp PHA thông qua các phương pháp định tính và định lượng. Bằng phương pháp nhuộm khuẩn lạc và tế bào đã thu nhận được 6 chủng có khả năng tổng hợp PHA. Cả 6 chủng này có đặc điểm hình thái tế bào và trình tự gen 16S rRNA tương đồng cao với các loài thuộc chi *Bacillus*. Định lượng PHA trong tế bào của các chủng cho thấy chúng đều tích lũy được từ 21-44% so với trọng lượng khô của tế bào. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH và nhiệt độ cho thấy các chủng đều có khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA tốt ở nhiệt độ 37°C và pH 6-8. Những nghiên cứu bước đầu này cho thấy các chủng vi khuẩn Gram dương phân lập từ vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa có tiềm năng trở thành các nhà máy tế bào sản xuất nhựa sinh học.

Từ khóa: *Bacillus* spp., nhựa sinh học, PHA, vi khuẩn biển.

MỞ ĐẦU

Polyhydroxyalkanoate (PHA) là lớp polyester của các axit hydroxycarboxylic khác nhau, được tổng hợp bởi các loại vi sinh vật dưới dạng năng lượng dự trữ. Khi điều kiện sinh trưởng bị hạn chế do dư thừa carbon nhưng lại thiếu nguồn nitơ, photpho, lưu huỳnh, oxy, v.v thì vi sinh vật điều chỉnh các hoạt động trao đổi chất của chúng theo cách mà thay vì tuân theo chu trình axit tricarboxylic thông thường, acetyl-CoA được chuyển hướng sang tổng hợp PHA [1]. PHA mang các đặc tính cơ lý tương tự như các loại nhựa có nguồn gốc từ dầu mỏ nhưng ưu việt hơn vì có khả năng phân hủy sinh học, do đó chúng trở thành một trong những loại polymer có tiềm năng lớn để thay thế các loại vật liệu nhựa truyền thống. Hiện nay, PHA đã được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, y tế, dược phẩm, nông nghiệp v.v. [2, 3].

Với hơn 11000 km đường biển, Việt Nam là một trong những đất nước có mức độ đa dạng vi sinh vật biển cao, do đó việc bảo tồn và khai thác nguồn vi sinh vật ở hệ sinh thái này còn có nhiều tiềm năng phát triển. Một số nghiên cứu trong nước cũng đã tập trung vào nhóm các chủng vi sinh vật chịu mặn tổng hợp PHA. Trong các công bố trong nước, các tác giả đã có những nghiên cứu về các chủng vi khuẩn chịu mặn tổng hợp PHA phân lập ở rừng ngập mặn các tỉnh Nam Định, Quảng Ninh, Cần Giờ hoặc từ các bể làm mắm, vựa muối tại các địa phương như các chủng *Yangia* sp. ND218, *Salinivibrio* sp M318, *Ralstonia* sp M19, *Bacillus* sp. ND153, v.v [4-6]. Phần lớn các chủng vi khuẩn biển được tuyển chọn thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành tuyển chọn các chủng vi khuẩn Gram dương phân lập từ vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa có khả năng tích lũy nhựa sinh học PHA nhằm góp phần đa dạng nguồn giống vi sinh vật phục vụ cho các công trình nghiên cứu PHA. Bên cạnh đó, nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố như pH, nhiệt độ lên quá trình lên men các chủng tuyển chọn cũng được thực hiện nhằm nâng cao hiệu quả tổng hợp nhựa.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các chủng vi khuẩn: Tập hợp 20 chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu nước biển, mẫu trầm tích vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa thuộc bộ sưu tập chủng giống của Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học.

Môi trường nuôi cấy: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng đặc hiệu cho vi khuẩn ưa mặn như: LB [g/L] (Bacto Tryptone 10, NaCl 30, Cao nấm men 5, pH 7.2), Môi trường lên men tổng hợp PHA [g/L] (Glycerol 30, Bacto Tryptone 5, Cao nấm men 1, Na₂MoO₄.2H₂O 0,005, MnSO₄ 0,005, FeSO₄.7H₂O 0,01, CaCl₂.2H₂O 0,02, NaCl 30, MgSO₄.7H₂O 0,2, (NH₄)₂SO₄ 1, KH₂PO₄.2H₂O 0,2, K₂HPO₄ 1.6, pH 7).

Đánh giá sơ bộ khả năng tích lũy PHA: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường tối thiểu trong 24-48 giờ, sau đó được nhuộm bằng dung dịch Sudan black B (0,1 g Sudan black B trong 100 mL ethanol 96%). Các

chúng có bắt màu với thuốc nhuộm Sudan black sau đó được làm tiêu bản, nhuộm tế bào với thuốc nhuộm Nile blue A (0.25 mg/mL) và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng 460 nm [7].

Lên men thu nhận PHA từ các chủng vi khuẩn tuyển chọn: Các chủng vi khuẩn được tuyển chọn được hoạt hóa trong môi trường LB có nồng độ muối 3%, sau đó chuyển giống với tỷ lệ 5% vào các bình tam giác có chứa môi trường lên men tổng hợp PHA, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 48 giờ.

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và nguồn carbon lên sinh trưởng và tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn: Sau khi hoạt hóa trên môi trường LB có bổ sung 3% NaCl, các chủng vi khuẩn tuyển chọn được chuyển sang bình tam giác chứa môi trường lên men tổng hợp PHA với tỷ lệ giống 5%. Đối với thí nghiệm ảnh hưởng của pH, môi trường lên men được điều chỉnh pH về giá trị 4, 6 và 8 và lên men ở 37°C. Sau khi tìm được giá trị pH thích hợp, điều kiện lên men được thay đổi ở các nhiệt độ 25, 30 và 37°C. Các chủng được nuôi cấy trong 48 giờ trước khi đánh giá khối lượng sinh khối khô và hiệu suất tích lũy PHA.

