

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phan Thị Thùy Trang

**PHÂN LẬP VI KHUẨN CỖ CHỊU MẶN CÓ TIỀM NĂNG
SINH ENZYME CHUYỂN HÓA POLYSACCHARIDE**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Nha Trang – 2025

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phan Thị Thùy Trang

**PHÂN LẬP VI KHUẨN CỎ CHỊU MẶN CÓ TIỀM NĂNG
SINH ENZYME CHUYỂN HÓA POLYSACCHARIDE**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh

2. TS. Cao Thị Thúy Hằng

Nha Trang – 2025

LỜI CAM ĐOAN

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

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Phan Thị Thùy Trang

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ với niềm kính trọng và sự tự hào khi được học tập trong thời gian qua.

Với sự biết ơn sâu sắc nhất xin dành cho Tiến sĩ Huỳnh Hoàng Như Khánh và Tiến sĩ Cao Thị Thúy Hằng đã giúp đỡ, động viên và chia sẻ nhiều kinh nghiệm cũng như các thầy cô trong hội đồng chấm luận văn đã cho tôi những đóng góp quý báu để hoàn chỉnh luận văn này.

Xin được cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ các nhiệm vụ khoa học công nghệ: nhiệm vụ Hợp tác quốc tế, mã số QTIT01.01/23-24 (do PGS. TS. Phạm Đức Thịnh chủ nhiệm); nhiệm vụ thuộc các hướng khoa học và công nghệ ưu tiên, mã số VAST02.01/23-24 (do TS. Võ Thị Diệu Trang chủ nhiệm). Cảm ơn sự hỗ trợ quý báu từ những người nông dân và chủ của đồng muối Hòn Khói, Ninh Diêm, Khánh Hòa trong quá trình thu thập mẫu.

Xin chân thành cảm ơn đến các bạn học viên cao học lớp BIO.21A đã chia sẻ, trao đổi kiến thức và đóng góp ý kiến quý báu nhằm giúp đỡ, động viên tôi hoàn thành nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn gia đình, người thân và đồng nghiệp đã tạo điều kiện, động viên, chia sẻ kịp thời cùng tôi trong quá trình nghiên cứu.

Xin chân thành cảm ơn.

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGUYÊN CỨU	4
1.1. GIỚI THIỆU VI KHUẨN CỎ CHỊU MẶN (HALOARCHAEA)	4
1.1.1. Định nghĩa và đặc điểm sinh học của Haloarchaea.	4
<i>1.1.1.1. Định nghĩa.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.1.2. Đặc điểm hình thái.....</i>	<i>4</i>
1.1.3. Vai trò và ứng dụng của vi khuẩn cỏ	6
1.2. PHÂN LẬP VI KHUẨN CỎ CHỊU MẶN (HALOARCHAEA) TỪ MÔI TRƯỜNG TỰ NHIÊN	7
1.2.1. Nguồn thu mẫu để phân lập vi khuẩn cỏ chịu mặn.....	7
1.2.2. Phương pháp phân lập cỏ khuẩn	9
1.2.3. Định danh cỏ khuẩn	10
<i>1.2.3.1. Đặc điểm hình thái và quan sát khuẩn lạc.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.3.2. Xét nghiệm sinh hóa.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.3.3. Phân tích di truyền và định danh phân tử.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.3.4. Đánh giá khả năng sinh học đặc thù</i>	<i>11</i>
1.3. ENZYME BẰNG NGẮN MẠCH POLYSACCHARIDE TỪ VI KHUẨN CHỊU MẶN.....	12
1.3.1. Tổng quan về chitinase có nguồn gốc từ Haloarchaea	12
1.3.2. Tổng quan về cellulase có nguồn gốc từ Haloarchaea.....	12
1.3.3. Tổng quan về axit hyaluronic có nguồn gốc từ Haloarchaea	14
1.3.4. Một số enzyme thủy phân khác từ Haloarchaea	15
1.4. TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG CỦA VI KHUẨN CỎ SINH ENZYME CHUYỂN HÓA POLYSACCHARIDE.	16
1.4.1. Ứng dụng trong xử lý sinh học và công nghiệp năng lượng	16

1.4.2. Ứng dụng trong dược phẩm và mỹ phẩm:	16
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	18
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	18
2.1.2. Hóa chất sử dụng.....	18
2.1.3. Dụng cụ, thiết bị:.....	18
2.2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu, phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn (Haloarchaea)	18
2.2.1.1. <i>Phương pháp thu thập mẫu</i>	18
2.2.1.2. <i>Phương pháp phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn</i>	19
2.2.1.3. <i>Sàng lọc chủng vi khuẩn cổ nhạy cảm với kháng sinh anisomycin</i> ..	21
2.2.2. Phương pháp xác định tiềm năng sinh enzyme thủy phân polysaccharide từ các chủng vi khuẩn thu được.	22
2.2.2.1. <i>Sàng lọc Haloarchaea theo định hướng sinh enzyme thủy phân chitin</i>	22
2.2.2.2. <i>Sàng lọc Haloarchaea theo định hướng sinh enzyme thủy phân cellulose/xylan:</i>	22
2.2.2.3. <i>Sàng lọc Haloarchaea sinh hyaluronidase</i>	22
2.2.2.4. <i>Phương pháp phân loại chủng vi khuẩn cổ chịu mặn tuyển chọn</i> ...	23
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	26
3.1. Kết quả phân lập cổ khuẩn từ các mẫu thu ở các đồng muối Hòn Khói .	26
3.1.1. Kết quả phân lập vi khuẩn từ các mẫu thu nhận được	26
3.1.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính nhạy cảm với kháng sinh anisomycin.....	31
3.2. Kết quả sàng lọc Haloarchaea có khả năng sinh enzyme phân cắt chitin, cellulose/xylan và HA.	34
3.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn.....	38

3.3.1. Kết quả tách chiết DNA của các chủng vi sinh vật tuyển chọn.....	38
3.3.2. Kết quả PCR 16S rDNA của các chủng vi sinh vật tuyển chọn	40
3.3.3. Kết quả giải trình tự 16S rDNA	41
3.3.4. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài của chủng VS7M5.3	43
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	46
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	47
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	48
PHỤ LỤC 1.....	58

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

STT	Kí hiệu và chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ
1	CMC	Carboxymethyl cellulose
2	DNA	Deoxyribonucleic acid
3	HA	Hyaluronic acid
4	MGM	Modified Growth Medium
5	PCR	Polymerase Chain Reaction
6	PHA	Polyhydroxyalkanoates
7	RNA	Ribonucleic acid
8	YE	Yeast Extract

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Đặc điểm mẫu và mô tả địa điểm lấy mẫu	19
Bảng 3.1 Đặc điểm của các chủng vi sinh vật phân lập được.....	27
Bảng 3.2 Hoạt tính nhạy cảm với kháng sinh anisomycin của các chủng vi sinh vật tuyển chọn.....	32
Bảng 3.3. Khả năng thủy phân chitin, cellulose/xylan và HA của các chủng Haloarchaea.....	34
Bảng 3.4 Nồng độ DNA và độ sạch của các mẫu nghiên cứu.....	39
Bảng 3.5. Kết quả định danh chủng cổ khuẩn VS7 M5.3 dựa trên trình tự 16S rDNA	42

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 3.1 Hình ảnh các khuẩn lạc phân lập được	26
Hình 3.2. Số lượng và màu sắc khuẩn lạc sau khi phân lập.....	30
Hình 3.3. Hoạt tính đối với cơ chất CMC	36
Hình 3.4. Điện di gel agarose của các mẫu DNA chiết xuất từ các chủng vi sinh vật tuyển chọn.....	39
Hình 3.5: Điện di gel agarose của sản phẩm PCR từ các mẫu.....	40
Hình 3.6. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen 16S rDNA của chủng cổ khuẩn VS7M5.3	44

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn cổ chịu mặn (Haloarchaea, hay còn được gọi là Halobacteria) là một nhóm vi sinh vật độc đáo có khả năng sinh trưởng và phát triển mạnh mẽ trong điều kiện môi trường siêu mặn, nơi nồng độ muối có thể đạt đến mức bão hòa. Đặc điểm nổi bật của Haloarchaea là sự xuất hiện của sắc tố carotenoid, thường mang màu đỏ, cam hoặc tím, giúp bảo vệ tế bào khỏi tác động của ánh sáng mạnh và stress oxy hóa trong môi trường có áp suất thẩm thấu cao [1].

Sự thích nghi độc đáo của Haloarchaea không chỉ dừng lại ở khả năng sinh tồn trong môi trường siêu mặn mà còn ở việc chúng sản sinh các enzyme có khả năng hoạt động trong điều kiện khắc nghiệt, bao gồm độ mặn cao, nhiệt độ cao và pH bất thường [2, 3]. Điều này làm cho Haloarchaea trở thành nguồn tài nguyên sinh học đầy tiềm năng cho nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp, nông nghiệp, thủy sản và xử lý môi trường.

Trong môi trường tự nhiên như ruộng muối và hồ muối, nguồn carbon chủ yếu là các polysaccharide phức tạp như cellulose, xylan, chitin và hemicellulose. Những hợp chất này đóng vai trò quan trọng trong chu trình carbon tự nhiên khi chúng cấu thành thành tế bào thực vật hoặc lớp vỏ ngoài của động vật (như chitin trong giáp xác) [4]. Để tận dụng nguồn carbon này, vi sinh vật siêu mặn, đặc biệt là Haloarchaea, đã tiến hóa khả năng sản xuất các enzyme chuyên biệt như cellulase, xylanase và chitinase. Đặc tính ưu việt của các enzyme này, bao gồm khả năng chịu mặn cao, bền nhiệt và ổn định trong môi trường có pH thấp, đã mở ra những tiềm năng lớn trong các ứng dụng công nghệ sinh học [2].

Một enzyme đặc biệt khác nhận được sự quan tâm lớn gần đây là hyaluronidase, có khả năng thủy phân acid hyaluronic (HA) – một polysaccharide quan trọng trong cơ thể người và động vật. HA tham gia vào nhiều quá trình sinh học như sửa chữa mô tổn thương, di chuyển tế bào và điều trị ung thư. Tuy nhiên, trọng lượng phân tử lớn của HA làm hạn chế khả năng hấp thụ và hiệu quả điều trị, đòi hỏi phát triển các enzyme sinh học an toàn để cắt mạch HA, tạo ra các sản phẩm có khối lượng thấp, phục vụ cho các ứng dụng trong y học và dược phẩm [5].

Tại Việt Nam, nghiên cứu về tiềm năng ứng dụng của vi sinh vật biển

trong chuyển hóa polysaccharide mới chỉ bắt đầu phát triển trong những năm gần đây. Kết quả đã bước đầu xây dựng cơ sở dữ liệu về các chủng vi sinh vật biển có khả năng sản sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide như fucoidan, laminaran và alginate [6, 7, 8]. Một số nghiên cứu về hệ gen của vi sinh vật biển, chẳng hạn như *Salinivibrio proteolyticus* [9] và *Pseudoalteromonas* [10], cũng đã được triển khai, tuy nhiên, phần lớn vẫn dừng lại ở mức sàng lọc và định danh. Các nghiên cứu chuyên sâu về enzyme chuyển hóa polysaccharide chủ yếu tập trung vào vi khuẩn hiếu khí, vi nấm, hoặc vi sinh vật chịu mặn thông thường [11, 12, 13], trong khi nghiên cứu về enzyme từ Haloarchaea còn rất hạn chế, đặc biệt tại Việt Nam. Một trong những lý do chính là khó khăn trong quá trình phân lập và nuôi cấy các chủng vi khuẩn cổ này do yêu cầu khắt khe về môi trường sinh trưởng [14].

Việt Nam có nhiều lợi thế tự nhiên thuận lợi cho việc nghiên cứu Haloarchaea, với hệ thống các ruộng muối tự nhiên kéo dài từ Bắc vào Nam, điển hình là Hòn Khói (Khánh Hòa). Những khu vực này có nồng độ muối cao từ 165–375 g/L và nhiệt độ trung bình dao động từ 36,5°C đến 60,2°C, là điều kiện lý tưởng cho sự phát triển của các chủng vi khuẩn cổ chịu mặn. Tuy nhiên, nghiên cứu về vi khuẩn cổ chịu mặn tại Việt Nam vẫn đối mặt với nhiều thách thức lớn. Đặc điểm sinh trưởng chậm, yêu cầu môi trường siêu mặn ổn định trong thời gian dài và cấu trúc màng tế bào phức tạp khiến việc phân lập và nuôi cấy trở nên khó khăn. Các nghiên cứu về hệ gen và chức năng enzyme của Haloarchaea trên thế giới còn hạn chế và gần như chưa được khai thác tại Việt Nam. Vì vậy nghiên cứu này là hướng đi mới trong việc tìm kiếm nguồn các enzyme chuyển hóa polysaccharide từ Haloarchaea để định hướng ứng dụng trong lĩnh vực công nghiệp, xử lý môi trường.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật cổ chịu mặn từ ruộng muối Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa. Mục tiêu của nghiên cứu là xác định các chủng Haloarchaea có khả năng sinh enzyme thủy phân polysaccharide như chitinase, cellulase/xylanase và hyaluronidase, từ đó khám phá các đặc tính đặc biệt của các enzyme này, mở rộng tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sinh học và các lĩnh vực công nghiệp hiện đại.

MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cổ chịu mặn (Haloarchaea) theo định hướng có tiềm năng sinh enzyme bẻ gãy mạch một số loại polysaccharide.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Nội dung 1: Phân lập Haloarchaea từ mẫu nước muối thu thập tại một số cánh đồng muối ở Khánh Hòa.

Nội dung 2: Sàng lọc và tuyển chọn chủng Haloarchaea theo định hướng sinh enzyme bẻ gãy mạch một số loại polysaccharide (cellulose, xylanase, chitin, acid hyaluronic).

Nội dung 3: Định danh chủng Haloarchaea được lựa chọn.

Chương 1. TỔNG QUAN NGUYÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VI KHUẨN CỎ CHỊU MẶN (HALOARCHAEA)

1.1.1. Định nghĩa và đặc điểm sinh học của Haloarchaea.

1.1.1.1. Định nghĩa

Cỏ khuẩn hoặc vi sinh vật cỏ (danh pháp khoa học: Archaea) là các vi sinh vật đơn bào nhân sơ. Chúng không có nhân tế bào hay bất cứ bào quan nào trong tế bào chất. Archaea là một trong ba lĩnh vực sống chính, bên cạnh Bacteria và Eukarya. Archaea không chỉ là một nhóm vi sinh vật đơn giản mà là một lĩnh vực sinh học độc lập với những đặc điểm riêng biệt. Archaea thường sống trong các môi trường khắc nghiệt, như suối nước nóng, môi trường mặn, và các điều kiện cực đoan khác [15].

Trong đó Haloarchaea (Halobacteria, Halophilic Archaea) là một lớp sinh vật nhân sơ thuộc ngành vi khuẩn cỏ, được tìm thấy trong nước muối bão hòa hoặc gần bão hòa [16]. Các vi khuẩn cỏ cực kỳ ưa mặn này là một nhóm vi sinh vật cần nồng độ muối cao để phát triển tối ưu đồng thời chúng có các khả năng thích nghi trao đổi chất khác nhau để chịu được những điều kiện khắc nghiệt này. Chúng đã được phát hiện cả trong những điều kiện khắc nghiệt như mỏ muối cỏ hàng trăm triệu năm tuổi. Với khả năng thích nghi đặc biệt thông qua cơ chế như "muối vào", glycosyl hóa lớp bề mặt (S-layer) tăng cường amino acid có tính axit trên bề mặt protein, Haloarchaea trở thành nguồn tài nguyên độc đáo cho nghiên cứu và ứng dụng công nghệ sinh học. Trong đó, các enzyme được sản xuất bởi nhóm vi sinh vật này, bao gồm cellulase, xylanase, chitinase và hyaluronidase, thể hiện hoạt tính và tính ổn định vượt trội trong điều kiện môi trường siêu mặn [2, 17].

1.1.1.2. Đặc điểm hình thái

Archaea có cấu trúc giống, nhưng tiến hóa khác biệt so với vi khuẩn. Archaea khác với vi khuẩn ở nhiều đặc điểm chính, bao gồm cơ chế sao chép DNA và phiên mã, cấu trúc lipid màng và thành tế bào khác nhau, cùng với các cơ chế enzyme tương ứng, một số coenzyme độc đáo, và các sửa đổi RNA độc nhất [15]. Trong đó Haloarchaea được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm qua nghiên cứu về đặc điểm di truyền học, sinh lý học, sinh thái học, hóa sinh và

các ứng dụng tiềm năng của các phân tử sinh học mà chúng tổng hợp (sắc tố, enzyme, nhựa sinh học, kháng sinh, v.v.) [18, 19].