Xác định khối lượng sinh khối khô tế bào: Sau khi lên men sinh tổng hợp PHA, dịch nuôi cấy được ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 30 phút, loại bỏ dịch nổi và thu sinh khối. Sinh khối được sấy khô ở 60°C cho đến khi khối lượng không đổi. Cân xác định trọng lượng sinh khối khô.

Tách chiết PHA: Sinh khối tế bào sau ly tâm được rửa 2 lần với đệm 20 mM phosphate pH 7.2 và sấy khô. Hòa lại tế bào trong nước cất với thể tích thích hợp và tiến hành gia nhiệt bằng lò vi sóng công suất 140W trong 15 phút. Quá trình gia nhiệt được dừng sau mỗi 10 giây cho đến khi hết thời gian xử lý. Bổ sung dung dịch ethanol/acetone 1:1 (v/v) và ủ trong 2 giờ trước khi chiết bằng chloroform. Lắc mạnh trong 5-6 giờ để nhựa sinh học hòa tan hoàn toàn. Thu pha chứa chloroform sang ống thủy tinh mới và bổ sung methanol lạnh (thể tích gấp 5-8 lần so với dịch chloroform). Giữ mẫu ở -20°C trong khoảng 30 phút. Li tâm thu cặn PHA ở 12000 vòng/phút trong 20 phút. Bổ sung dung dịch ethanol 70% 2 lần để loại dung môi, li tâm thu cặn rồi sấy khô ở nhiệt độ 50°C trong tủ hút [8].

Định lượng PHA bằng phương pháp axit crotonic cải tiến: Nguyên lý của phương pháp là PHA có thể chuyển đổi thành axit crotonic khi bị xử lý bằng axit sulfuric. Hợp chất crotonic có độ hấp thụ ở bước sóng 235 nm. Hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào được định lượng dựa trên đường chuẩn PHB thương mại chuyển hóa thành axit crotonic [9]. Hiệu suất tích lũy PHA được tính theo công thức $H = m_1/m_2 \times 100\%$, trong đó m_1 là khối lượng PHA tích lũy và m_2 là khối lượng khô tế bào.

Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào: Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi ở 37°C trên môi trường LB thạch với nồng độ NaCl 3%, sau 24 giờ tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc. Hình dạng tế bào được quan sát bằng kính hiển vi điện tử Olympus CH2 sau khi nhuộm Gram.

Đặc điểm sinh lý sinh hoá của các chủng: Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được xác định mức độ sử dụng oxy, hoạt tính catalase và khả năng đồng hoá một số nguồn đường như glucose, fructose, saccharose, arabinose, xylose với nồng độ 1% (w/v). Quan sát vị trí và mức độ phát triển của các chủng thông qua chỉ số mật độ quang OD₆₀₀. OD₆₀₀ < 0,1 là không phát triển (-), 0,1 < OD₆₀₀ < 0,3 là phát triển yếu (±), 0,3 < OD₆₀₀ < 0,4 là có phát triển (+), 0,4 < OD₆₀₀ < 0,6 là phát triển tốt (++), OD₆₀₀ > 0,6 là phát triển rất tốt (+++).

Phân loại các chủng vi khuẩn tuyển chọn dựa trên trình tự gen 16S rRNA

ADN tổng số của các chủng vi khuẩn được tách chiết bằng Kit GenJET Genomic DNA Purification (Thermo Fisher). Gen 16S rRNA được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5'-AGA GTT TGATCMTGG CTC AG-3')/1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3') [10], tinh sạch bằng Kit GenJET PCR Purification (Thermo Fisher) và giải trình tự bằng máy giải trình tự gen tự động ABI PRISM 3100 tại Viện Công nghệ sinh học. Kết quả sẽ được xử lý bằng các phần mềm tin sinh Chromas, công cụ BLAST NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng tích lũy PHA

Để sàng lọc nhanh các chủng có khả năng tích lũy nhựa có thể sử dụng phương pháp nhuộm khuẩn lạc và tế bào. Trong tập hợp 20 chủng vi khuẩn biến của Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học có 6 chủng (ký hiệu gồm 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6) có bắt màu xanh đen với thuốc nhuộm Sudan black (hình 1A). Các chủng này tiếp tục được nhuộm với Nile blue A để đánh giá mức độ bắt màu của các hạt PHA trong tế bào. Nile Blue A là loại thuốc nhuộm huỳnh quang được dùng để nhuộm các hạt PHA trong tế bào, cho phép chúng bắt màu cam sáng dưới kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng 460 nm. Cường độ bắt màu của các hạt PHA tỷ lệ thuận với hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào [11]. Kết quả trên Hình 1B cho thấy cả 6 chủng đều bắt màu tốt và có màu cam sáng rõ ràng trên nền đen, điều này có nghĩa chúng đều có khả năng tích lũy PHA cao trong tế bào.

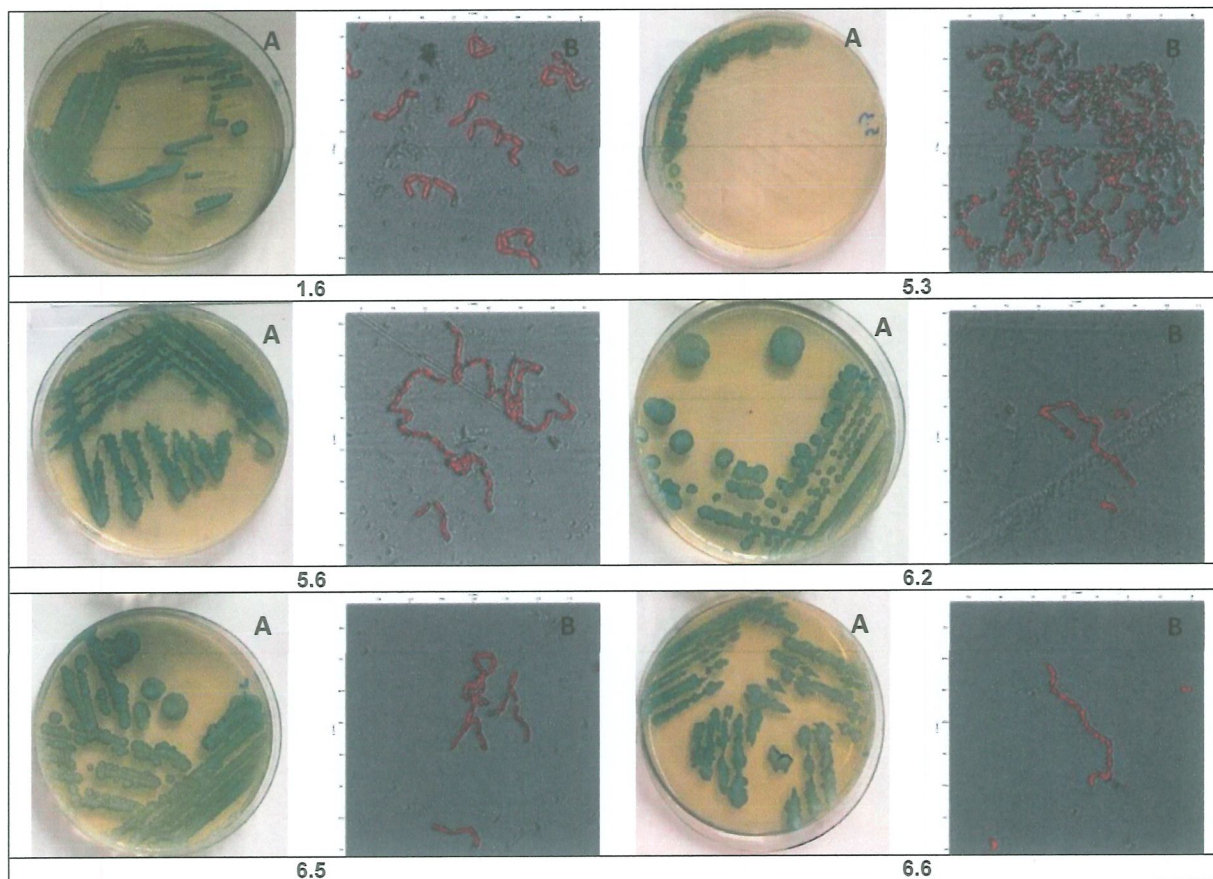
B

Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh trưởng và tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Vi sinh vật sinh trưởng tốt nhất ở điều kiện tối ưu. Quá trình sinh trưởng của vi sinh vật sẽ giảm, thậm chí sẽ ngừng ở các giới hạn cao hơn hoặc thấp hơn điều kiện tối ưu. PHA là sản phẩm dự trữ của vi sinh vật trong điều kiện dinh dưỡng bị cạn kiệt, tuy nhiên hiệu suất tích lũy PHA cũng giảm hoặc không có khi vi sinh vật không sinh trưởng hoặc sinh trưởng quá yếu. Do đó mối tương quan giữa sinh trưởng và tích lũy PHA là rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên quá trình sinh trưởng và tích lũy PHA của 6 chủng vi khuẩn tuyển chọn trên nguồn cơ chất glycerol.

Ảnh hưởng của pH

Phần lớn các vi sinh vật thuộc nhóm sinh trưởng ở pH trung tính (pH 6.5-7.5), tuy nhiên có một số nhóm vi sinh vật lại sinh trưởng tối ưu ở các điều kiện pH axit hoặc kiềm. Trong thí nghiệm này, các chủng 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6 được nhân giống và chuyển sang môi trường lên men tổng hợp PHA có điều chỉnh pH ban đầu đạt 4, 6 và 8. Kết quả tại Bảng 1 cho thấy cả 6 chủng đều sinh trưởng rất yếu ở pH 4, do đó hiệu suất tích lũy PHA ở giá trị pH axit này cũng rất thấp, từ 5,6-11,7%, thậm chí còn không xác định được. Cả 6 chủng đều sinh trưởng tốt ở pH 6 với hiệu suất tích lũy PHA đạt từ 21,7- 40,8%. Đặc biệt chủng 6.6 phát triển tốt nhất ở pH 8 và hiệu suất tích lũy PHA cũng đạt cao nhất (44,1%) ở giá trị pH này. Chủng 6.6 phân lập ở vị trí có pH 7,4-7,9, do đó bản thân chủng này ngoài tự nhiên đã tồn tại ở điều kiện kiềm nhẹ, do vậy sinh trưởng tốt nhất ở pH 8.