Đối với Haloarchaea, chúng hầu hết là vi khuẩn gram âm và có sắc tố đỏ, chúng có thể là vi sinh vật hiếu khí hoặc kỵ khí [20]. Hình dạng tế bào của Haloarchaea rất đa dạng và có thể được quan sát thấy dưới dạng đơn giản, chẳng hạn như hình que, hình cầu hoặc hình đĩa, hoặc dưới dạng bất thường hơn, chẳng hạn như hình tam giác, hình vuông hoặc hình đa hình, đặc biệt là khi chúng được nuôi cấy ở nhiệt độ cao hơn hoặc nồng độ NaCl thấp hơn cần thiết cho sự phát triển tối ưu của chúng [21, 22].

1.1.1.3. Môi trường sống

Archaea ban đầu được phân lập từ các môi trường cực đoan (ví dụ: nhiệt độ cao, pH thấp, độ mặn cao), dẫn đến việc nhiều người xem chúng như những sinh vật kỳ lạ và hiếm hoi. Tuy nhiên, trong vài năm qua, Archaea đã được phát hiện ở nhiều môi trường khác nhau. Những môi trường này bao gồm nước và trầm tích đại dương, nơi Archaea đóng vai trò quan trọng trong chu trình nitơ và carbon toàn cầu [23, 24], cũng như trong ống tiêu hóa của động vật (bao gồm cả con người), nơi vai trò và sự tham gia của chúng trong sức khỏe và bệnh tật chỉ mới bắt đầu được nghiên cứu [25]. Haloarchaea là những vi khuẩn cực kỳ ưa mặn, có khả năng chịu muối và phát triển tối ưu ở nồng độ 3,4–5,1mol/L (20–30%) NaCl. Chúng sống trong nhiều môi trường siêu mặn với độ mặn từ 10% đến nồng độ bão hòa (35%) [26].

1.1.2. Phân loài Haloarchaea

Vị trí phân loại trong hệ thống sinh học:

Haloarchaea thuộc ngành Euryarchaeota và lớp Halobacteria, bao gồm ba bộ chính: Halobacteriales, Haloferacales, và Natrilbales, với tổng số khoảng 71 chi đã được xác định. Trong đó, bộ Halobacteriales chứa họ Halobacteriaceae, bao gồm các chi tiêu biểu như *Halobacterium* (mô hình nghiên cứu di truyền và sinh hóa), *Haloarcula* (tổng hợp protein trong môi trường cực mặn), và *Halorubrum* (sản xuất enzyme bền muối). Bộ Haloferacales gồm họ Haloferacaceae với chi *Haloferax* (khả năng thích nghi linh hoạt, sản xuất PHA) và *Halogeometricum* (tham gia xử lý sinh học ô nhiễm). Bộ Natrilbales chứa họ Natrilbaceae, gồm *Natrilba* (thích nghi tốt

với môi trường kiềm-mặn) và *Natrinema* (hoạt tính enzyme chitinase cao). Ngoài ra, một số nhóm Haloarchaea chưa được phân loại rõ ràng như Nanohaloarchaea (hệ gen độc đáo, chưa thể nuôi cấy), Halalkaliarchaeum và Halocoides (sinh trưởng trong môi trường kiềm-mặn cực đoan) [20].

1.1.3. Vai trò và ứng dụng của vi khuẩn cổ

Haloarchaea là nhóm vi khuẩn cổ có khả năng sinh trưởng trong môi trường có nồng độ muối cao nhờ các cơ chế thích nghi đặc biệt, như tích lũy ion K^+ và tổng hợp enzyme bền muối. Chúng đóng vai trò quan trọng trong cân bằng hệ sinh thái mặn và có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp, y sinh và môi trường.

Trong công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm, haloenzymes và carotenoid từ Haloarchaea có tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống viêm và tạo màu tự nhiên. Một số loài như *Halogeometricum* sp., *Haloarcularia* sp., *Haloferax* sp. có khả năng kháng khuẩn mạnh, giúp ứng dụng trong bảo quản thực phẩm và dược phẩm [27, 28]. Ngoài ra, protease bền muối từ Haloarchaea được sử dụng trong sản xuất nước mắm và vật liệu sinh học, trong khi bacteriorhodopsin từ *Halobacterium salinarum* được ứng dụng trong công nghệ quang học như võng mạc nhân tạo và máy tính quang học.

Về mặt môi trường, một số loài Haloarchaea có thể sản xuất polyme phân hủy sinh học (PHA) và exopolysaccharide (EPS) có giá trị trong mỹ phẩm, dược phẩm và công nghiệp thực phẩm. Túi khí (gas vesicles) của chúng đang được nghiên cứu để vận chuyển thuốc trong y học. Đồng thời, Haloarchaea tham gia vào chu trình carbon và nitơ, hỗ trợ phân hủy chất hữu cơ và duy trì cân bằng sinh thái [29].

Trong lĩnh vực xử lý sinh học, một số loài như *Haloferax* và *Natrialba* có tiềm năng loại bỏ kim loại nặng và hóa chất độc hại từ môi trường ô nhiễm, đặc biệt ở khu vực ven biển. Các nghiên cứu metagenomic cũng chỉ ra vai trò quan trọng của chúng trong duy trì quá trình sinh địa hóa tại các hệ sinh thái mặn. Như vậy, Haloarchaea không chỉ có vai trò sinh thái quan trọng mà còn mang lại nhiều ứng dụng tiềm năng, từ công nghiệp, y sinh đến bảo vệ môi trường, mở ra hướng nghiên cứu mới trong khai thác enzyme và các hợp chất sinh học giá trị cao.

1.2. PHÂN LẬP VI KHUẨN CỎ CHỊU MẶN (HALOARCHAEA) TỪ MÔI TRƯỜNG TỰ NHIÊN

1.2.1. Nguồn thu mẫu để phân lập vi khuẩn cỏ chịu mặn

Vi khuẩn cỏ chịu mặn (Haloarchaea) là một nhóm vi sinh vật có khả năng sinh trưởng trong môi trường có nồng độ muối cao, thậm chí đạt mức bão hòa. Khả năng thích nghi đặc biệt giúp chúng tồn tại trong các hệ sinh thái khắc nghiệt như hồ muối, đất siêu mặn, môi trường biển, sản phẩm lên men và nhiều nguồn tự nhiên khác. Sự phân lập Haloarchaea từ các môi trường khác nhau không chỉ phản ánh tính đa dạng sinh học mà còn mở ra nhiều ứng dụng tiềm năng trong công nghiệp và sinh học.

Ruộng muối tự nhiên (solar): Đây là môi trường phổ biến để phân lập Haloarchaea nhờ điều kiện ánh sáng mạnh và nồng độ muối cao, tạo thuận lợi cho sự sinh tổng hợp sắc tố carotenoid. Tại Ấn Độ, các chủng như *Haloarcula rubripromontorii* BS2, *Haloferax lucentense* BBK2 và *Halogeometricum borinquense* E3 được phân lập từ ruộng muối ở Goa và Tamil Nadu, có khả năng chịu muối lên đến 25% (w/v). Tại Trung Quốc, các chủng *Halorubrum* sp. SS1 và *Halobacterium* sp. SS2 được tìm thấy trong muối biển tại Hoàng Hoa [30, 31].

Đất siêu mặn (hypersaline): Một số chủng mới như *Halomicroarcula saliterrae* sp. nov. và *Halomicroarcula onubensis* sp. nov. đã được phân lập từ đầm lầy muối Odiel Saltmarshes (Tây Ban Nha). Những chủng này có khả năng sản xuất carotenoid và phát triển trong điều kiện muối cao, mở ra tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp sinh học [32].

Môi trường biển (marine environments): Các vùng biển ven bờ và đất mặn kiềm ven biển cũng là môi trường lý tưởng cho Haloarchaea. Tại Trung Quốc, *Halomicroarcula laminariae* sp. nov. và *Halomicroarcula marina* sp. nov. được tìm thấy trong tảo nâu *Laminaria* và đất mặn ven biển tỉnh Giang Tô. Tại Iran, các chủng *Halorubrum* và *Natrinema* được nghiên cứu về khả năng chịu kim loại nặng và oxyanion, góp phần vào các ứng dụng xử lý môi trường [32, 33].

Dịch lên men nước mắm (Fish sauce fermentation broth): Một số chủng như *Halorubrum* sp. SS1, *Halobacterium* sp. SS2, *Halococcus* sp. AMS1 và

Halorhabdus sp. AMS6 đã được phân lập từ nước mắm lên men. Chúng được nghiên cứu về khả năng sản xuất enzyme công nghiệp như protease, amylase, chất hoạt động bề mặt và protein chống đông.

Hồ siêu mặn (Hypersaline lake): Tại Tunisia, *Halorubrum chaoviator*, *Natrinema pallidum* và *Haloarcua tradensis* được phân lập từ hồ siêu mặn Chott El Jerid. Các chủng này có khả năng tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) từ tinh bột, ứng dụng trong sản xuất vật liệu sinh học phân hủy tự nhiên.

Các nguồn khác: Tại Ấn Độ, *Halogeometricum borinquense* và *Haloferax volcanii* được phân lập từ ruộng muối và nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp sắc tố carotenoid. Tại Trung Quốc, nhiều chủng mới như *Halorarius litoreus*, *Haloglomus halophilum* và *Natronomonas marina* được tìm thấy trong trầm tích mặn ven biển, có tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sinh học.

Việc phân lập Haloarchaea từ các hệ sinh thái khác nhau đã chứng minh tính đa dạng sinh học và khả năng thích nghi vượt trội của nhóm vi khuẩn này. Các nghiên cứu không chỉ giúp hiểu rõ đặc điểm sinh hóa, di truyền của chúng mà còn mở ra cơ hội ứng dụng trong công nghiệp sinh học, xử lý môi trường, sản xuất dược phẩm và thực phẩm chức năng.

Tại Việt Nam, hệ sinh thái tự nhiên với đặc điểm địa lý đa dạng và điều kiện môi trường thuận lợi mang lại tiềm năng lớn cho nghiên cứu và phân lập Haloarchaea. Đặc biệt, các khu vực ruộng muối ven biển trải dài từ Bắc vào Nam như Hòn Khói (Khánh Hòa) và Hải Lý (Nam Định) là những địa điểm lý tưởng để thu thập mẫu phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn. Không chỉ vậy, các khu vực ven biển miền Trung và miền Nam, với các hệ sinh thái biển giàu dinh dưỡng và hệ sinh thái đất mặn kiềm ven biển, cũng là nguồn tiềm năng cho việc khai thác và phân lập các chủng vi khuẩn cổ. Ngoài ra, môi trường sản xuất nước mắm truyền thống tại các tỉnh ven biển miền Trung, với điều kiện muối cao và quá trình lên men tự nhiên, có thể là nguồn thu mẫu lý tưởng để nghiên cứu các chủng Haloarchaea sản sinh enzyme quan trọng cho công nghiệp thực phẩm và dược phẩm. Việc nghiên cứu và phân lập Haloarchaea tại Việt Nam không chỉ giúp làm phong phú thêm cơ sở dữ liệu

vi sinh vật chịu mặn mà còn đóng góp vào sự phát triển của các ngành công nghiệp sinh học, y học và công nghệ môi trường trong nước.

1.2.2. Phương pháp phân lập cổ khuẩn

Việc phân lập và tuyển chọn Haloarchaea từ tự nhiên là một quá trình phức tạp, cần kết hợp phương pháp sinh học cổ điển và công nghệ hiện đại. Dù có nhiều kỹ thuật tối ưu hóa, hiệu quả phân lập vẫn bị hạn chế do nhu cầu dinh dưỡng đặc thù, điều kiện môi trường khắc nghiệt và sự đa dạng sinh lý của chúng [14, 34]. Các phương pháp giải trình tự không nuôi cấy giúp mở rộng hiểu biết về Archaea, nhưng nghiên cứu nuôi cấy vẫn cần thiết để xác nhận các giả thuyết sinh học và tiến hóa. Vì vậy, cải tiến phương pháp phân lập vẫn là ưu tiên hàng đầu.

Phương pháp pha loãng và cấy trải: Đây là phương pháp cơ bản và phổ biến nhất, áp dụng cho mẫu từ môi trường tự nhiên như nước muối hoặc trầm tích. Mẫu được pha loãng theo cấp số nhân trong dung dịch NaCl phù hợp (20-30% w/v) và được trải lên môi trường rắn (thường là môi trường MGM - Modified growth medium). Thời gian nuôi cấy kéo dài từ 15 đến 30 ngày do tốc độ phát triển chậm của Archaea [30].

Phương pháp nuôi cấy trong môi trường chọn lọc: Môi trường nuôi cấy được thiết kế với các điều kiện sinh lý đặc thù như nồng độ muối cao, pH trung tính hoặc kiềm nhẹ, nhằm thúc đẩy sự phát triển của Archaea và hạn chế các vi sinh vật khác [35].

Phương pháp lọc màng: Được áp dụng cho các mẫu từ môi trường lỏng như nước biển hoặc dịch lên men. Mẫu được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 0,45 μm , sau đó đặt trực tiếp lên bề mặt môi trường rắn để nuôi cấy dưới điều kiện tối ưu [32].

Các phương pháp phân lập tiên tiến giúp tối ưu hóa khả năng nuôi cấy Archaea bằng cách điều chỉnh điều kiện môi trường và tận dụng công nghệ hiện đại. Phương pháp OSMAC điều chỉnh yếu tố môi trường để tối đa hóa tiềm năng sinh học. Nuôi cấy đồng sinh tái tạo mối quan hệ cộng sinh tự nhiên, hỗ trợ sự phát triển của Archaea. Phân lập đơn bào sử dụng công nghệ như flow cytometry để tách và nuôi cấy tế bào đơn. DIET thúc đẩy trao đổi điện tử giữa các loài, giúp nuôi cấy Archaea khó phân lập. HTC áp dụng hệ

thống tự động hóa để thử nghiệm hàng loạt điều kiện môi trường, tối ưu hóa quá trình nuôi cấy [31, 33, 36].

Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả phân lập

Sự thành công trong phân lập Archaea phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm thành phần môi trường nuôi cấy, điều kiện vật lý, quan hệ cộng sinh và thời gian ủ. Thành phần môi trường cần được điều chỉnh chính xác để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của từng chủng, trong khi nhiệt độ, pH, áp suất và độ mặn phải mô phỏng đúng môi trường tự nhiên để đảm bảo sự phát triển tối ưu. Ngoài ra, một số Archaea phụ thuộc vào mối quan hệ cộng sinh, khiến việc thiếu vắng các đối tác phù hợp có thể làm suy giảm khả năng sinh trưởng. Do tốc độ phát triển chậm, thời gian ủ kéo dài là cần thiết để các chủng đạt mật độ đủ lớn. Việc phát triển và tối ưu hóa các phương pháp phân lập không chỉ nâng cao hiệu quả nghiên cứu mà còn mở ra tiềm năng ứng dụng to lớn của Archaea trong công nghệ sinh học, y học và môi trường.

1.2.3. Định danh cổ khuẩn

Quá trình định danh các chủng Haloarchaea là một bước quan trọng trong nghiên cứu vi sinh vật học, nhằm xác định chính xác loài, đặc điểm di truyền và khả năng sinh học của các chủng phân lập. Định danh không chỉ giúp nhận diện chủng vi sinh vật mà còn tạo nền tảng cho việc đánh giá tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sinh học, môi trường và công nghiệp. Việc định danh Haloarchaea thường dựa trên sự kết hợp giữa các phương pháp truyền thống và hiện đại, bao gồm đặc điểm hình thái, xét nghiệm sinh hóa và phân tích di truyền.

1.2.3.1. Đặc điểm hình thái và quan sát khuẩn lạc

Phương pháp đầu tiên trong quá trình định danh là quan sát đặc điểm hình thái của khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy:

Màu sắc khuẩn lạc: Nhiều chủng Haloarchaea có khả năng sinh sắc tố carotenoid, tạo nên màu sắc đặc trưng như đỏ, cam hoặc hồng trên môi trường rắn [37].

Hình dạng và kích thước: Các khuẩn lạc thường có hình tròn, mép đều hoặc lồi nhẹ. Kích thước khuẩn lạc có thể thay đổi tùy thuộc vào điều kiện nuôi cấy và chủng vi khuẩn.

Cấu trúc tế bào: Quan sát dưới kính hiển vi quang học hoặc kính hiển vi điện tử giúp đánh giá hình thái tế bào, thường là hình cầu, que hoặc dẹt và đặc trưng bởi màng tế bào ether lipid chịu mặn cao [30].