Hình 1. Đánh giá sơ bộ khả năng tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6 bằng phương pháp nhuộm khuẩn lạc với dung dịch Sudan black B (A) và nhuộm tế bào với Nile Blue A (B)

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là một trong những tác nhân vật lý ảnh hưởng mạnh đến sinh trưởng của vi sinh vật. Cả 6 chủng vi khuẩn tuyển chọn là các chủng ưa ấm với nhiệt độ sinh trưởng tốt nhất ở 37°C. Ở nhiệt độ 30°C, hàm lượng sinh khối khô giảm và ở 25°C thì các chủng hầu như không sinh trưởng được. Ở 37°C, hiệu suất tích lũy PHA của các chủng cũng đạt cao nhất từ 22,4-44,2%. Vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa có nhiệt độ trung bình hơn 30 °C và nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng của các chủng vi khuẩn ưa ấm là 35-37 °C. Trong tự nhiên phần lớn các chủng vi sinh vật là dạng ưa ấm ở pH trung tính, trừ các vi sinh vật ở các hệ sinh thái cực trị (các vùng cực, các vùng địa nhiệt, các hệ sinh thái kiềm, axit). Năm 2020, Ben Abdallah và cộng sự đã công bố về điều kiện sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn biển *Natrinema altunense* CEJGTEA101 và *Haloterrigena jeotgali* CEJEA36 tối ưu ở 37 °C và pH 6,5 - 7 với hiệu suất tổng hợp nhựa lần lượt là 35 và 25% so với sinh khối khô [12]. Tại các nghiên cứu trong nước, các chủng vi khuẩn phân lập từ một số hệ sinh thái rừng ngập mặn ở Nam Định, Quảng Ninh, Cần Giờ hoặc từ các bể làm mắm, vựa muối tại các địa phương trên cũng có hiệu suất tích lũy nhựa từ 11-71% so với sinh khối khô [5-6]. Do đó các chủng vi khuẩn biển ở trong nghiên cứu này có hiệu suất tổng hợp PHA ở mức độ trung bình so với các chủng đã được công bố trước đó.

Đặc điểm các chủng vi khuẩn có khả năng tích lũy PHA

Các chủng vi khuẩn được tuyển chọn đều là vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, tế bào hình que, sinh nội bào tử và catalase dương tính. Theo Khoá phân loại của Bergey [13] thì các chủng này đều thuộc chi *Bacillus*. Chi tiết về các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào, sinh lý sinh hoá được mô tả chi tiết trong bảng 2.

Phân loại các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến sinh trưởng và tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn
(KXĐ: không xác định, SKK: sinh khối khô)

Chủng	pH						Nhiệt độ [°C]					
	4		6		8		25		30		37	
	SKK [mg/mL]	PHA [%]	SKK [mg/mL]	PHA [%]	SKK [mg/mL]	PHA [%]	SKK [mg/mL]	PHA [%]	SKK [mg/mL]	PHA [%]	SKK [mg/mL]	PHA [%]
1.6	0,21 ± 0,01	5,6 ± 0,3	2,62 ± 0,15	24,2 ± 1,2	2,66 ± 0,15	26,2 ± 1,7	0,17 ± 0,08	KXĐ	1,87 ± 0,1	16,3 ± 1	2,64 ± 0,1	25,7 ± 1,3
5.3	0,13 ± 0,006	KXĐ	2,34 ± 0,12	21,7 ± 1,3	2,25 ± 0,1	22,4 ± 1,1	0,05 ± 0,003	KXĐ	2,02 ± 0,1	22,8 ± 1,4	2,43 ± 0,1	22,4 ± 1,1
5.6	0,26 ± 0,01	11,7 ± 0,7	1,78 ± 0,1	34,4 ± 1,7	0,87 ± 0,04	19,2 ± 0,9	0,11 ± 0,005	KXĐ	1,53 ± 0,1	27,5 ± 1,6	1,76 ± 0,08	34,6 ± 1,7
6.2	0,24 ± 0,01	8,3 ± 0,5	2,27 ± 0,1	31,2 ± 1,6	1,22 ± 0,06	17,1 ± 1	0,08 ± 0,005	KXĐ	1,79	26,4 ± 1,3	2,38 ± 0,1	32,3 ± 1,9
6.5	0,26 ± 0,01	8,8 ± 0,5	1,63 ± 0,08	40,8 ± 2	1,69 ± 0,8	38,7 ± 2,3	0,12 ± 0,007	KXĐ	1,35	38,8 ± 1,9	1,70 ± 0,09	39,8 ± 2,4
6.6	0,15 ± 0,008	KXĐ	3,16 ± 0,15	39,2 ± 1,9	4,21 ± 0,3	44,1 ± 2,5	0,05 ± 0,003	KXĐ	2,24 ± 0,1	35,7	4,27 ± 0,2	44,2 ± 2,7

Bảng 2. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn (+: Dương tính; ± Dương tính yếu; -: Âm tính)

Chủng vi khuẩn	1.6	5.3	5.6	6.2	6.5	6.6
Đặc điểm hình thái, tế bào						
Gram	+	+	+	+	+	+
Hình dạng tế bào	Que, chuỗi ngắn	Que, chuỗi ngắn	Que, chuỗi dài	Que, chuỗi dài	Que, chuỗi dài	Que, chuỗi dài
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng	Trắng sữa	Trắng sữa	Trắng sữa	Trắng sữa	Trắng sữa
Sinh nội bào tử	+	+	+	+	+	+
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn, hơi lồi ở tâm, bề mặt trơn bóng, mép tròn đều	Tròn, bề mặt lồi bóng, mép tròn đều	Tròn, hơi lồi ở tâm, bề mặt bóng nhẫy, mép tròn đều	Tròn, dẹp, bề mặt nhẵn, mép tròn đều	Tròn, tâm hơi lồi, bề mặt nhẵn, mép tròn đều	Hình dạng không đồng nhất, mặt bên dày, mép nhẵn
Đặc điểm sinh lý, sinh hoá						
Nhu cầu oxy	±	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Đồng hoá Glucose	+	+	+	+	+	+
Đồng hoá Fructose	+	+	+	±	+	+
Đồng hoá Saccharose	±	±	+	+	+	+
Đồng hoá Arabinose	-	-	±	+	+	±
Đồng hoá Xylose	-	-	-	+	-	-

Gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được khuếch đại và giải trình tự bằng cặp mồi 27F/1492R. Phân tích, so sánh trình tự với các trình tự gen 16S rRNA trong ngân hàng dữ liệu GenBank. Kết quả từ Bảng 3 cho thấy tất cả các chủng đều thuộc chi *Bacillus*. Các chủng 1.6, 6.2 và 6.5 đều có độ tương đồng cao với loài *B. megaterium*, trong khi đó chủng 5.3, 5.6, và 6.6 có trình tự giống với các loài *Bacillus* spp. khác. Tuy nhiên để phân biệt được chính xác đến loài cần phải xác định thêm nhiều chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa nữa cũng như giải trình tự một số gen marker khác.

Bảng 3. So sánh trình tự gen 16S rRNA của các chủng 1.6, 5.3, 5.6, 6.2, 6.5 và 6.6 trên với trình tự các gen trên GenBank

Tên chủng vi khuẩn	Chủng có độ tương đồng cao nhất	Độ tương đồng (%)	Mã số
1.6	<i>Bacillus megaterium</i> A2-Y	99.90	MT588727.1
5.3	<i>Bacillus cereus</i> D2-5	99.83	LC537277.1
5.6	<i>Bacillus subtilis</i> BC137	99.66	MZ436127.1
6.2	<i>Bacillus megaterium</i> RKCrb3	99.67	MT452900.1
6.5	<i>Bacillus megaterium</i> LA6	99.91	MT279338.1
6.6	<i>Bacillus anthracis</i> NA10.2	99.92	JN999847.1

KẾT LUẬN

Đã sàng lọc được 6 chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHA với hiệu suất từ 21-44% ở điều kiện nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C và pH 6-8. Dựa vào đặc điểm sinh học và trình tự 16S rRNA cho thấy các chủng này thuộc chi *Bacillus*. Các chủng này đã góp phần làm phong phú thêm nguồn gen vi sinh vật của Việt Nam có khả năng tích lũy nhựa sinh học.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong đề tài mã số TĐNSH.07/22-24

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Anjum, M. Zuber, K. M. Zia, A. Noreen, M. N. Anjum, S. Tabasum, "Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements". *Int J Biol Macromol*, Vol. 89, pp. 161-74, 2016.
- [2]. A. Ifthikhar, J. Nazia, "Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field", *Front Biol*, Vol. 11, no. 1, pp. 19-27, 2016.
- [3]. P. Poltronieri, P. Kumar, "Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in Industrial Applications, In: Martínez L, Kharisova O, Kharisov B (eds)." *Handbook of Ecomaterials*. Springer, Cham, 2019.
- [4]. V. T. Doan, J. Quillaguamán, "Improving culture conditions for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Bacillus* sp. ND153, a bacterium isolated from a mangrove forest in Vietnam" *Ann Microbiol*, Vol. 64, No.3, pp. 991-997, 2014.
- [5]. Đoàn Văn Thước, Nguyễn Thị Vóc, "Isolation of halophilic bacterial strains from Mangrove soil samples for Polyhydroxyalkanoate production", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, Vol. 32, no. 1, pp. 79-85, 2016.
- [6]. H. P. Tran, V. T. Doan, K. Sudesh, "Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by *Yangia* sp. ND199 from different carbon sources", *Int J Biol Macromol*, Vol. 84, pp 361-366, 2016.
- [7]. A. G. Ostle, J. G. Holt, "Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate", *Appl Environ Microbiol*, Vol. 44, No. 1, pp. 238-241, 1982.
- [8]. M. Joyline, K. Aruna, "Production and Optimization of Polyhydroxyalkanoate Obtained from *Bacillus megaterium* JHA", *J Appl Biotechnol Rep*, Vol. 8, No. 4, pp. 346-360, 2021.
- [9]. R. F. Nordeste, M. A. Trainer, T. C. Charles, "Methods for the isolation of genes encoding novel PHB cycle enzymes from complex microbial communities. Metagenomics: Methods and Protocols", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 688, pp. 235-246, 2010.
- [10]. J. A. Frank, C. I. Reich, S. Sharma, J. S. Weisbaum, B. A. Wilson, G. J. Olsen, "Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes", *Appl. Environ. Microbiol*. Vol 74, pp. 2461-2470, 2008.
- [11]. A. Goudarztalejerdi, M. Tabatabaei, M. H. Eskandari, D. Mowla, A. Iraj, "Evaluation of bioremediation potential and biopolymer production of pseudomonads isolated from petroleum hydrocarboncontaminated areas", *Int J Environ Sci Technol*, Vol. 12, No. 9, pp. 2801-2808, 2015.
- [12]. M. Ben Abdallah, F. Karray, S. Sayadi, "Production of Polyhydroxyalkanoates by Two Halophilic Archaeal Isolates from Chott El Jerid Using Inexpensive Carbon Sources", *Biomolecules*. Vol 10, No. 1, pp. 109, 2020.
- [13]. D. H. Bergey, W. B. Whitman, P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", New York: Springer, Vol. 3, 2009.

SCREENING POLYHYDROXYALKANOATE PRODUCING MARINE *Bacillus* spp.

Lai Thi Hong Nhung¹, Phan Thi Tuyet Minh¹, Pham Thi Trang², Dao Hai Yen³, Nguyen Kim Thoa^{1,2*}

¹*Institute of Biotechnology, VAST*

²*Graduate University of Science and Technology, VAST*

³*Institute of Chemistry, VAST*

SUMMARY

Polyhydroxyalkanoate is one of the bioplastics synthesized by microorganisms with broad potential applications. Vietnam is a country with a long coastline, which offers a great opportunity to exploit the diversity as well as bioactive compounds from marine microorganisms. In this study, some marine bacteria isolated from the Khanh Hoa sea area were screened for their ability to produce PHA using qualitative and quantitative methods. After staining colonies and cells, six strains exhibited PHA-producing ability. These strains' morphological characterization and 16S rRNA sequences have high similarity with other *Bacillus* species. Quantitative analysis of PHA in cells showed that all of them accumulated 21-44% in comparison with dry cell weight. The good condition for both cell growth and PHA accumulation is 37°C and pH 6-8. This initial research indicates these marine bacteria have the potential to be bioplastic single-cell factories.

Keywords: *Bacillus* spp., bioplastics, PHA, marine bacteria.

* Author for correspondence: Tel: +84-2437567103; Email: nkthoa@ibt.ac.vn

Số: 1789/QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 28 tháng 10 năm 2022

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 2051/QĐ-VHL ngày 29/12/2014 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 15/2014/TT-BGDĐT ngày 15/5/2014 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 775/QĐ-HVKHCN ngày 21/11/2016 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1982/QĐ-HVKHCN ngày 07/12/2020 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 2 năm 2020;

Căn cứ Quyết định số 346/QĐ-HVKHCN ngày 04/04/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;
Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trường phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Phạm Thị Trang với đề tài: “Tuyển chọn các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa sinh học Polyhydroxyalkanoate (PHA) dạng copolymer phân lập ở Việt Nam”.

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.14.

GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lâm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 1789/QĐ-HVKHCN ngày 28 / 10 /2022
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Cho luận văn của học viên: Phạm Thị Trang

Tên đề tài: Tuyển chọn các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa sinh học Polyhydroxyalkanoate (PHA) dạng copolymer phân lập ở Việt Nam.

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: TS. Nguyễn Kim Thoa

- Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	GS. TS. Chu Hoàng Hà	Công nghệ sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	PGS. TS. Bùi Thị Việt Hà	Vi sinh vật học	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Phản biện 1
3.	TS. Nguyễn Thị Tâm Thư	Vi sinh vật học	Viện Công nghệ mới, Viện Khoa học và Công nghệ Quân sự	Phản biện 2
4.	TS. Đinh Thị Thu Hằng	Hóa sinh học	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	PGS. TS. Đỗ Thị Huyền	Hóa sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./.

Hà Nội, ngày 11 tháng 11 năm 2022

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 1789/QĐ-HVKHCN ngày 28/10/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Phạm Thị Trang

Tên đề tài: Tuyển chọn các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa sinh học Polyhydroxyalkanoate (PHA) dạng copolymer phân lập ở Việt Nam.

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 11/11/2022 Hội đồng đã họp tại phòng 1707, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 09 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

- | | |
|----------------------------|-------------------|
| 1. GS.TS. Chu Hoàng Hà | Chủ tịch hội đồng |
| 2. TS. Đinh Thị Thu Hằng | Thư ký hội đồng |
| 3. PGS.TS. Bùi Thị Việt Hà | Phản biện 1 |
| 4. TS. Nguyễn Thị Tâm Thu | Phản biện 2 |
| 5. PGS.TS. Đỗ Thị Huyền | Ủy viên hội đồng |



Thành viên vắng mặt:0..... (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
- Phản biện 1:

.....*Nếu...lược...bỏ...phần...thảo luận...PHA*.....
.....*Có...bản...luận...gửi...về...chúng...b...trưởng...đồng...về...loài...Bacillus*.....
.....*đề...ràng...cao...tham...lượng...PHA...ở...chúng...b...cần...làm...thế...nào?*.....

6. Phản biện 2:

...Tại sao có sự khác nhau về điều kiện môi trường
vẫn và kết quả công lao trong bầu bầu.....

7. Học viên trả lời:

...Đáp ứng yêu cầu, đây là?

8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

9. Học viên trả lời

10. Hội đồng hợp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: ... TS. Hồ Chí Minh

Ủy viên: ... TS. Nguyễn Chí Kiên

Ủy viên: ... TS. Đinh Chí Hùng

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: ... 0.5

Số phiếu thu về: ... 0.5

Tổng số điểm: ... 4.4.2

Điểm trung bình: ... 8.8.4

Điểm thưởng công trình công bố:.....^{0,5}.....

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố:.....^{9,34}.....

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận văn^{Đạt}..... (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố:
.....^{Đạt}.....^{quả}.....^{không}.....^{trùng}.....^{lặp}.....^{với}.....^{các}.....^{công}.....^{trình}.....^{công}.....^{bố}.....
.....^{của}.....^{trong}.....^{và}.....^{ngoài}.....^{nước}.....

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

.....^{Đã}.....^{dùng}.....^{về}.....^{hình}.....^{thức}.....^{của}.....^{luận}.....^{văn}.....^{đáp}.....^{ứng}.....^{yêu}.....^{cầu}.....
.....^{về}.....^{luận}.....^{viên}.....^{thạc}.....^{sĩ}.....^{sinh}.....^{học}.....^{ngành}.....^{sinh}.....^{học}.....^{thức}.....
.....^{ngành}.....
.....^{Cần}.....^{chỉnh}.....^{sửa}.....^{theo}.....^{các}.....^{góp}.....^y.....^{của}.....^{các}.....^{thành}.....^{viên}.....
.....^{Hội}.....^{đồng}.....