1.2.3.2. Xét nghiệm sinh hóa

Các xét nghiệm sinh hóa được sử dụng để đánh giá khả năng chuyển hóa và sản xuất enzyme của Haloarchaea. Các thử nghiệm phổ biến bao gồm:

Xét nghiệm sử dụng nguồn carbon: Thử nghiệm khả năng sử dụng nguồn carbon khác nhau như glucose, sucrose, xylose hoặc các polysaccharide phức tạp.

Khả năng chịu muối: Đánh giá giới hạn chịu mặn của chủng bằng cách nuôi cấy trên môi trường có nồng độ NaCl dao động từ 10% đến 35% [32].

1.2.3.3. Phân tích di truyền và định danh phân tử

Phương pháp định danh Archaea dựa trên gen 16S rRNA là một công cụ quan trọng trong nghiên cứu vi sinh vật học, giúp xác định mối quan hệ tiến hóa và phân loại các chủng mới. Mặc dù cả vi khuẩn và cổ khuẩn đều sở hữu gen 16S rRNA, nhưng Archaea có một số vùng trình tự đặc trưng khác biệt, đặc biệt là trong các vùng biến đổi (V2, V4 và V6), cho phép phân biệt chúng với vi khuẩn. Để đảm bảo độ chính xác trong quá trình nhận diện, các môi đặc hiệu cho Archaea được thiết kế dựa trên những trình tự bảo tồn riêng biệt của nhóm này, giúp tăng cường độ nhạy và độ đặc hiệu khi thực hiện PCR. Ngoài ra, phương pháp giải trình tự 16S rRNA kết hợp với phân tích sinh tin học cho phép nhận diện chính xác các loài Archaea chưa được nuôi cấy, đồng thời cung cấp thông tin quan trọng về sự đa dạng và vai trò sinh thái của chúng trong môi trường tự nhiên [38].

1.2.3.4. Đánh giá khả năng sinh học đặc thù

Bên cạnh định danh phân tử và sinh hóa, việc đánh giá khả năng sinh học của Haloarchaea giúp xác định tiềm năng ứng dụng của chúng. Các nghiên cứu tập trung vào khả năng sản xuất enzyme chuyển hóa polysaccharide (cellulase, chitinase, xylanase, hyaluronidase) trong môi trường mặn cao, tổng hợp sắc tố sinh học carotenoid có giá trị trong thực phẩm và dược phẩm, cũng như khả năng chịu nhiệt, chịu mặn và ổn định pH để ứng dụng trong công nghiệp. Quá trình định danh Haloarchaea đòi hỏi sự

kết hợp giữa phương pháp truyền thống và hiện đại, từ quan sát hình thái khuẩn lạc đến phân tích di truyền tiên tiến, giúp xác định chính xác loài và khám phá tiềm năng sinh học của chúng trong công nghệ sinh học, dược phẩm và xử lý môi trường.

1.3. ENZYME BỂ NGẮN MẠCH POLYSACCHARIDE TỪ VI KHUẨN CHỊU MẶN

1.3.1. Tổng quan về chitinase có nguồn gốc từ Haloarchaea

Chitin là một polysaccharide bền vững, cấu tạo từ N-acetylglucosamine liên kết β -1,4, có trong thành tế bào nấm, vỏ giáp xác và bộ xương ngoài côn trùng [39]. Do khó phân hủy sinh học, chitin tích tụ từ nguồn thải công nghiệp, đòi hỏi giải pháp xử lý hiệu quả, trong đó chitinase (EC 3.2.1.14) đóng vai trò quan trọng. Chitinase thuộc nhóm glycosyl hydrolase, xúc tác quá trình phân giải chitin, có ứng dụng trong kiểm soát nấm gây bệnh thực vật, thuốc trừ sâu sinh học và xử lý chất thải hải sản [40].

Các nghiên cứu đã xác định nhiều chitinase từ cổ khuẩn cực mặn (Haloarchaea). Enzyme ChiN1 từ *Halobacterium salinarum* NRC-1 được biểu hiện thành công trong *Haloarcula japonica* TR-1, cho thấy hoạt tính tối ưu ở 55°C, 1 M NaCl và ổn định trong khoảng 1–4,5 M NaCl [41]. Một chitinase khác từ *Hbt. salinarum* được biểu hiện trong *Escherichia coli* bằng bioreactor khuấy cơ học, đạt hoạt tính tối đa tại 1,5 M NaCl, trong khi HschiA1 từ cùng loài thể hiện hoạt tính tối ưu ở pH 7,3, 40°C và 1,5 M NaCl [42].

Ngoài ra, *Haloferax mediterranei* có khả năng phân giải chitin đồng thời tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), một loại bioplastic tiềm năng [43]. Nhiều chủng Haloarchaea khác như *Halomicrobium*, *Haloterrigena*, *Natrinema* và *Salinarchaeum* từ hồ nước mặn cũng sản xuất chitinase bền muối cao, với hoạt tính tối ưu trong khoảng 2–3 M NaCl [44]. Những nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng lớn của chitinase từ cổ khuẩn trong công nghiệp sinh học và môi trường.

1.3.2. Tổng quan về cellulase có nguồn gốc từ Haloarchaea

Cellulose là polysaccharide tự nhiên phổ biến nhất trên Trái Đất, bao gồm các đơn vị glucose liên kết β -1,4-glycosidic, đóng vai trò cấu trúc chính

trong thành tế bào thực vật và là nguồn tài nguyên quan trọng trong công nghiệp nhiên liệu sinh học, giấy, dệt may và thực phẩm. Tuy nhiên, do cấu trúc tinh thể bền vững và tính không tan trong nước, việc phân hủy cellulose phụ thuộc vào hệ enzyme cellulase.

Cellulase thuộc họ glycoside hydrolase (GH), xúc tác thủy phân liên kết 1,4- β -D-glycosidic trong cellulose, hemicellulose và lichenin. Hệ enzyme này bao gồm ba nhóm chính: endoglucanase (EC 3.2.1.4) cắt đứt liên kết nội mạch, exoglucanase (EC 3.2.1.91) thủy phân từ đầu mạch cellulose tạo cellobiose và β -glycosidase (EC 3.2.1.21) phân giải cellobiose thành glucose [45].

Các chủng cổ khuẩn chịu mặn (Haloarchaea) tiết cellulase có hoạt tính ổn định trong điều kiện khắc nghiệt. *Haloarcularia* sp. LLSG7 sở hữu hệ enzyme bền nhiệt, kiềm và muối, trong khi chủng *Haloarcularia* sp. G10 chỉ biểu hiện hoạt tính endoglucanase (36 kDa) [46, 47]. Một cellulase từ *Haloferax sulfurifontis* có khả năng hoạt động ở pH 3–9, nồng độ NaCl 0–5M và nhiệt độ 20–80°C, cho thấy tiềm năng ứng dụng công nghiệp [48].

Cellulase có vai trò quan trọng trong dệt may, sản xuất rượu vang, chế biến thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, nông nghiệp, bột giấy và giấy, đặc biệt là sản xuất nhiên liệu sinh học từ lignocellulose [49]. Quá trình xử lý nguyên liệu thường kết hợp phương pháp hóa học và enzyme. Do khả năng chịu muối cao, cellulase từ Haloarchaea giúp giảm tiêu thụ nước và năng lượng trong giai đoạn loại bỏ muối sinh ra.

Với nhu cầu năng lượng ngày càng tăng và các thách thức trong thương mại hóa nhiên liệu sinh học, cellulase từ Haloarchaea có thể nâng cao hiệu suất và tính kinh tế của quá trình sản xuất nhiên liệu từ lignocellulose [50]. Một số chủng như *Halorhabdus utahensis* tổng hợp CBH bền nhiệt, chịu muối cao và dung môi ion lỏng, trong khi *Haloterrigena turkmenica* có hoạt tính phân giải cellulose vượt trội, dù tốc độ sinh trưởng chậm [51, 52].

Trong ngành dệt may, *Halorubrum saccharovorum* (GUMFAS1) và *Halococcus saccharolyticus* (GUFF70) có khả năng xử lý nước thải nhuộm tổng hợp nhờ hệ enzyme cellulase và xylanase trong môi trường muối cao, mang lại lợi thế so với enzyme từ vi khuẩn thông thường [48].

Nhờ khả năng hoạt động ổn định trong điều kiện khắc nghiệt, cellulase từ Haloarchaea mở ra tiềm năng lớn trong công nghệ sinh học, đặc biệt trong việc cải thiện hiệu suất các quy trình công nghiệp liên quan đến phân hủy sinh khối.

1.3.3. Tổng quan về axit hyaluronic có nguồn gốc từ Haloarchaea

Axit hyaluronic (HA) là một polysaccharide tự nhiên thuộc nhóm glycosaminoglycan, được cấu thành từ các đơn vị lặp lại của D-glucuronic acid và N-acetyl-D-glucosamine liên kết thông qua liên kết β -1,3 và β -1,4 glycosidic. HA có vai trò quan trọng trong việc duy trì cấu trúc và độ ẩm của các mô liên kết ở động vật, đặc biệt là trong da, khớp và mắt. Với khả năng giữ nước vượt trội và tính chất bôi trơn, HA đã trở thành một hợp chất quan trọng trong y học, dược phẩm, mỹ phẩm và kỹ thuật mô.

Gần đây, các nghiên cứu đã mở rộng phạm vi tìm kiếm nguồn sản xuất HA từ vi sinh vật, trong đó cổ khuẩn chịu mặn cao (Haloarchaea) đã nổi lên như một nguồn tiềm năng đầy hứa hẹn. Các Haloarchaea, thuộc lớp Halobacteria, có khả năng sống và phát triển trong điều kiện khắc nghiệt như nồng độ muối cao (3,4–5,1 M NaCl), nhiệt độ và pH thay đổi mạnh. Nhờ vào các đặc tính sinh học độc đáo, Archaea có thể tổng hợp các polysaccharide ngoại bào (EPS) như HA, với tính chất ổn định cao và khả năng hoạt động tốt trong môi trường cực đoan.

Nghiên cứu cho thấy, các chủng Haloarchaea như *Haloferax mediterranei* và *Haloarcula japonica* không chỉ có khả năng phân hủy polysaccharide mà còn có tiềm năng sản xuất các polymer sinh học, bao gồm cả HA và polyhydroxyalkanoates (PHA). Những polysaccharide này thể hiện tính ổn định và hoạt tính sinh học vượt trội trong môi trường giàu muối, mở ra hướng ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm sinh học, mỹ phẩm và y dược.

Các nghiên cứu về hệ gen của Haloarchaea đã tiết lộ sự hiện diện của các gen mã hóa cho các enzyme liên quan đến quá trình tổng hợp HA, chẳng hạn như UDP-glucose dehydrogenase và hyaluronan synthase. Việc sử dụng công nghệ giải trình tự thế hệ mới đã giúp phát hiện các gen quan trọng trong quá trình tổng hợp polysaccharide từ Haloarchaea, từ đó mở ra cơ hội phát triển

các phương pháp sản xuất HA mới mang tính bền vững và thân thiện với môi trường.

Một điểm đặc biệt của HA từ Haloarchaea là khả năng chịu được các điều kiện khắc nghiệt, bao gồm nồng độ muối cao và áp suất thẩm thấu mạnh, giúp tăng độ bền và tính ổn định của sản phẩm. Điều này mang lại nhiều tiềm năng ứng dụng trong các ngành công nghiệp như mỹ phẩm cao cấp, y học tái tạo, và xử lý sinh học nước thải.

1.3.4. Một số enzyme thủy phân khác từ Haloarchaea

Các enzyme có nguồn gốc từ Haloarchaea khác như amylase - enzyme thủy phân tinh bột, lipase - enzyme thủy phân các triglyceride axit béo chuỗi dài thành axit béo và glycerol, protease - enzyme thủy phân có khả năng phân hủy protein (về độ pH, nhiệt độ, v.v.) rất được quan tâm đối với các quy trình công nghiệp. Ngoài ra protease, gelatinase, DNase, lipase, xylanase và amylase còn có tiềm năng ứng dụng trong các ngành công nghiệp muối và chất tẩy rửa [19].

Haloenzyme có một số ưu điểm, chẳng hạn như có thể tối thiểu các bước trong quá trình tinh chế, khử trùng và hiệu quả về mặt chi phí [53]. Ở điều kiện nồng độ muối cao, các enzym ưa mặn có thể không cần tinh chế hoặc khử trùng để sử dụng ứng dụng vì các protein gây ô nhiễm không mong muốn hoặc các phân tử sinh học khác không hoạt động trong những điều kiện này [54]. Enzyme như lipase và alcohol dehydrogenase từ *Haloferax volcanii* và *Haloarcula* sp.G41 đã được cố định thành công để tăng cường hiệu suất hoạt động [55, 56]. Các enzyme lipase và esterase chịu mặn từ *Haloarcula marismortui* và *Natronococcus* sp.TC6, rất quan trọng trong nhiều ứng dụng công nghệ sinh học, chẳng hạn như sản xuất nhiên liệu sinh học, chất tẩy rửa, và dệt may [57, 58]. Protease được sử dụng làm enzyme trong chế biến thực phẩm (ví dụ làm mềm thịt), công nghiệp da, dược phẩm và chất tẩy rửa, cũng như trong các lĩnh vực công nghệ sinh học và quy trình phục hồi sinh học (ví dụ xử lý chất thải) [59].

Xylan là một thành phần chính của hemicellulose, là polysaccharide tái tạo phong phú thứ hai trong tự nhiên, chỉ sau cellulose. Gần đây, các enzyme phân giải xylan đã thu hút nhiều sự chú ý do ứng dụng của chúng trong nhiều

lĩnh vực như tẩy trắng bột giấy [60], làm trong nước trái cây, chế biến thức ăn cho động vật để dễ tiêu hóa hơn, cải thiện chất lượng bánh mì [61, 62], và sản xuất bioethanol cũng như biodiesel từ sinh khối [63].

Từ các nghiên cứu và tổng quan trên, có thể thấy rằng Haloarchaea là nguồn cung cấp các enzyme phân giải polysaccharide đầy tiềm năng, đặc biệt là trong môi trường khắc nghiệt có nồng độ muối cao. Những enzyme này, bao gồm chitinase, cellulase và hyaluronan synthase (liên quan đến quá trình tổng hợp axit hyaluronic - HA), không chỉ thể hiện khả năng phân cắt hiệu quả các hợp chất hữu cơ phức tạp mà còn duy trì hoạt tính ổn định trong điều kiện nhiệt độ, pH và áp suất thẩm thấu khắc nghiệt. Điều này tạo nền tảng cho các ứng dụng quan trọng trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp sinh học, xử lý môi trường, y học tái tạo và mỹ phẩm.

1.4. TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG CỦA VI KHUẨN CỎ SINH ENZYME CHUYỂN HÓA POLYSACCHARIDE.

1.4.1. Ứng dụng trong xử lý sinh học và công nghiệp năng lượng

Enzyme cellulase từ vi khuẩn cỏ chịu mặn có thể được sử dụng trong sản xuất nhiên liệu sinh học từ các nguyên liệu chứa cellulose, đồng thời giúp tăng cường quá trình phân hủy sinh học. Cellulase có khả năng phân giải cellulose thành đường đơn, là nguyên liệu cần thiết cho quá trình lên men để sản xuất ethanol và các loại nhiên liệu sinh học khác. Ngoài ra cellulase có thể được sử dụng để cải thiện quá trình sản xuất biogas từ các loại chất thải nông nghiệp, rác thải hữu cơ và các nguyên liệu khác giàu cellulose. Sử dụng cellulase từ vi khuẩn cỏ không chỉ mang lại lợi ích cho ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học mà còn góp phần vào việc phát triển bền vững và bảo vệ môi trường. Xylanase phân hủy xylan thành xylose, được dùng trong ngành giấy để tẩy trắng không hóa chất, chế biến thực phẩm và sản xuất phụ gia thức ăn chăn nuôi. Chitinase thủy phân chitin từ vỏ tôm cua thành N-acetylglucosamine, có giá trị trong y học, công nghiệp thủy sản và nông nghiệp [17].

1.4.2. Ứng dụng trong dược phẩm và mỹ phẩm:

Chitinase và hyaluronidase có thể được ứng dụng để sản xuất các sản phẩm dược phẩm, mỹ phẩm nhờ khả năng chuyển hóa các polysaccharide

sinh học, hỗ trợ quá trình chữa lành và tái tạo mô. Hyaluronidase có khả năng phân giải hyaluronic acid, một thành phần quan trọng trong mô liên kết. Việc này giúp cải thiện lưu thông máu và tạo điều kiện cho quá trình chữa lành vết thương. Trong ngành mỹ phẩm, hyaluronidase có thể được sử dụng để điều chỉnh nồng độ hyaluronic acid trong các sản phẩm chăm sóc da, giúp cải thiện độ ẩm và đàn hồi của da. Chitinase có thể được ứng dụng trong điều trị các bệnh liên quan đến nấm, vì nó phân giải chitin, một thành phần chính của màng tế bào nấm. Điều này mở ra khả năng phát triển các loại thuốc kháng nấm hiệu quả hơn. Cả chitinase và hyaluronidase có thể được nghiên cứu để phát triển các sản phẩm bổ sung cho sức khỏe, giúp tăng cường khả năng chữa lành và tái tạo của cơ thể.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn cổ (Archaea) có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường có nồng độ muối cao. Cụ thể là các chủng vi khuẩn được phân lập từ mẫu nước muối, muối tinh thể và trầm tích thu ở các ruộng muối Hòn Khói, Ninh Diêm, Ninh Hòa. Các mẫu dùng để phân lập cổ khuẩn được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang (nay là Viện Hải dương học). Đây là nguồn mẫu thuộc đề tài nghiên cứu HALOPHARM: Vi khuẩn cổ chịu mặn - nguồn enzyme mới cho dược liệu.

2.1.2. Hóa chất sử dụng

Peptone (Sigma), YE (cao chiết xuất nấm men) (Merck), agar (Sigma), NaCl (Merck), MgCl₂ (Sigma), MgSO₄ (Sigma), KCl (Sigma), CaCl₂ (Sigma), chitin (Sigma), CMC (Sigma), HA (Hyaluronic acid) (Sigma), sodium azide (Sigma), NaOH (Sigma), dung dịch congo red (Sigma), albumin huyết thanh bò (Sigma), acid acetic (Sigma), kháng sinh anisomycin (Santa Cruz- Mỹ), xylan Megazyme- Ireland.

2.1.3. Dụng cụ, thiết bị:

Tủ an toàn sinh học (Telstar AV-100), cân phân tích (KD-TBED-600), tủ ẩm (Memmert), máy khuấy từ gia nhiệt (Velp scientifica), tủ mát 4°C (Sanyo), nồi hấp tiệt trùng (Tomy ES-315), tủ sấy (France etuves), micropipet, cốc, thìa, bình tam giác thủy tinh các loại, đĩa petri, que cấy trang, đèn cồn.

2.2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu, phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn (Haloarchaea)

2.2.1.1. Phương pháp thu thập mẫu

Mẫu được thu thập tại cánh đồng muối Hòn Khói, Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa (14°34'23" N; 109°13'42" E), một trong những khu vực sản xuất muối lớn nhất miền Trung Việt Nam vào tháng 6 năm 2023. Các mẫu được lấy chủ yếu từ lớp nước muối còn lại sau quá trình kết tinh muối, có độ mặn

cao là môi trường đặc trưng cho vi khuẩn cổ chịu mặn. Một số mẫu có bổ sung trầm tích và thảm vi sinh.

Mẫu được thu thập từ các vị trí được chọn thuộc khu vực ruộng muối, chứa trong chai nhựa vô trùng, bảo quản ở 4°C và chuyển về phòng thí nghiệm.

Tại thời điểm lấy mẫu, các thông số môi trường bao gồm nhiệt độ, độ mặn và pH của nước muối được đo trực tiếp tại hiện trường. Các phép đo này lần lượt được thực hiện bằng nhiệt kế, khúc xạ kế và máy đo pH nhằm thu thập dữ liệu phục vụ cho quá trình phân tích sau này (kết quả được trình bày tại **Bảng 2.1**).

Bảng 2.1. Đặc điểm mẫu và mô tả địa điểm lấy mẫu

Tên địa điểm	Ký hiệu mẫu	Độ mặn (g/L)	Ph	mV	Nhiệt độ (°C)	Loại mẫu
Hòn Khói	VS1	340	6,9	12	44	Nước muối
Hòn Khói	VS7	165	7,6	-50	36,5	Nước muối và trầm tích
Hòn Khói	VS8	320	6,9	32	42,8	Nước muối
Hòn Khói	VS9sed	340	6,8	243	60,2	Nước muối, thảm vi sinh và trầm tích

2.2.1.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn

Quá trình phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn được tiến hành nhằm thu nhận các chủng thuần có khả năng sinh trưởng trong điều kiện môi trường có nồng độ muối cao. Phương pháp được thực hiện dựa trên việc cấy mẫu vào môi trường tăng trưởng chuyên biệt với nồng độ muối cao, sau đó tiến hành các

bước chuyển dòng và bảo quản. Các bước thực hiện gồm:

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy (MGM)

Môi trường nuôi cấy chuyên biệt cho vi khuẩn cổ chịu mặn (MGM - Modified Growth Medium) được chuẩn bị với thành phần như sau: 1% (w/v) peptone đậu nành (soy peptone), 0,5% (w/v) chiết xuất nấm men (yeast extract), 1,5% (w/v) agar (chất đông đặc), hỗn hợp muối với tổng nồng độ 23% (w/v), bao gồm: 3,1 M NaCl, 0,1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07 M KCl, 5×10^{-3} M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dung dịch CaCl_2 được tiệt trùng riêng biệt trước khi thêm vào môi trường). Độ pH của môi trường được điều chỉnh trong khoảng từ 7,2 đến 7,4 bằng cách sử dụng dung dịch HCl hoặc NaOH. Sau khi điều chỉnh pH, môi trường được tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút bằng nồi hấp tiệt trùng (autoclave). Sau khi hấp tiệt trùng, môi trường được rót vào các đĩa petri vô trùng trong điều kiện tủ an toàn sinh học. Các đĩa được để nguội tự nhiên cho đến khi thạch đông cứng hoàn toàn [3].

Thực hiện quá trình phân lập: Từ mỗi mẫu, lấy 100 μL dịch mẫu đã được chuẩn bị và trải đều lên bề mặt môi trường MGM bằng que cấy hoặc tăm bông vô trùng. Các đĩa được ủ trong điều kiện nhiệt độ 40°C và giữ trong khoảng thời gian từ 15 đến 30 ngày. Trong quá trình ủ, sự hình thành của các khuẩn lạc trên bề mặt thạch được theo dõi định kỳ. Các khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường được chuyển nhiều lần sang môi trường MGM mới để thực hiện quá trình thuần hóa (tạo dòng thuần). Việc chuyển dòng liên tục giúp đảm bảo tính đồng nhất và ổn định của các chủng vi khuẩn được phân lập.

Bảo quản chủng vi khuẩn: Sau khi thuần hóa, các chủng vi khuẩn cổ chịu mặn được bảo quản theo hai hình thức:

- + Bảo quản ngắn hạn: Các chủng được lưu trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C để phục vụ các thí nghiệm tiếp theo trong thời gian ngắn.
- + Bảo quản dài hạn: Các chủng được lưu giữ trong nitơ lỏng hoặc đông sâu ở nhiệt độ -80°C nhằm duy trì tính ổn định và bảo vệ cấu trúc tế bào trong thời gian dài.

2.2.1.3. Sàng lọc chủng vi khuẩn cổ nhạy cảm với kháng sinh anisomycin.

Thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh được thực hiện nhằm lựa chọn các chủng vi khuẩn cổ chịu mặn có tiềm năng sinh enzyme từ tất cả các mẫu phân lập. Thí nghiệm được tiến hành dựa trên phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (disk diffusion method), sử dụng kháng sinh anisomycin (Santa Cruz Biotechnology, USA) với hàm lượng 30 µg/đĩa theo hướng dẫn của các nghiên cứu trước đây [1, 64, 65].

Các chủng vi khuẩn cổ được nuôi cấy trong môi trường MGM lỏng có bổ sung muối ở điều kiện tối ưu. Sau khi phát triển, các tế bào được thu gom và pha loãng bằng dung dịch NaCl 0,85% vô trùng để đạt được mật độ vi sinh vật tương đương với chuẩn 0,5 McFarland (tương đương khoảng $1,5 \times 10^8$ CFU/mL), sau đó tiến hành các bước thí nghiệm sau:

- Chuẩn bị môi trường thạch: Môi trường thạch MGM được rót vào các đĩa petri vô trùng và để nguội đến khi đông đặc. Trước khi cấy, bề mặt thạch cần được để khô ở điều kiện vô trùng trong khoảng 10–15 phút để tránh ảnh hưởng đến sự khuếch tán của kháng sinh.

- Cấy vi khuẩn lên đĩa thạch: Dùng tăm bông vô trùng thấm đều dung dịch huyền phù vi khuẩn, sau đó trải đều lên toàn bộ bề mặt đĩa thạch theo ba hướng vuông góc để đảm bảo sự phân bố đồng đều. Để đĩa khô tự nhiên trong khoảng 10–15 phút ở điều kiện vô trùng.

- Đặt đĩa kháng sinh: Các đĩa kháng sinh chứa 30 µg anisomycin được đặt lên bề mặt thạch bằng kẹp vô trùng. Cần ấn nhẹ để đĩa tiếp xúc tốt với bề mặt môi trường nhằm đảm bảo sự khuếch tán hiệu quả của kháng sinh vào thạch.

- Ủ đĩa thạch: Các đĩa thạch sau khi cấy và đặt kháng sinh được đặt trong tủ ấm tại nhiệt độ từ 37°C đến 42°C trong thời gian 7–20 ngày, tùy theo tốc độ sinh trưởng của từng chủng vi khuẩn cổ.

- Đọc kết quả: Sau thời gian ủ, các đĩa được kiểm tra sự xuất hiện của các vòng trong suốt (vòng ức chế) xung quanh đĩa kháng sinh.

- + Chủng nhạy cảm: Khi xuất hiện vòng ức chế rõ ràng xung quanh đĩa kháng sinh, chứng tỏ chủng vi khuẩn có khả năng bị ức chế bởi anisomycin.

+ Chủng kháng: Khi không xuất hiện hoặc xuất hiện vòng ức chế nhỏ, chứng tỏ chủng vi khuẩn có khả năng kháng hoặc chịu được anisomycin.

2.2.2. Phương pháp xác định tiềm năng sinh enzyme thủy phân polysaccharide từ các chủng vi khuẩn thu được.

2.2.2.1. Sàng lọc *Haloarchaea* theo định hướng sinh enzyme thủy phân chitin.

Để sàng lọc định tính khả năng sinh enzyme chitinase của các chủng cổ khuẩn, sử dụng môi trường MGM không chứa pepton, bổ sung 1% (w/v) chitin làm nguồn carbon duy nhất [3]. Môi trường được hấp ở điều kiện 121°C trong 15 phút, sau đó mang đi đổ vào đĩa petri, khi đổ xong để các đĩa môi trường trong tủ an toàn sinh học cho đến khi thạch nguội, đông cứng.

Năm chủng vi sinh vật tuyển chọn được cấy sinh khối lên môi trường thử nghiệm, ủ ở nhiệt độ 40°C trong vòng 30 ngày. Sự xuất hiện của vòng phân giải trong suốt xung quanh khuẩn lạc là dấu hiệu chứng tỏ khả năng sinh enzyme chitinase.

2.2.2.2. Sàng lọc *Haloarchaea* theo định hướng sinh enzyme thủy phân cellulose/xylan:

Pha môi trường thạch MGM không chứa peptone, bổ sung 23% (w/v) muối và 1% (w/v) carboxymethyl cellulose (CMC) làm nguồn carbon duy nhất. Môi trường sẽ được hấp ở điều kiện 121°C trong 15 phút. Sau đó mang đi đổ vào đĩa petri, sau khi đổ xong để các đĩa môi trường trong tủ an toàn sinh học cho đến khi thạch nguội, đông cứng.

Dùng que cấy trang cấy các chủng vi khuẩn cổ đã được làm thuần và thử nghiệm độ nhạy với kháng sinh anisomycin lên môi trường thạch, ủ ở 40°C trong 15-30 ngày. Sau đó đĩa môi trường sẽ được nhuộm với dung dịch thuốc nhuộm iodine trong 15 phút, cuối cùng đĩa thạch được rửa lại với nước nhiều lần, chủng vi sinh thủy phân CMC sẽ tạo vùng không màu xung quanh điểm sinh khối vi sinh vật phát triển.

2.2.2.3. Sàng lọc *Haloarchaea* sinh hyaluronidase

Hoạt tính hyaluronidase được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Môi trường thạch được chuẩn bị với các thành phần: 1% thạch Noble,

0,4 mg/mL hyaluronic acid, 1% muối NaCl, albumin huyết thanh bò (BSA) và 0,1% sodium azide; môi trường được hấp ở điều kiện 121°C trong 15 phút. Môi trường sau khi hấp được mang đi đổ vào đĩa petri, sau khi đổ xong để các đĩa môi trường trong tủ an toàn sinh học cho đến khi thạch nguội, đông cứng, đồng thời tạo các giếng có đường kính 6mm trên đĩa thạch.

Để kiểm tra hoạt tính enzyme, 0,1 mL dung dịch nuôi cấy vi sinh trong môi trường MGM được thêm vào từng giếng. Sau đó các đĩa được ủ ở 37°C trong 3–5 ngày, tiếp theo nhuộm đĩa thạch với dung dịch acetic acid 2N trong 30 phút. Trong môi trường này, hyaluronic acid không bị phân hủy sẽ tạo thành kết tủa, làm vùng thạch xung quanh giếng trở nên mờ đục. Các vùng trong suốt xuất hiện quanh giếng là dấu hiệu của hoạt tính enzyme hyaluronidase, cho thấy sự phân hủy hyaluronic acid bởi enzyme do vi sinh vật tiết ra.

2.2.2.4. Phương pháp phân loại chủng vi khuẩn cổ chịu mặn tuyển chọn

❖ Thu nhận DNA tổng của các chủng *Haloarchaea* tuyển chọn

Quy trình tách chiết DNA tổng được thực hiện với sự hỗ trợ của bộ kit tách chiết DNA chuyên dụng dành cho vi khuẩn cổ chịu mặn, cụ thể là bộ kit GNOME DNA (MP Biomedicals). Quy trình thực nghiệm như sau:

Ly giải tế bào: Màng lọc chứa tế bào vi khuẩn cổ và mẫu trầm tích được đưa vào dung dịch đệm ly giải đặc biệt, có chứa enzyme lysozyme để phá vỡ lớp màng tế bào chắc chắn của vi khuẩn cổ. Mẫu được ủ ở 37°C trong 30 phút, sau đó được xử lý thêm bằng sodium dodecyl sulfate và proteinase K ở 55°C trong 1-2 giờ để loại bỏ protein và các tạp chất khác.

Loại bỏ tạp chất và tinh sạch DNA: Sau khi ly giải tế bào, mẫu được xử lý bằng dung dịch phenol-chloroform-isoamyl alcohol (tỉ lệ 25:24:1) nhằm loại bỏ các thành phần không phải DNA như protein và lipid. Hỗn hợp sau đó được ly tâm để tách lớp nước chứa DNA ra khỏi các lớp tạp chất. Quá trình tinh sạch này được thực hiện ít nhất hai lần để đảm bảo loại bỏ hoàn toàn tạp chất, giúp thu được DNA có độ tinh khiết cao.

Kết tủa và thu nhận DNA: Lớp trên cùng chứa DNA sau khi tinh sạch được đưa vào dung dịch isopropanol lạnh và ủ ở -20°C trong 1 giờ để DNA

kết tủa. DNA sau đó được ly tâm và rửa bằng ethanol 70% để loại bỏ các tạp chất còn sót lại. DNA thu được được hòa tan trong dung dịch TE hoặc nước cất vô trùng và bảo quản ở -20°C.

Kiểm tra chất lượng và định lượng DNA: DNA tổng được kiểm tra chất lượng và độ tinh khiết bằng cách điện di trên gel agarose 0,8% và đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260/280nm bằng thiết bị Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher). Trong nghiên cứu này, độ tinh sạch và nồng độ DNA của các mẫu vi khuẩn cổ được xác định bằng máy đo quang phổ UV-Vis (máy cho phép xác định nồng độ DNA thông qua khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm, nơi DNA có khả năng hấp thụ mạnh nhất) nhằm đảm bảo DNA có chất lượng cao, thích hợp cho các phân tích PCR và giải trình tự gen.

❖ **Phương pháp PCR đoạn 16S rRNA của chủng cổ khuẩn tuyển chọn**

Để xác định đặc điểm phân loại của các chủng Haloarchaea tuyển chọn, gen 16S rDNA đã được khuếch đại bằng phương pháp phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 25 µL, bao gồm 12,5 µL dung dịch Master Mix (chứa Taq polymerase, buffer, MgCl₂ và dNTPs), 1 µL mỗi xuôi 4F (5'-TCCGGTTGATCCTGCRG-3', 10 µM), 1 µL mỗi ngược 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', 10 µM), 2 µL mẫu DNA khuôn (20-50 ng/µL) và 8,5 µL nước cất không chứa DNase/RNase. Chu trình PCR được tiến hành trên máy nhân gen nhiệt với điều kiện gồm biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, theo sau là 35 chu kỳ gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, bắt cặp ở 55°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 90 giây, kết thúc với bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5% trong đệm TAE, sử dụng chất nhuộm ethidium bromide hoặc chất thay thế an toàn, và chạy điện di ở 100 V trong 40 phút. Sau đó, sản phẩm được quan sát dưới đèn UV và so sánh với thang DNA chuẩn để xác định kích thước, với đoạn khuếch đại dự kiến khoảng 1,5 kb. Sản phẩm khuếch đại (amplicon) được làm sạch và giải trình tự trên nền tảng Illumina MiSeq tại MacroGen Inc, Hàn Quốc (<http://dna.macrogen.com/main.do>).

❖ **Xây dựng và phân tích cây phát sinh loài**

Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự gen 16S rRNA của

các chủng vi khuẩn cổ được tuyển chọn. Phương pháp phân tích được thực hiện theo thuật toán Neighbor-Joining bằng phần mềm MEGAXI. Độ tin cậy của các nhánh trên cây được đánh giá thông qua phương pháp Bootstrap với 1000 lần lặp lại nhằm đảm bảo tính chính xác và độ ổn định của mô hình.

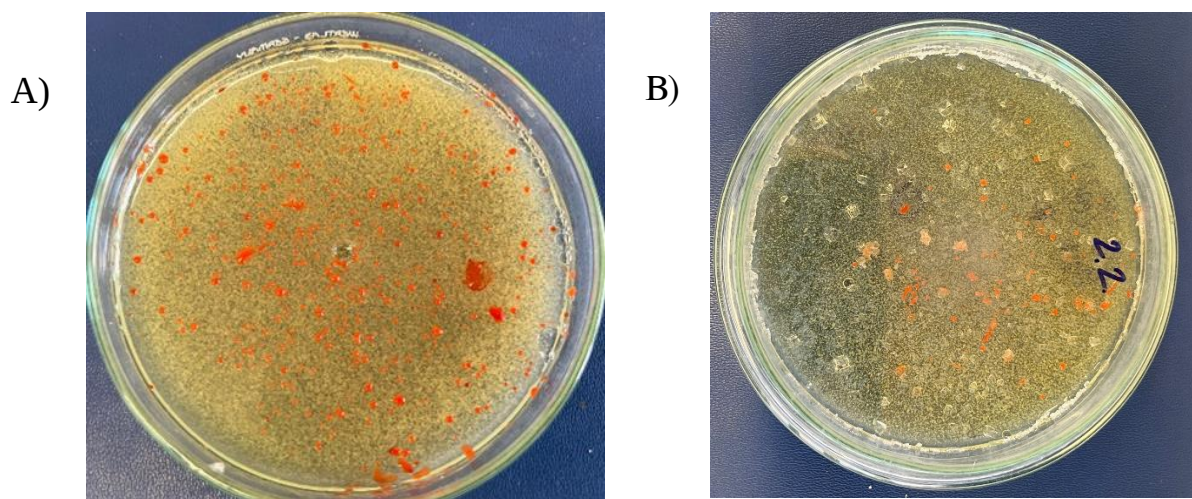
Cây phát sinh loài được thiết lập nhằm mục đích xác định mối quan hệ tiến hóa giữa các trình tự gen thu được từ nghiên cứu này với các trình tự tham chiếu đã được công bố. Quá trình trực quan hóa cây được thực hiện thông qua nền tảng trực tuyến chiplot online [66].

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập cổ khuẩn từ các mẫu thu ở các đồng muối Hòn Khói

3.1.1. Kết quả phân lập vi khuẩn từ các mẫu thu nhận được

Khu vực Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, nổi tiếng với các cánh đồng muối tự nhiên, tạo nên môi trường siêu mặn đặc trưng và lý tưởng cho sự phát triển của các vi sinh vật ưa mặn, đặc biệt là vi khuẩn cổ (Archaea). Các hệ sinh thái siêu mặn này đóng vai trò như một nguồn tài nguyên quý giá để nghiên cứu các vi sinh vật ưa cực, vốn có khả năng sinh tồn và hoạt động hiệu quả trong điều kiện khắc nghiệt. Từ 04 mẫu thu nhận tại ruộng muối Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, sau thời gian 5-7 ngày nuôi cấy, qua kết quả quan sát trên các đĩa môi trường phân lập cho thấy các chủng vi sinh vật mọc rất chậm, hình dạng khuẩn lạc quan sát rõ ràng sau 20 ngày nuôi cấy (**Hình 3.1**).



Hình 3.1. Hình ảnh các khuẩn lạc phân lập được.

Chú thích: Các khuẩn lạc phân lập được sau 20 ngày nuôi cấy ở 37°C trong điều kiện hiếu khí (A) và sau 30 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C (B).

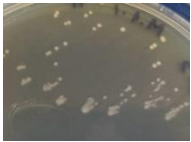
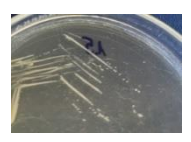
Sau một thời gian nuôi cấy, môi trường trong đĩa thạch bị mất nước dẫn đến hiện tượng kết tinh muối. Dù nồng độ muối tăng cao nhưng các chủng vi sinh vật vẫn tiếp tục sinh trưởng, chứng tỏ chúng có khả năng chịu mặn tốt.

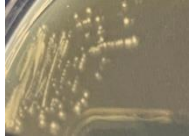
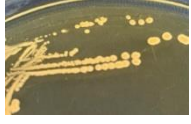
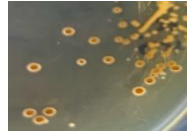
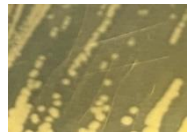
Tuy nhiên, khi cấy chuyển các khuẩn lạc từ đĩa nuôi cấy ban đầu sang môi trường có nồng độ muối dưới 20% vi sinh vật không phát triển. Điều này cho thấy đây là các chủng ưa mặn bắt buộc (Obligate halophiles), tức là chúng

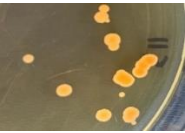
cần một nồng độ muối nhất định để duy trì hoạt động sinh lý và trao đổi chất. Trong môi trường có nồng độ muối thấp, áp suất thẩm thấu bên trong tế bào bị mất cân bằng, có thể gây ly giải tế bào hoặc ức chế các quá trình sinh trưởng. Do đó, quá trình làm thuần các chủng vi sinh vật vẫn tiến hành trên môi trường phân lập trên môi trường MGM nồng độ muối trên 23%.

Từ 04 mẫu thu nhận tại ruộng muối Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, đã phân lập được 27 chủng vi sinh vật, một số đặc điểm của vi sinh vật phân lập được thể hiện ở **Bảng 3.1**.

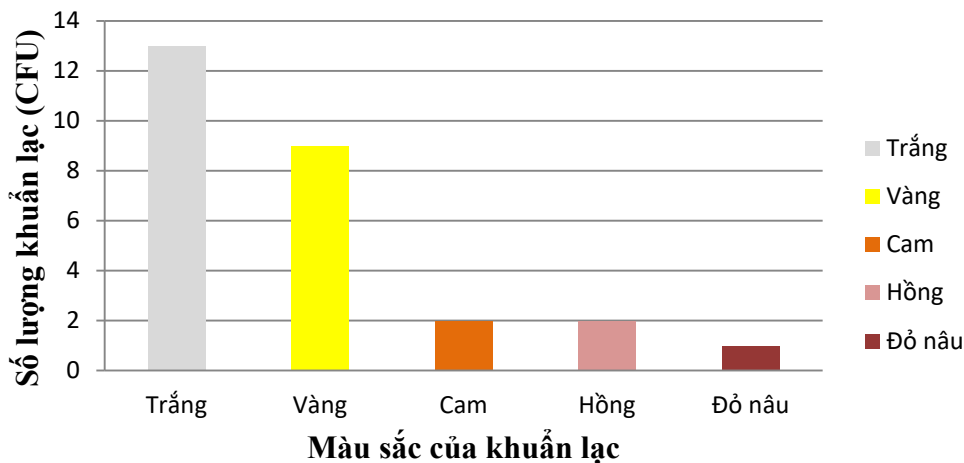
Bảng 3.1 Đặc điểm của các chủng vi sinh vật phân lập được

TT	Ký hiệu chủng	Hình ảnh khuẩn lạc	Hình dạng	Màu sắc	Độ đục	Độ cao	Bề mặt	Viên
1	M1.1		Tròn	Trắng	Trong	Lồi	Bóng	Viên tròn
2	M1.2		Tròn	Trắng	Đục	Lồi	Bóng	Viên tròn
3	M1.3		Tròn	Trắng	Trong	Lồi	Bóng	Viên tròn
4	M1.4		Tròn	Vàng nhạt	Đục	Lồi	Bóng	Biên tròn
5	M1.5		Tròn	Trắng	Trong	Lồi	Bóng	Viên tròn
6	M2.1.1		Tròn	Trắng	Đục nhẹ	Nhân Lồi	Bóng	Viên tròn
7	M2.1.2		Tròn	Vàng	Đục	Nhân Lồi	Bóng	Viên tròn

TT	Ký hiệu chủng	Hình ảnh khuẩn lạc	Hình dạng	Màu sắc	Độ đục	Độ cao	Bề mặt	Viên
8	M2.1.3		Tròn	Vàng	Đục	Nhân lõi	Bóng	Viên tròn
9	M2.1.4		Tròn	Cam đậm	Đục	Nhân lõi	Bóng	Viên tròn
10	M3.1		Vô định hình	Hồng nhạt	Đục	Nhân lõi	Bóng	Viên tròn
11	M3.2		Tròn	Trắng	Đục	Nhân lõi trắng đục	Bóng	Viên tròn
12	M3.3		Tròn	Trắng	Trong	Lõi	Bóng	Viên tròn mờ
13	M5.1		Tròn	Vàng	Đục	Lõi	Bóng	Viên tròn
14	M5.2		Tròn	Trắng	Đục	Nhân lõi	Bóng	Viên tròn
15	M5.3		Tròn	Đỏ Nâu	Đục	Nhân nâu lõi	Mờ	Viên tròn
16	M5.4		Tròn	Vàng	Đục	Lõi	Bóng	Viên tròn
17	M5.5		Tròn	Vàng	Đục	Lõi	Bóng	Viên tròn

TT	Ký hiệu chủng	Hình ảnh khuẩn lạc	Hình dạng	Màu sắc	Độ đục	Độ cao	Bề mặt	Viên
18	M5.6		Tròn	Trắng	Đục	Lồi	Bóng	Viên tròn
19	M5.7		Tròn	Vàng	Đục	Nhân lõi vàng đậm	Bóng	Viên tròn
20	M5.8		Tròn	Trắng	Đục	Lồi	Bóng	Viên tròn
21	M5.9		Tròn	Trắng	Đục	Lồi	Bóng	Viên tròn
22	M5.10		Tròn	Hồng	Đục	Lồi	Bóng	Viên tròn
23	M5.11		Tròn	Cam	Đục	Nhân lõi	Bóng	Viên tròn
24	M6.1		Tròn	Vàng nhạt	Đục	Lồi	Bóng	Viên tròn
25	M6.2		Tròn	Trắng	Trong	Lồi	Bóng	Viên tròn
26	M6.3		Tròn	Vàng	Đục	Lồi	Bóng	Viên tròn
27	M6.4		Tròn	Trắng	Trong	Lồi	Bóng	Viên tròn

Hình ảnh các đĩa phân lập cho thấy các chủng vi sinh vật có sự khác biệt rõ rệt về hình thái khuẩn lạc, bao gồm kích thước, màu sắc và bề mặt khuẩn lạc. Trong tổng số 27 chủng vi sinh vật đã được phân lập, mẫu VS9 có số lượng vi sinh vật được phân lập nhiều nhất (12 chủng), tiếp theo là mẫu VS8 (7 chủng), VS7 (5 chủng) và thấp nhất là VS1 (3 chủng). So với nghiên cứu của Maryam và cộng sự (phân lập được 500 chủng từ 3 mẫu) [3] số lượng chủng phân lập trong nghiên cứu này thấp hơn. Sự khác biệt có thể bắt nguồn từ điều kiện môi trường như nồng độ muối, hàm lượng chất hữu cơ hoặc phương pháp phân lập. Cụ thể, hàm lượng muối trong các mẫu của nghiên cứu này dao động từ 165–375 g/L, cao hơn rất nhiều so với mức 2,3–2,8 g/L trong các mẫu của Maryam và cộng sự. Điều này cho thấy rằng các chủng vi sinh vật được phân lập trong nghiên cứu này là những chủng có khả năng thích nghi và tồn tại ở điều kiện siêu mặn, đặc trưng của môi trường đồng muối. Ngoài ra, nhiệt độ tại thời điểm thu mẫu dao động từ 36,5 đến 60,2°C và môi trường nuôi cấy được duy trì ở 40°C trong 4 tuần nuôi cấy, cho thấy các chủng vi sinh vật này cũng có khả năng chịu nhiệt cao, phù hợp với các điều kiện khắc nghiệt của môi trường siêu mặn.



Hình 3.2. Số lượng và màu sắc khuẩn lạc sau khi phân lập

Về màu sắc khuẩn lạc, từ **hình 3.2**, có thể thấy rằng màu sắc khuẩn lạc phân lập được khá đa dạng, phản ánh sự phong phú của hệ vi sinh vật chịu mặn trong môi trường thu mẫu. Trong tổng số 27 chủng vi sinh vật, 13 chủng ($\approx 48\%$) có khuẩn lạc màu trắng, chiếm tỷ lệ cao nhất. Điều này cho thấy phần lớn các chủng phân lập có thể thuộc nhóm vi khuẩn chịu mặn vừa phải (Moderate halophiles) hoặc vi khuẩn Halotolerant, vốn không sinh nhiều sắc

tổ bảo vệ. Nhóm khuẩn lạc trắng này có thể bao gồm các chi như *Bacillus* hoặc *Halomonas* thường gặp trong môi trường nước mặn hoặc ruộng muối [67].

Bên cạnh đó, 14 chủng ($\approx 52\%$) có khuẩn lạc màu sắc khác nhau, bao gồm vàng (9 chủng), cam (2 chủng), hồng (2 chủng) và đỏ nâu (1 chủng). Trong đó, màu cam và hồng đặc trưng cho nhóm Haloarchaea ưa mặn cực đoan, do sự hiện diện của sắc tố carotenoid như bacterioruberin. Cụ thể, các chủng M3.1 (hồng nhạt), M5.10 (hồng), M2.1.4 (cam đậm) và M5.11 (cam) có thể thuộc họ Halobacteriaceae hoặc Haloferacaceae, những nhóm vi sinh vật có khả năng chịu mặn cao. Các sắc tố này giúp bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa và bức xạ UV, đồng thời có tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và y học.

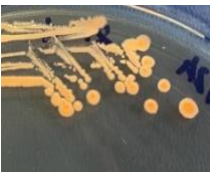
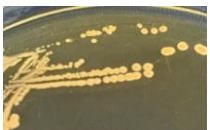
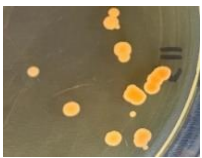
Màu vàng cũng chiếm tỷ lệ đáng kể với 9 chủng (M1.4, M2.1.2, M2.1.3, M5.1, M5.4, M5.5, M5.7, M6.1, M6.3), có thể là kết quả của các carotenoid khác như β -carotene hoặc lycopene. Những chủng này có thể thuộc nhóm vi khuẩn *Chromohalobacter*, *Salinibacter*, hoặc một số *Bacillus* ưa mặn. Đáng chú ý, M5.3 (đỏ nâu) là chủng duy nhất có màu sậm hơn, có thể liên quan đến sự tích lũy dày đặc của sắc tố bacterioruberin hoặc các hợp chất chống oxy hóa đặc biệt.

Nhìn chung, sự phân bố màu sắc khuẩn lạc trong các chủng vi sinh vật phân lập được phù hợp với đặc điểm môi trường có độ mặn cao, khi có sự hiện diện đồng thời của cả vi khuẩn chịu mặn trung bình (khuẩn lạc trắng) và cổ khuẩn ưa mặn cực đoan (khuẩn lạc cam, hồng, đỏ nâu). Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng đa dạng của các chủng phân lập trong sản xuất enzyme chịu mặn, sắc tố sinh học và các hợp chất có giá trị sinh học khác.

3.1.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính nhạy cảm với kháng sinh anisomycin.

Trong số 27 chủng vi sinh vật được phân lập, để bước đầu xác định chúng thuộc nhóm cổ khuẩn hay vi khuẩn chịu mặn, chúng tôi tiến hành thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh anisomycin. Kết quả cho thấy có 5 chủng vi sinh vật nhạy cảm với anisomycin, bao gồm M2.1.4, M5.1, M5.3, M5.7 và M5.11 (**Bảng 3.2**).

Bảng 3.2 Hoạt tính nhạy cảm với kháng sinh anisomycin của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

STT	Nguồn phân lập	Màu sắc khuẩn lạc	Ký hiệu chủng	Nhạy cảm với kháng sinh anisomycin
1	VS1		M2.1.4	+
2	VS7		M5.1	+
3	VS7		M5.3	+
4	VS7		M5.7	+
5	VS7		M5.11	+

Dựa trên kết quả thử nghiệm, tất cả năm chủng vi khuẩn cổ phân lập được (M2.1.4, M5.1, M5.3, M5.7, và M5.11) đều cho thấy khả năng nhạy cảm với anisomycin thông qua sự xuất hiện của các vòng ức chế trên môi trường nuôi cấy, mặc dù vòng phân giải chưa rõ ràng. Anisomycin là một kháng sinh được biết đến với khả năng ức chế tổng hợp protein ở sinh vật nhân thực và cổ khuẩn bằng cách gắn vào vị trí trung tâm peptidyl transferase trên ribosome, ngăn chặn sự hình thành liên kết peptide trong quá trình dịch mã. Tuy nhiên, ribosome của vi khuẩn nhân sơ, bao gồm cả vi khuẩn chịu mặn, có cấu trúc khác biệt tại vị trí này, khiến anisomycin không thể gắn kết hiệu quả, dẫn đến sự kháng thuốc tự nhiên ở các vi khuẩn này [68].

Mặc dù tất cả chủng đều được đánh giá là nhạy cảm với anisomycin, tuy nhiên, vòng phân giải quanh đĩa anisomycin không rõ ràng. Điều này có thể do nguyên nhân:

- Khả năng sinh trưởng chậm của các chủng vi khuẩn cổ và thời gian quan sát kéo dài: Vòng phân giải chỉ bắt đầu xuất hiện rõ hơn sau 20 ngày nuôi cấy, cho thấy tốc độ phát triển của vi khuẩn cổ chịu mặn chậm hơn so với vi khuẩn thông thường, đặc biệt trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Quan sát trên môi trường nuôi cấy cho thấy các khuẩn lạc của các chủng nhạy cảm xuất hiện với màu sắc từ cam nhạt đến đỏ đậm. Đây là đặc điểm sinh học điển hình của các chủng vi khuẩn cổ chịu mặn (Haloarchaea), do các sắc tố carotenoid (chủ yếu là bacterioruberin) được tổng hợp nhằm bảo vệ tế bào trước các tác nhân gây stress oxy hóa và điều kiện muối cao. Đặc biệt là sự xuất hiện của các khuẩn lạc có màu đỏ hoặc hồng như các chủng M2.1.4, M5.1, M5.3, M5.7 và M5.11; kết hợp với các thông tin từ các nghiên cứu trước đây, có thể dự đoán rằng đây là các chủng cổ khuẩn có khả năng thuộc các họ Haloarculaceae, Halobacteriaceae và Haloferacaceae. Các họ này bao gồm các chi như *Halorubrum*, *Haloferax* và *Haloarcula*, vốn phổ biến trong môi trường siêu mặn và thường thể hiện màu sắc khuẩn lạc đặc trưng do sự hiện diện của sắc tố carotenoid như bacterioruberin [37].

Từ các kết quả phân tích nêu trên, kết hợp cùng điều kiện độ mặn cao (165–375 g/L) của địa điểm thu mẫu (đồng muối Hòn Khói), các chủng vi khuẩn phân lập được dự đoán có nhiều khả năng thuộc các loài ưa mặn cực đoan, phù hợp với các loài cổ khuẩn đã được ghi nhận trong các nghiên cứu tương tự [69]. Hơn nữa, kết quả phân tích metagenomics trong một công bố liên quan đã xác định rằng các nhóm cổ khuẩn chính trong mẫu nghiên cứu bao gồm *Halorubrum*, *Halobacterium* và *Haloarcula* từ các họ Halobacteriaceae, Haloferacaceae và Haloarculaceae. Đặc biệt, mẫu VS7 có sự hiện diện cao của nhóm Nanohaloarchaeota (78,5%), cho thấy tính đặc thù về điều kiện môi trường siêu mặn tại khu vực đồng muối này [70].

3.2. Kết quả sàng lọc Haloarchaea có khả năng sinh enzyme phân cắt chitin, cellulose/xylan và HA.

Trong nghiên cứu này, năm chủng vi sinh vật cổ chịu mặn gồm VS1M2.1.4, VS7M5.1, VS7M5.3, VS7M5.7 và VS7M5.11 đã được tuyển chọn và sàng lọc khả năng phân cắt các polysaccharide quan trọng, bao gồm chitin, cellulose/xylan và HA. Những polysaccharide này có vai trò quan trọng trong tự nhiên, đặc biệt là chitin - thành phần chính của lớp vỏ động vật giáp xác, cellulose/xylan - thành phần cấu trúc của thực vật, và hyaluronan - một polysaccharide sinh học có ứng dụng y học rộng rãi. Kết quả sàng lọc đã giúp đánh giá tiềm năng sinh enzyme phân giải polysaccharide của các chủng vi sinh vật khảo sát, được thể hiện chi tiết trong **Bảng 3.3**.

Bảng 3.3. Khả năng thủy phân chitin, cellulose/xylan và HA của các chủng Haloarchaea

Mẫu cổ khuẩn	Hoạt tính enzyme trên các cơ chất		
	Chitin	CMC	HA
VS1M2.1.4	+/-	-	+/-
VS7M5.1	+/-	+++	+
VS7M5.3	++	+++	+++
VS7M5.7	++	++	+/-
VS7M5.11	+/-	-	++

Ghi chú: +/-: Hoạt tính rất yếu hoặc không rõ ràng; +: Hoạt tính yếu; ++: Hoạt tính trung bình; +++: Hoạt tính mạnh.

* Khả năng thủy phân chitin

Chitin là một polysaccharide cấu trúc quan trọng trong thành tế bào của nấm và lớp vỏ của động vật giáp xác. Kết quả sàng lọc cho thấy các chủng cổ khuẩn có mức độ hoạt tính phân giải chitin khác nhau:

- Các chủng VS7M5.3 và VS7M5.7 thể hiện khả năng sinh enzyme phân giải chitin mạnh nhất (++), chứng tỏ đây là các chủng tiềm năng trong việc khai thác enzyme chitinase.

- Các chủng VS1M2.1.4, VS7M5.1 và VS7M5.11 có hoạt tính yếu (+/-), chỉ xuất hiện vòng phân giải nhỏ, cho thấy khả năng sản xuất enzyme này còn hạn chế.

Các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận rằng nhiều chủng Haloarchaea như *Halobacterium salinarum* và *Haloferax mediterranei*, có khả năng sản xuất chitinase bền muối cao, hoạt động tối ưu trong môi trường chứa NaCl từ 1 đến 4,5 M. Cụ thể, chitinase tái tổ hợp ChiN1 từ *Hbt. salinarum* NRC-1 đã được biểu hiện thành công trong *Haloarcula japonica* TR-1, cho thấy hoạt tính tối ưu ở 55°C và duy trì ổn định trong môi trường muối cao [41].

Bên cạnh đó, một số chủng như *Halomicrobium* và *Natrinema* từ hồ siêu mặn đã được phát hiện có khả năng phân giải chitin mạnh, với enzyme hoạt động hiệu quả ở nồng độ NaCl 2–3 M [44]. Những nghiên cứu này phù hợp với kết quả thu được trong đề tài, cho thấy các chủng cổ khuẩn phân lập có tiềm năng ứng dụng trong công nghệ enzyme bền muối.

Tóm lại, các chủng VS7M5.3 và VS7M5.7 nổi bật với hoạt tính chitinase cao, có thể được khai thác để ứng dụng trong xử lý phế phẩm chứa chitin từ công nghiệp thủy sản hoặc sản xuất enzyme sinh học phục vụ y học và nông nghiệp.

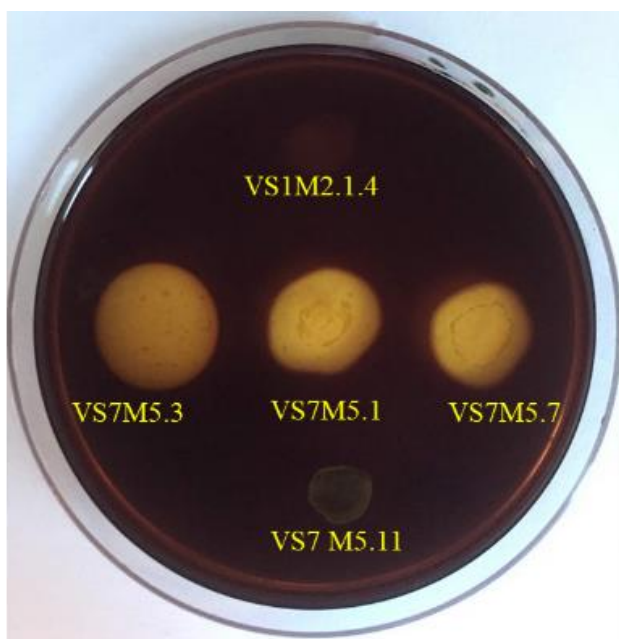
*** Khả năng thủy cellulose/xylan**

Trong nghiên cứu này, cơ chất thử nghiệm được sử dụng là Carboxymethyl Cellulose (CMC), một dạng cellulose hòa tan được dùng phổ biến để đánh giá hoạt tính cellulase trong các nghiên cứu vi sinh vật. CMC là một dẫn xuất của cellulose, trong đó các nhóm hydroxyl (-OH) trong chuỗi glucose của cellulose được thay thế bằng nhóm carboxymethyl (-CH₂COOH), giúp tăng độ tan trong nước. Điều này cho phép dễ dàng xác định hoạt tính thủy phân của enzyme cellulase thông qua sự hình thành vùng phân giải khi nhuộm với thuốc nhuộm chỉ thị như iodine.

Cellulose là polysaccharide chính cấu tạo nên thành tế bào thực vật, gồm các đơn vị glucose liên kết với nhau bằng liên kết β -1,4-glycosidic. Xylan, thành phần chính của hemicellulose, cũng có cấu trúc tương tự nhưng chứa các đơn vị xylose. Vì vậy, enzyme có khả năng phân giải CMC thường có tiềm năng thủy phân cả cellulose và hemicellulose (bao gồm xylan), do tính tương đồng về cấu trúc. Trong thực tế, nhiều vi khuẩn có khả năng sản xuất enzyme cellulase/xylanase có thể hoạt động đồng thời trên cả hai loại

polysaccharide này, giúp phân giải hiệu quả các nguồn carbon thực vật phức tạp.

Kết quả thể hiện ở **Bảng 3.3** cho thấy chỉ có 03 chủng, VS7M5.1 và VS7M5.3, VS7M5.7 có hoạt tính mạnh với CMC, trong khi các chủng khác không thể hiện hoạt tính (**Hình 3.3**).



Hình 3.3. *Hoạt tính đối với cơ chất CMC*

Điều này chứng tỏ hai chủng này có tiềm năng sản sinh enzyme cellulase và có thể đồng thời tham gia vào quá trình thủy phân xylan, giúp phá vỡ thành phần chính của thành tế bào thực vật. Trong điều kiện môi trường siêu mặn, sự hiện diện của enzyme cellulase/xylanase bền muối từ vi khuẩn cổ có thể mang lại ứng dụng quan trọng trong các ngành công nghiệp như sản xuất nhiên liệu sinh học từ sinh khối, xử lý chất thải nông nghiệp, và cải thiện tiêu hóa chất xơ trong thức ăn chăn nuôi.

Bên cạnh đó, các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận nhiều chủng vi khuẩn cổ chịu mặn, đặc biệt là các loài thuộc chi *Haloferax* và *Halorubrum*, có khả năng sản xuất enzyme thủy phân polysaccharide bền muối, mở ra tiềm năng ứng dụng trong các quy trình công nghệ sinh học yêu cầu điều kiện khắc nghiệt [46, 47, 48]. Sự phát hiện hoạt tính trên CMC của hai chủng VS7M5.1, VS7M5.3 và VS7M5.7 trong nghiên cứu này là cơ sở quan trọng để tiếp tục nghiên cứu chuyên sâu về đặc tính enzyme, tối ưu hóa điều kiện sản xuất, cũng như xác định ứng dụng tiềm năng trong công nghệ sinh học.

*** Khả năng thủy phân HA của các chủng Haloarchaea**

Kết quả sàng lọc cho thấy sự biến thiên đáng kể về hoạt tính thủy phân hyaluronic acid (HA) giữa các chủng Haloarchaea được phân lập. Trong đó, chủng VS7M5.3 đạt mức hoạt tính cao nhất, VS7M5.11 có hoạt tính trung bình, trong khi các chủng còn lại chỉ thể hiện hoạt tính yếu hoặc không đáng kể. Đặc biệt, VS7M5.3 không chỉ có hoạt tính mạnh đối với HA mà còn thể hiện khả năng thủy phân tốt trên cả cellulose/xylan và chitin, chứng tỏ đây là một chủng vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng cao trong lĩnh vực enzyme công nghiệp.

Kết quả cho thấy VS7M5.3 có hoạt tính mạnh trên cả ba cơ chất cellulose/xylan, chitin và HA, chứng tỏ chủng này có thể sản xuất enzyme thủy phân polysaccharide. Điều này mở ra các hướng ứng dụng tiềm năng trong nhiều lĩnh vực:

- Công nghiệp enzyme sinh học: Khai thác hyaluronidase, chitinase, cellulase và xylanase cho các ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm và năng lượng sinh học.
- Công nghệ sinh học y học: Hyaluronidase có thể ứng dụng trong thẩm mỹ, điều trị bệnh thoái hóa khớp, hỗ trợ vận chuyển thuốc trong điều trị ung thư.
- Xử lý sinh khối và năng lượng sinh học: Cellulase và xylanase từ VS7M5.3 có thể hỗ trợ phân hủy sinh khối lignocellulose, giúp tăng hiệu suất sản xuất bioethanol từ phụ phẩm nông nghiệp.
- Xử lý chất thải thủy sản: Chitinase có thể tham gia phân giải vỏ tôm, cua, tạo ra chito-oligosaccharides có giá trị cao trong y dược và thực phẩm chức năng.

Sự khác biệt rõ rệt về hoạt tính enzyme giữa các chủng Haloarchaea sau phân lập nhấn mạnh tính đa dạng sinh học và chức năng enzyme trong nhóm vi khuẩn cổ chịu mặn. Trong khi VS7M5.3 thể hiện hoạt tính vượt trội, một số chủng khác lại có hoạt tính yếu hoặc không đáng kể. Điều này có thể do:

- Sự khác biệt về hệ gen và khả năng biểu hiện enzyme của từng chủng, thể hiện mức độ chuyên biệt hóa enzyme khác nhau.
- Điều kiện nuôi cấy chưa tối ưu đối với một số chủng, có thể ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp enzyme. Một số Haloarchaea yêu cầu môi trường có

độ mặn hoặc nguồn dinh dưỡng đặc thù để kích thích sinh tổng hợp enzyme hiệu quả hơn.

Sự điều hòa enzyme theo cơ chế cảm ứng: Một số vi khuẩn cổ chỉ sản xuất enzyme thủy phân khi có mặt cơ chất thích hợp trong môi trường, dẫn đến sự khác biệt về hoạt tính trong điều kiện thử nghiệm.

3.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn

3.3.1. Kết quả tách chiết DNA của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Phân tích DNA là một bước quan trọng trong việc định danh và xác định quan hệ tiến hóa của các chủng vi sinh vật. Trong nghiên cứu này, DNA tổng số của các chủng Haloarchaea tuyển chọn được tách chiết để phục vụ cho quá trình khuếch đại và phân tích trình tự gen 16S rDNA, giúp xác định chính xác danh tính và vị trí phân loại của các chủng vi sinh vật khảo sát.

Việc tách chiết DNA từ cổ khuẩn gặp nhiều thách thức do cấu trúc màng tế bào đặc biệt của chúng, bao gồm lipid ether và thành tế bào giàu polysaccharide, khiến quá trình ly giải và thu nhận DNA hiệu suất cao trở nên khó khăn hơn so với vi khuẩn thông thường. Do đó, phương pháp tách chiết DNA cần được tối ưu hóa để thu được DNA có độ tinh sạch cao, không bị nhiễm tạp chất như protein, polysaccharide hay hợp chất hữu cơ.

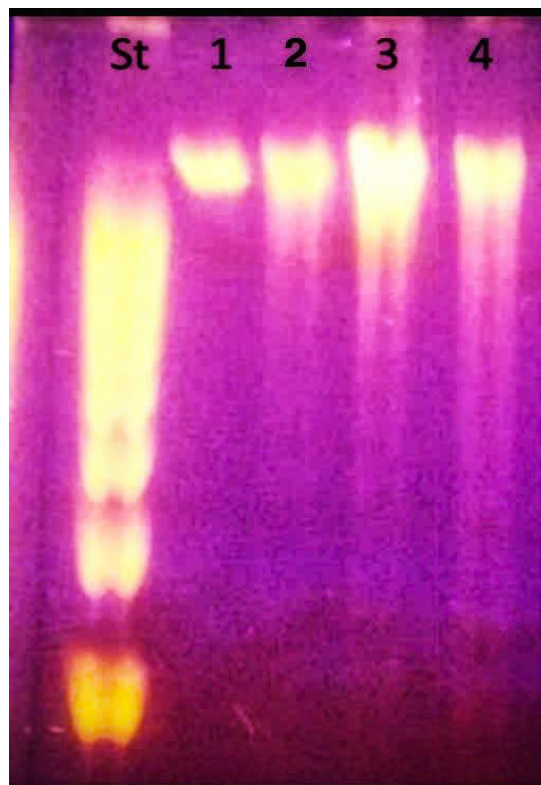
Trong số 05 chủng vi sinh vật nhạy cảm với kháng sinh (VS1M2.1.4, VS7M5.1, VS7M5.3, VS7M5.7, VS7M5.11), quá trình tách chiết DNA đã được thực hiện thành công trên 04 chủng, trong khi một chủng không đạt yêu cầu do có thể gặp khó khăn trong quá trình ly giải tế bào hoặc hiệu suất thu nhận DNA thấp. Điều này có thể xuất phát từ đặc điểm thành tế bào dày hơn hoặc chứa các hợp chất cản trở quá trình chiết xuất, như polysaccharide và lipid ether đặc trưng của Haloarchaea.

Kết quả đo quang phổ của các mẫu DNA chiết xuất được trình bày trong **Bảng 3.4**. Tất cả các mẫu thu được đều có tỷ lệ hấp thụ 260/280 nm nằm trong khoảng 1,8–2,0, cho thấy mức độ tinh sạch cao và không có dấu hiệu nhiễm tạp protein. Bên cạnh đó, tỷ lệ 260/230 nm dao động từ 2,0–2,2, phản ánh mức nhiễm tạp polysaccharide hoặc muối là rất thấp. Những thông số này cho thấy DNA chiết xuất đạt chất lượng tốt, phù hợp cho các phân tích di truyền tiếp theo, bao gồm khuếch đại PCR, giải trình tự 16S rDNA và phân tích phát sinh loài.

Bảng 3.4. *Nồng độ DNA và độ sạch của các mẫu nghiên cứu*

Mẫu	Nồng độ DNA (ng/ μ L)	Tỷ lệ hấp thụ 260/280 nm	Tỷ lệ hấp thụ 260/230 nm
VS7M5.1	85,2	1,9	2,1
VS7M5.3	92,3	1,8	2,0
VS7M5.7	88,7	2,0	2,2
VS7M5.11	87,4	1,8	2,0

Các mẫu DNA sau khi tách chiết được kiểm tra chất lượng qua điện di gel agarose 1% và nhuộm ethidium bromide. **Hình 3.4** cho thấy các dải DNA rõ nét, không có dấu hiệu phân mảnh, chứng tỏ DNA có chất lượng tốt và thích hợp cho các thí nghiệm tiếp theo như PCR hoặc giải trình tự gen.

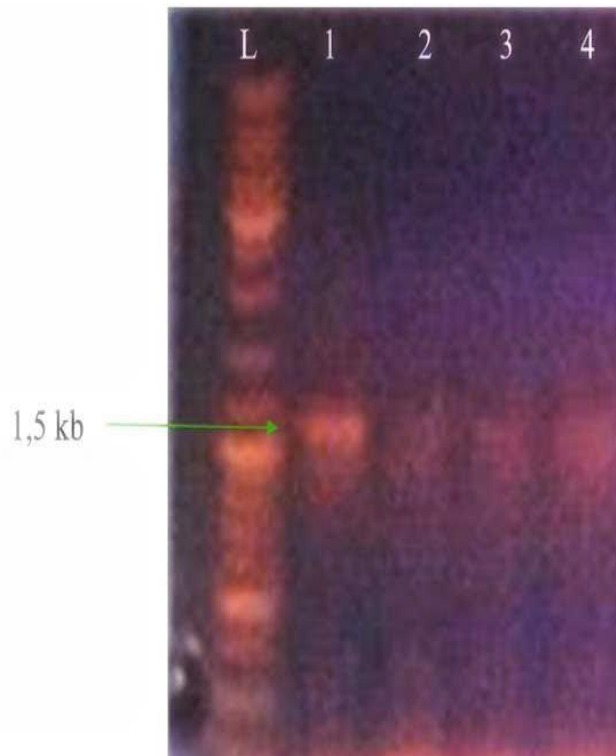
**Hình 3.4.** *Điện di gel agarose của các mẫu DNA chiết xuất từ các chủng vi sinh vật tuyển chọn*

Trong đó: St: Thang DNA chuẩn (1 kb ladder); Giếng 1: VS7M5.1; Giếng 2: VS7M5.3; Giếng 3: VS7M5.7; Giếng 4: VS7M5.11.

Các băng DNA nằm tại vị trí trên 10.000 bp, cho thấy DNA không bị phân mảnh và có kích thước lớn. Điều này đảm bảo rằng DNA được chiết xuất thành công và có thể sử dụng cho các phân tích sinh học phân tử tiếp theo. Các mẫu DNA này đã được sử dụng để chạy PCR 16S rDNA.

3.3.2. Kết quả PCR 16S rDNA của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Quá trình khuếch đại gen 16S rRNA từ DNA của các chủng cổ khuẩn tuyển chọn (Haloarchaea) được thực hiện với bốn mẫu: VS7M5.1, VS7M5.3, VS7M5.7 và VS7M5.11. Kết quả PCR cho thấy chỉ một mẫu, VS7M5.3, cho kết quả khuếch đại thành công với chất lượng sản phẩm đạt yêu cầu cho phân tích giải trình tự (**Hình 3.5**).



Hình 3.5: Điện di gel agarose của sản phẩm PCR từ các mẫu VS7M5.1, VS7M5.3, VS7M5.7 và VS7M5.11

- Làn L: Thang chuẩn DNA để xác định kích thước băng.
- Làn 1: VS7M5.3
- Làn 2: VS7M5.1
- Làn 3: VS7M5.7
- Làn 4: VS7M5.11

Kết quả điện di gel cho thấy:

Mẫu **VS7M5.3** hiển thị một băng DNA rõ nét tại vị trí tương ứng với kích thước khoảng 1,5 kb so với thang chuẩn DNA. Điều này chứng tỏ phản ứng PCR đã thành công và khuếch đại được đoạn gen 16S rRNA như mong muốn.

Các mẫu **VS7M5.1**, **VS7M5.7** và **VS7M5.11** cũng xuất hiện băng DNA tại vị trí tương tự (~1,5 kb), tuy nhiên các băng này mờ hơn so với mẫu VS7M5.3. Điều này cho thấy phản ứng PCR trên các mẫu này đã xảy ra khuếch đại nhưng với hiệu suất thấp, có thể do các yếu tố như chất lượng DNA không đạt yêu cầu hoặc điều kiện phản ứng chưa được tối ưu.

Dải DNA của tất cả các mẫu đều xuất hiện tại vị trí tương đồng, cho thấy khả năng cao sản phẩm khuếch đại là đoạn gen 16S rRNA của Haloarchaea.

Không ghi nhận sự xuất hiện của các băng phụ trên hoặc dưới băng chính, chứng tỏ phản ứng PCR có độ đặc hiệu cao và không xảy ra hiện tượng khuếch đại ngoài mục tiêu.

Kết quả khuếch đại gen 16S rRNA từ các chủng vi khuẩn cổ đã phản ánh sự khác biệt về hiệu suất PCR giữa các mẫu. Việc chỉ một mẫu (VS7M5.3) cho kết quả thành công vượt trội có thể là do các chủng cổ khuẩn có sự đa dạng về trình tự gen, bao gồm các biến thể trong vùng liên kết môi. Mẫu VS7M5.3 có thể chứa trình tự phù hợp hơn với cặp môi sử dụng dẫn đến khả năng gắn môi và khuếch đại hiệu quả hơn. Việc gửi sản phẩm PCR từ mẫu VS7M5.3 để giải trình tự gen 16S rRNA sẽ cung cấp dữ liệu quan trọng cho quá trình định danh chính xác chủng cổ khuẩn này, cũng như phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về đa dạng di truyền và tiềm năng ứng dụng sinh học của các chủng Haloarchaea được phân lập.

3.3.3. Kết quả giải trình tự 16S rDNA

Việc xác định trình tự gen 16S rDNA là một công cụ quan trọng trong nghiên cứu phân loại và định danh vi sinh vật, đặc biệt là các chủng vi khuẩn cổ chịu mặn (Haloarchaea). Trình tự 16S rDNA có độ bảo tồn cao trong họ vi khuẩn, nhưng cũng chứa các vùng biến đổi đặc trưng giúp phân biệt giữa các loài và chi vi khuẩn khác nhau.

Kết quả giải trình tự gen 16S rDNA của chủng **VS7M5.3** đã thu được trình tự với độ dài khoảng 1.450 nucleotide, phù hợp với độ dài tiêu chuẩn của vùng gen 16S rRNA được sử dụng phổ biến trong định danh vi sinh vật (phụ lục 1).

Khi tiến hành phân tích so sánh bằng công cụ BLASTn trên cơ sở dữ liệu của NCBI, trình tự này cho thấy mức độ tương đồng cao với các chủng thuộc chi *Halorubrum* (*Halorubrum* spp.) (**Bảng 3.5**)

Bảng 3.5. Kết quả định danh chủng cổ khuẩn VS7M5.3 dựa trên trình tự 16S rDNA

TT	Chủng cổ khuẩn	Chủng tham chiếu	Mã genbank	Trình tự tham chiếu NCBI	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)	Giá trị E
1	16S rDNA – VS7M5.3	<i>Halorubrum luteum</i> strain CGSA15	DQ987877	NR_115925.1	100	100	0
2		<i>Halorubrum luteum</i> strain CECT 7303	AB663417	NR_113216.1	99,78	100	0
3		<i>Halorubrum aethiopicum</i> strain SAH-A6	\	NR_159273.1	97,13	100	0
4		<i>Halorubrum lacusprofundi</i> ATCC 49239	\	NR_028244.1	100	100	0

5		<i>Halorubrum salsamenti strain Y69</i>	\	NR_177340.1	98,97	99	0
---	--	---	---	-------------	-------	----	---

Kết quả phân tích trình tự 16S rDNA của chủng cổ khuẩn VS7M5.3 cho thấy độ tương đồng cao với các chủng tham chiếu thuộc chi *Halorubrum*. Cụ thể, chủng này có độ tương đồng 100% với *Halorubrum luteum* strain CGSA15 [71] và *Halorubrum luteum* strain CECT 7303 [72]. Đây là dấu hiệu cho thấy VS7M5.3 có khả năng cao thuộc loài *Halorubrum luteum*.

Bên cạnh đó, chủng VS7M5.3 cũng có độ tương đồng tương đối cao với *Halorubrum aethiopicum* strain SAH-A6 [73] (97,13%), *Halorubrum lacusprofundi* ATCC 49239 [74] (100%) và *Halorubrum salsamenti* strain Y69 [75] (98,97%). Tuy nhiên, độ tương đồng dưới 100% với các chủng này cho thấy chúng có quan hệ gần nhưng không phải là ứng viên định danh chính xác nhất.

Độ bao phủ trình tự đạt 99-100% với tất cả các chủng tham chiếu, chứng tỏ dữ liệu phân tích có độ đầy đủ và đáng tin cậy. Đồng thời, giá trị $E = 0$ trong tất cả các kết quả là bằng chứng cho thấy tính chính xác cao của việc xác định trình tự.

Dựa trên mức độ tương đồng cao với các chủng thuộc chi *Halorubrum*, đặc biệt là *Halorubrum luteum*, chủng VS7M5.3 được định danh sơ bộ là ***Halorubrum* sp. VS7M5.3**. Để xác định chính xác hơn, cần thực hiện thêm các phân tích di truyền sâu hơn, như giải trình tự toàn bộ hệ gen.

3.3.4. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài của chủng VS7M5.3

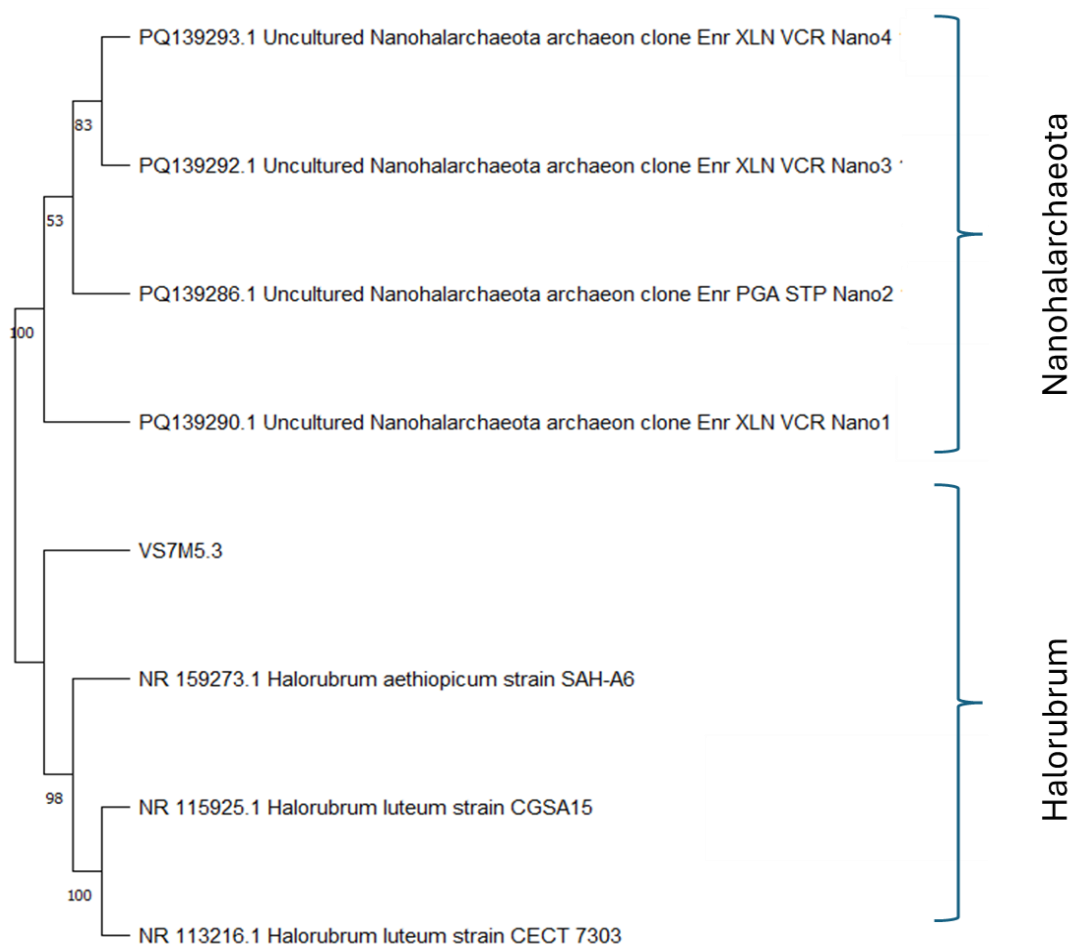
Để xác định vị trí phân loại của chủng VS7M5.3, trình tự gen 16S rRNA của chủng này đã được so sánh với các trình tự tương đồng trên cơ sở dữ liệu GenBank. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining (NJ) với độ tin cậy được đánh giá thông qua phân tích bootstrap. Kết quả phân tích cung cấp thông tin về mối quan hệ tiến hóa của VS7M5.3 với các loài vi khuẩn liên quan, góp phần xác định chính xác vị trí phân loại của chủng này (**Hình 3.6**).

Kết quả cho thấy chủng VS7M5.3 phân lập được từ nghiên cứu này có quan hệ gần với các loài thuộc chi *Halorubrum*. Các chủng chưa được nuôi

cây thuộc nhóm Nanohalarchaeota hình thành một nhánh riêng biệt, cho thấy sự khác biệt rõ rệt với các chủng thuộc chi *Halorubrum*.

Việc xác định chủng VS7M5.3 có độ tương đồng 98% với các loài thuộc chi *Halorubrum* cho thấy khả năng cao đây là một chủng vi khuẩn cổ chịu mặn đặc trưng cho môi trường siêu mặn, tương ứng với điều kiện thu mẫu từ các ruộng muối tự nhiên tại Việt Nam.

Các loài thuộc chi *Halorubrum* nổi bật với khả năng sinh trưởng trong môi trường có nồng độ muối cao (20–30%) và có tiềm năng sản xuất các enzyme chuyển hóa polysaccharide như cellulase, xylanase và chitinase. Điều này phù hợp với mục tiêu nghiên cứu nhằm khai thác tiềm năng sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide của các chủng cổ khuẩn chịu mặn.



Hình 3.6. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen 16S rDNA của chủng cổ khuẩn VS7M5.3.

Chú thích: Cây phát sinh loài được xây dựng trên cơ sở so sánh với các chủng thuộc chi Halorubrum trên NCBI và các chủng chưa được nuôi cấy thuộc nhóm Nanohalarchaeota; Phương pháp xây dựng: phương pháp Neighbor-Joining (NJ) với độ tin cậy nhánh được đánh giá bằng phương pháp Bootstrap (1.000 lần lặp lại). Các giá trị bootstrap (%) được hiển thị tại các nút phân nhánh, biểu thị mức độ tin cậy của từng nhóm.

Như vậy, quá trình giải trình tự gen 16S rDNA của chủng VS7M5.3 đã thành công, thu được trình tự chất lượng cao và đầy đủ. Kết quả phân tích cho thấy chủng VS7M5.3 có khả năng thuộc chi *Halorubrum*, với độ tương đồng lên đến 98% so với các chủng đã được công bố. Đây là cơ sở quan trọng để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo về khả năng sinh enzyme của chủng này, đặc biệt là trong việc khai thác tiềm năng chuyển hóa polysaccharide phục vụ cho ứng dụng trong công nghệ sinh học, môi trường và công nghiệp.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu trong luận văn, có thể rút ra các kết luận quan trọng sau:

Từ các mẫu thu thập tại đồng muối Hòn Khói, Khánh Hòa, đã phân lập được 27 chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trong môi trường siêu mặn. Các chủng vi khuẩn này có sự đa dạng về hình thái khuẩn lạc (màu sắc, độ đục và cấu trúc bề mặt). Qua sàng lọc có 5 chủng vi sinh vật nhạy cảm với kháng sinh anisomycin.

Các chủng vi khuẩn cổ được sàng lọc về khả năng sinh các enzyme thủy phân polysaccharide. Kết quả sàng lọc cho thấy chủng VS7M5.3 có khả năng sinh enzyme chitinase và xylanase.

Giải trình tự gen 16S rDNA đã được thực hiện thành công cho chủng VS7M5.3 (với màu sắc và hình thái đặc trưng là đỏ nâu đục với nhân lồi). Kết quả phân tích phát sinh loài cho thấy chủng này có độ tương đồng 98% với các loài vi khuẩn cổ thuộc chi *Halorubrum*.

4.2. KIẾN NGHỊ

Tiến hành tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy (nồng độ muối, pH, nhiệt độ) để gia tăng hiệu suất sinh enzyme của chủng VS7 M5.3. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men và tối ưu hóa phương pháp thu nhận enzyme bằng kỹ thuật lọc và kết tủa phù hợp.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

STT	Tác giả	Tên kết quả công bố/đăng ký	Tên tạp chí/Nơi công bố	Năm công bố
1	Cao Thị Thúy Hằng, Nguyễn Thị Thuận, Võ Thị Diệu Trang, Phan Thị Thuỳ Trang, Đinh Thành Trung, Trần Nguyễn Hà Vy, Hoàng Hồng Hạnh, Phạm Đức Thịnh, Huỳnh Hoàng Như Khánh	Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cổ ưa mặn có tiềm năng sinh enzyme cellulase, kitinase, xylanase và hyaluronidase.	Tạp chí khoa học và công nghệ Việt Nam (Bản B) – Đã có giấy xác nhận chấp nhận đăng	2025

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Mohammad Ali Amoozegar, Ali Makhdoumi-Kakhki, Seyed Abolhassan Shahzadeh Fazeli, Reza Azarbaijani, Antonio Ventosa, 2012, *Halopenitus persicus* gen. nov., sp. nov., an archaeon from an inland salt lake, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, pp. 1932–1936 , doi:10.1099/IJS.0.036921-0.
- [2] A. Makhdoumi Kakhki, M.A. Amoozegar, E. Mahmodi Khaledi, 2011, Diversity of hydrolytic nzymes in Haloarchaeal strains solated from salt lake, *International Journal of Environmental Science & Technology* , 8(4), pp. 705–714, doi:10.1007/BF03326255.
- [3] M. YavaYavari-Bafghi, H. Babavalian, M.A. Amoozegar, 2019, Isolation, screening and identification of Haloarchaea with hitinolytic activity from hypersaline lakes of Iran, *The Archives of Biological Sciences*, 71, pp. 71–81, doi:10.2298/ABS180525049Y.
- [4] J. Verbančič, J.E. Lunn, M. Stitt, S. Persson, 2018, Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis, *Molecular Plant*, 11, pp. 75-94, doi:10.1016/J.MOLP.2017.10.004.
- [5] B.A. Buhren, H. Schruppf, N.P. Hoff, E. Bölke, S. Hilton, P.A. Gerber, 2016, Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms, *European Journal of Medical Research*, 21(5), doi:10.1186/S40001-016-0201-5.
- [6] N.T. Thuận, T.N.H. Vy, V.T.D. Trang, C.T.T. Hằng, V.M.N Hiếu, N.N. Linh, T.T.T. Vân, 2019, Tiềm năng sinh alginate lyase từ vi huẩn biển phân lập được ở vùng biển Việt Nam, *Tạp Chí Sinh Học*, 41, pp 273–280.
- [7] C.T.T. Hang, T.D. Vo, D.T. Trung, T.T.T. Van, N.X.Vien, H.H.N. Khanh, P.D. Thinh, 2020, The potential of producing brown seaweed olysaccharide-modifying enzymes in marine bacteria solated from the collected samples in Vietnam sea in the journey of the Akademik Oparin vessel in 2018, *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 20, pp. 345–354, doi:10.15625/1859-3097/15984
- [8] T.N.H. Vy, N.T. Thuan , C.T.T. Hang, V.T.D. Trang, M.N.H. Vo, B.M

- Ly, T.T.T. Van, 2019, Đa dạng sinh học vi khuẩn biển có thể nuôi cấy được tại vùng biển Nha Trang, Việt Nam, *Tạp Chí Sinh Học*, 41, pp. 109–115.
- [9] D.V. Thuoc, T.T. Loan, T.A. Trung, N.V. Quyen, Q.N. Tung, P.Q. Tien, K. Sudesh, 2020, Genome mining reveals the biosynthetic pathways of polyhydroxyalkanoate and ectoines of the halophilic strain *Salinivibrio Proteolyticus* M318 isolated from fermented shrimp paste, *Marine Biotechnology*, 22, pp. 651–660, doi:10.1007/S10126-020-09986-Z.
- [10] M.D. Maria, C.T.T. Hang, R. Thomas, N. Rhein-Knudsen, H. Jesper, T.T.T. Van, N.T. Thuan, N.T.H. Vy, J.L. Mateusz, M. Jan, P.D. Thinh, C. Mirjam, S.M. Anne, 2021, A novel thermostable prokaryotic fucoidan active sulfatase PsFucS1 with an unusual quaternary hexameric structure, *Scientific Reports*, 11, pp. 1–12, doi:10.1038/s41598-021-98588-3.
- [11] N.N. Ân, N.M. Tấn, N.T.T. Hiền, N.T.D. Hạnh, P.T. Việt, 2020, Phân lập và khảo sát điều kiện sinh tổng hợp cellulase của hai chủng vi khuẩn Th-Vk22 Và Th-Vk2, *Journal of Science and Technology - IUH*, 39(3), doi:10.46242/jst-iuh.v39i03.481.
- [12] G.C. Tú, V.L.H. Trang, L.T. Khang, 2024, Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chịu mặn tại huyện Cần Giờ, TP. Hồ Chí Minh có hoạt tính cố định đạm và hòa tan lân, *CTU Journal of Science*, 60, pp 438–447, doi:10.22144/ctujos.2024.365.
- [13] Nguyễn Thị Hà, 2012, Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng *Aspergillus protuberus* sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ, *Tạp chí Khoa học*, pp 26–35.
- [14] M. Rafiq, N. Hassan, M. Rehman, M. Hayat, G. Nadeem, F. Hassan, N. Iqbal, H. Ali, S. Zada, Y. Kang, W. Sajjad, M. Jamal, 2023, Challenges and approaches of culturing the unculturable archaea, *Biology (Basel)*, 12, doi:10.3390/BIOLOGY12121499.
- [15] C.R. Woese, G.E. Fox, 1977, Phylogentic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, pp. 5088-5090, doi:10.1073/pnas.74.11.5088.

- [16] Wikipedia, Haloarchaea, Available at <https://en.wikipedia.org/wiki/Haloarchaea>.
- [17] Industrial applications of enzymes from Haloarchaea.Pdf, 11.
- [18] I. de Castro, S. Mendo, T. Caetano, 2020, Antibiotics from Haloarchaea: what can we learn from comparative genomics?, *Marine Biotechnology*, 22, pp. 308-316, doi: 10.1007/s10126-020-09952-9.
- [19] A. Oren, 2010, Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms, *Environmental Technology*, 31, pp. 825-834, doi:10.1080/09593330903370026.
- [20] J. Li , Y. Gao, H. Dong, G.P. Sheng, 2022, Haloarchaea, excellent candidates for removing pollutants from hypersaline wastewater, *Trends in Biotechnology*, 40, pp. 226-239, doi:10.1016/j.tibtech.2021.06.006.
- [21] S. DasSarma , P. Arora , 2002, Halophiles, *Nature Publishing Group*, 8, pp. 458-466, doi:10.1038/npg.els.0000394.
- [22] F.F. Hezayen, B.H. Rehm, B.J. Tindall, A. Steinbüchel, 2001, Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the archaea from Egypt that produces extracellular poly (glutamic acid), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, pp. 1133-1142, doi: 10.1099/00207713-51-3-1133.
- [23] P.S. Adam, G. Borrel, C. Brochier-Armanet, S. Gribaldo, 2017, The growing tree of archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology, *The ISME Journal*, 11, pp. 2407-2425, doi:10.1038/ismej.2017.122.
- [24] B.J. Baker, V.D. Anda, K.W. Seitz, N. Dombrowski, A.E. Santoro, K.G. Lloyd, 2020, Diversity, ecology and evolution of archaea, *Nat Microbiol*, 5, pp. 887-900, doi:10.1038/s41564-020-0715-z
- [25] ND Youngblut, G.H. Reischer, S. Dauser, S. Maisch, C. Walzer, G. Stalder, A.H. Farnleitner, R.E. Ley, 2021, Vertebrate host phylogeny influences gut archaeal diversity, *Nature Microbiology*, 6, pp. 1443-1455, doi:10.1038/s41564-021-00980-2

- [26] B. Tschitschko , T.J. Williams, M.A. Allen, L. Zhong, M.J. Raftery, R. Cavicchioli, 2016, Ecophysiological distinctions of Haloarchaea from a hypersaline Antarctic lake as determined by Metaproteomics, *Applied and Environmental Microbiology*, 82, pp. 3165-3173, doi:10.1128/AEM.00473-16.
- [27] D. K. Verma, C. Chaudhary , L. Singh, C. Sidhu, B. Siddhardha , S. E. Prasad, K.G. Thakur, 2020, Isolation and taxonomic characterization of novel Haloarchaeal isolates from Indian solar saltern: a brief review on distribution of bacteriorhodopsins and V-Type ATPases in Haloarchaea, *Frontiers*, 11, doi:10.3389/fmicb.2020.554927
- [28] K. Sahli, M.A. Gomri, J. Esclapez, Gómez-Villegas, M.J. Bonete, R. León, K. kharraoub, 2022, Characterization and biological activities of carotenoids produced by three Haloarchaeal strains isolated from Algerian salt lakes, *Archives Microbiol*, 204(1), doi: 10.1007/s00203-021-02611-0.
- [29] A. Oren, 2008, Microbial life in extremely saline environments, *Current Opinion in Microbiology*, 11(3), pp. 238-243.
- [30] N. Devika, K. Mani, J.M. Braganca, 2024, Genomic insights on carotenoid synthesis by extremely halophilic archaea *Haloarcula rubripromontorii* BS2, *Haloferax lucentense* BBK2 and *Halogeometricum borinquense* E3 isolated from the solar salterns of India, *Scientific Reports*, 14(20214), doi:10.1038/s41598-024-70149-4.
- [31] Y.P. Sun, B.B. Wang, Z.P. Wu, X.W. Zheng, J. Hou, H.L. Cui, 2023, *Halorarius litoreus* gen. nov., sp. nov., *Halorarius halobius* sp. nov., *Haloglomus halophilum* sp. nov., *Haloglomus salinum* sp. nov., and *Natronomonas marina* sp. nov., extremely halophilic archaea isolated from tidal flat and marine solar salt, *Frontiers*, 10(1105929), doi:10.3389/fmars.2023.1105929
- [32] M. Xue, Y. Hu, X. Li, S. Tan, M. Cheng, J. Hou, H.L. Cui, 2023, *Halomicroarcula laminariae* sp. nov. and *Halomicroarcula marina* sp. nov., extremely halophilic archaea isolated from salted brown alga *Laminaria* and coastal saline-alkali lands, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(5),

doi:10.1099/ijsem.0.0058

- [33] N. Tavoosi, A.B. Sepahi, M.A. Amoozega, V. Kiarostami, 2023, Toxic heavy metal/oxyanion tolerance in Haloarchaea from some saline and hypersaline ecosystems, *Journal of Basic Microbiology*, 63(5), pp. 558-569, doi: 10.1002/jobm.202200465.
- [34] Y. Sun, Y. Liu, J. Pan; F. Wang, M. Li, 2020, Perspectives on cultivation strategies of archaea, *Microbial Ecology*, 79, pp. 770–784, doi: 10.1007/s00248-019-01422-7.
- [35] C. Desai, P. Patel, A.R. Markande, K. Kamala, P. Sivaperumal, 2020, Exploration of Haloarchaea for their potential applications in food industry, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17, pp. 4455-4464.
- [36] Manel Ben Abdallah, Nidhal Baccar, Hatem Zaghdien, Sami Sayadi, 2021, Production of poly (3-Hydroxybutyrate) by *Haloarcula*, *Halorubrum*, and *Natrinema* Haloarchaeal genera using starch as a carbon source, *Archaea*, 2021(1), doi:10.1155/2021/8888712.
- [37] E.S. Cho, I.T. Cha, R.S. Roh, M.J. Seo, 2021, *Haloferax litoreum* Sp. Nov., *Haloferax marinisediminis* Sp. Nov., and *Haloferax marinum* Sp. Nov., low salt-tolerant Haloarchaea isolated from seawater and sediment, *International Journal of Genral and Molecular Microbiology*, 114, pp. 2065–2082, doi:10.1007/S10482-021-01661-0/METRICS.
- [38] W. Ciara, D. Desai, J. LaRoche, 2019, Influence of 16S rRNA variable region on perceived diversity of marine microbial communities of the Northern North Atlantic, *FEMS microbiology letters*, 366(13), doi: 10.1093/femsle/fnz152.
- [39] K. Kurita, 2001, Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Progress in Polymer Science*, 26(9), pp. 1921-1971, doi:10.1016/S0079-6700(01)00007-7
- [40] J.E. Barboza-Corona, N.E. Mazzocco, R. Velazquez-Robledo, R. Salcedo-Hernandez, B. Jimenez, J.E. Ibarra, 2003, Cloning, sequencing and expression of the chitinases gen chiA74 from *Bacillus thuringiensis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), pp 1023–1029,

doi:10.1128/AEM.69.2.1023-1029.2003.

- [41] B. Garcí'a-Fraga, A. F. da Silva, J. Lo'pez-Seijas, C. Sieiro, 2014, Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 98, pp. 2133-2143, doi:10.1007/s00253-013-5124-2.