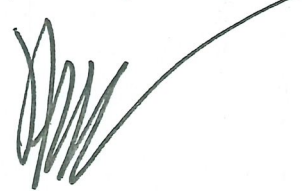
Buổi họp đã kết thúc vào.....¹⁰..... giờ.....⁵⁵.....phút, ngày.....^{11/11/2022}.....

Hà Nội, ngày.....¹¹..... tháng.....¹¹..... năm.....²⁰²².....

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG


Đinh Thị Thu Hằng

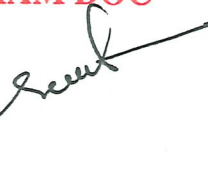

Chu Tươi Tươi

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KI. GIÁM ĐỐC

PHÓ GIÁM ĐỐC




Nguyễn Thị Trung

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Bùi Thị Việt Hà

Học hàm, học vị: PGS. TS

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 1

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Họ và tên học viên: Phạm Thị Trang

Tên đề tài: Tuyển chọn các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa sinh học polyhydroxyalkanoate (PHA) dạng Copolymer phân lập ở Việt Nam

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Nhựa có thể được coi là vật liệu nhân tạo được sử dụng rộng rãi nhất ngày nay. Chúng cần thiết trong hầu hết các lĩnh vực của đời sống con người bởi các tính chất đặc trưng được biết đến như: khả năng uốn dẻo, độ bền, khả năng chịu nước, độ dẫn điện và dẫn nhiệt thấp,... Tuy nhiên, các monome ở phần lớn các chất dẻo như polyester, polyethylen, polypropylen và polystyren có nguồn gốc từ hydrocarbon hóa thạch và không bị phân hủy trong tự nhiên vì thế chúng gây ô nhiễm nghiêm trọng, ảnh hưởng đến môi trường tự nhiên cũng như đời sống con người. Chính vì vậy, việc tìm và phát hiện ra các loại nhựa sinh học đã mở ra cánh cửa mới thu hút được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên toàn thế giới.

Nhựa sinh học có nhiều ưu điểm so với nhựa thông thường có nguồn gốc hóa dầu (nhựa hóa dầu) do khả năng phân hủy sinh học vốn có, tính bền vững và tính chất thân thiện với môi trường, giúp bảo tồn nguồn nhiên liệu hóa thạch đang cạn kiệt và cũng góp phần trong việc giảm phát thải khí nhà kính từ đó trở thành nhân tố quan trọng cho sự phát triển bền vững. Trong nhóm này, Poly (3-hydroxybutyric acid) (PHB) được sản xuất và nghiên cứu rộng rãi nhất, chúng có mặt ở nhiều loài vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Tuy nhiên đặc tính cơ lý của PHB thường có tính kết tinh cao do đó vật liệu tương đối giòn, cứng, với tỷ lệ kéo dài thấp. Trong khi đó các vật liệu copolymer đã khắc phục được những hạn chế của PHB, vì vậy việc tìm kiếm các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp các copolymer có chứa các monomer khác với 3-hydroxybutyrate (3HB) là một điều cần thiết. PHA từ các chủng thuộc chi *Bacillus* được quan tâm nghiên cứu do phần lớn chúng được biết là an toàn, không sinh nội độc tố nên rất phù hợp cho sản

xuất quy mô lớn. Hơn nữa các chủng vi khuẩn biển cũng có ưu thế trong sản xuất ở quy mô lớn do khả năng chịu muối cao, không bị tạp nhiễm với các nhóm VSV khác. Luận văn là những nghiên cứu bước đầu tìm kiếm các chủng vi khuẩn biển có khả năng tổng hợp PHA dạng copolymer, là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp sau.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Tên đề tài, nội dung luận án không trùng lặp với các công trình nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước khác. Các tài liệu tham khảo được trích dẫn có chú thích rõ ràng, đúng nguồn, đúng tài liệu.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đề tài:

Tên đề tài nghiên cứu phù hợp với nội dung nghiên cứu cũng như chuyên ngành và mã số đề tài

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu bao gồm các phương pháp thường quy, có sự kết hợp của các phương pháp vi sinh vật học, hóa sinh, sinh học phân tử, hóa học. Các phương pháp sử dụng có độ tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn: Luận văn đã đạt được một số kết quả nghiên cứu nổi bật như:

- Từ 8 mẫu nước biển và trầm tích của vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa, đã phân lập được 44 chủng vi khuẩn, trong đó đã sàng lọc được 6 chủng vi khuẩn biển có khả năng tích lũy PHA.

- Ở điều kiện nuôi cấy thích hợp, các chủng vi khuẩn tuyển chọn tổng hợp PHA với hiệu suất từ 22,4 – 44,2% ở điều kiện nhiệt độ (37 °C) và pH lên men phù hợp (6 – 8). Trong đó đặc biệt là chủng 6.6, cho hiệu suất sản sinh PHA cao vượt trội đạt 44,2% khi nuôi cấy trong môi trường lên men Salinity HT, ở điều kiện nhiệt độ 37 °C và pH 8.

- PHA thu nhận từ chủng 6.6 là dạng copolymer có thành phần 3HV với tỷ lệ 5,2 mol%.

- Dựa vào đặc điểm sinh học và trình tự gen 16S rRNA cả 6 chủng vi khuẩn tuyển chọn có độ tương đồng cao với các loài thuộc chi *Bacillus*.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Tên luận văn quá rộng, cần khu trú vào đối tượng nghiên cứu là các chủng vi khuẩn biển ở vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa

- Phần tổng quan viết khá tốt, đặc biệt phần viết về các nghiên cứu trong nước về vấn đề nghiên cứu khá thuyết phục, tuy nhiên cần lược bỏ bớt các phần, mục không liên quan đến nội dung luận văn: khả năng phân hủy của PHA.

- Bổ sung vị trí địa lý (tọa độ) các mẫu thu thập được

- Các Hình ảnh biểu diễn khá đơn điệu, cần thể hiện số liệu phong phú và đa dạng hơn

Câu hỏi:

- 1) Tại sao lại chọn tên đề tài là “Tuyển chọn các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa sinh học Polyhydroxyalkanoate (PHA) dạng copolymer phân lập ở Việt Nam”?
- 2) Để nâng cao hàm lượng 3HV trong thành phần copolymer của chủng 6.6 em sẽ làm gì?
- 3) Theo kết quả nêu trong bài báo 6.6 gần gũi với loài *B. anthracis*, theo em liệu có nên sử dụng chủng này tiếp học?

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Tác giả đã có 1 công trình nghiên cứu đăng trên Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2022.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Xét về cả nội dung, hình thức và hàm lượng khoa học, luận văn đã đáp ứng được yêu cầu của luận văn Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày 10 tháng 11 năm 2022

Người nhận xét

(Ký, ghi rõ họ tên)



PGS. TS Bùi Thị Việt Hà

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Thị Tâm Thư Học hàm, học vị: TS
Chức danh trong Hội đồng: Phản biện
Cơ quan công tác: Viện Công nghệ môi trường / Viện KH - CN quân sự
Họ và tên học viên: Phạm Thị Trang
Tên đề tài: Nghiên cứu các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa sinh học
Polyhydroxyalkanoate (PHA) dạng copolymer phân lập ở kết/Van
Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm. Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Ô nhiễm nhựa ngày càng gia tăng do nhựa có nguồn gốc dầu mỏ không thể phân hủy sinh học. PHA là loại nhựa sinh học do BV sinh ra và có khả năng phân hủy hoàn toàn thành CO_2 và H_2O và có các tính chất tương tự nhựa có nguồn gốc dầu mỏ. Do đó, đề tài nghiên cứu các vt tích lũy PHA có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài không trùng lặp với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước.
Đề tài có tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu là thường quy và hiện đại nên các kết quả nghiên cứu là chính xác và có độ tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đề tài đã phân lập tuyển chọn được 6 chủng vi khuẩn biến có khả năng tích lũy PHA.
- Đã đánh giá được điều kiện nuôi cấy thích hợp của các chủng nghiên cứu như nhiệt độ 37°C , pH 6-8, hiệu suất sinh PHA từ 22,4 - 44,2%. Chủng 6 cho hiệu suất tạo PHA cao nhất là 44,2%.
- Đã xác định được chủng 6 sinh ra PHA dạng copolymer có thành phần 3-HV với tỉ lệ là 5,2% mol.
- Đã định danh được 6 chủng sinh PHA đều thuộc chi *Bacillus*.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Luận văn được in màu rõ ràng, trình bày khá đẹp, có đầy đủ các phần quy định của luận văn. Tuy nhiên, nên sắp xếp thứ tự trong luận văn cho dễ theo dõi.
- Luận văn có nhiều lỗi chính tả (tên bảng, hình, thông tin).
- Bổ sung cây phát sinh chủng loại và đồ tương đồng của chủng với các chủng so sánh.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Nội dung của luận văn đã được viết bài báo khoa học và được đăng trên tuyển tập báo cáo khoa học hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc năm 2022.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Các kết quả nghiên cứu đáp ứng được các yêu cầu của luận văn Thạc sĩ, luận văn có thể đưa bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ

Hà Nội, ngày 10 tháng 11 năm 2022

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)

Phan
Nguyễn Thị Tâm Thư

Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và xác nhận của cơ quan công tác (nếu đang công tác) và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Minh Tâm phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT02438689977- 0946082099

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Phạm Thị Trang

Lớp: SHTN20B

Tên đề tài luận văn: Tuyển chọn các chủng vi khuẩn tích lũy nhựa sinh học Polyhydroxyalkanoate (PHA) dạng copolymer phân lập ở Việt Nam

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Kim Thoa

Ngày bảo vệ luận văn: 11/11/2022

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Lỗi chính tả	Đã sửa lỗi chính tả ở các trang 5; 7; 9; 10; 16; 17; 18; 27; 30; 35; 38; 44; 45.
2	Bỏ nội dung phân hủy sinh học của PHA	Đã bỏ phần 1.1.4 hoàn toàn
3	Gộp các phương pháp nghiên cứu sự ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển	Đã sửa gộp thành “Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn biển” từ trang 20 đến trang 21.
4	Sửa lỗi trình bày bảng	Đã sửa cách trình bày bảng 2.1 trang 16; bảng 3.4 trang 42
5	Sửa lỗi trình bày hình	Đã sửa lỗi trình bày các hình 3.3 trang 31; hình 3.4 trang 33; hình 3.5 trang 34; hình 3.6 trang 36; hình 3.7



		trang 37
6	Sửa thuật ngữ “trọng lượng” thành “khối lượng”	Đã sửa tại Trang 12; 14; 20; 21; 32; 33; 35; 38. Hình 3.3 trang 31; hình 3.4 trang 33; hình 3.5 trang 34; hình 3.6 trang 36; hình 3.7 trang 37.
7	Đánh số thứ tự cho các kết luận và kiến nghị	Đã đánh số cho các kết luận và kiến nghị trang 46

Hà Nội; ngày 24 tháng 11 năm 2022

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

Chun tưng ta

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

Nguyễn Kim Thoa

HỌC VIÊN

Phạm Thị Trang

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC

PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung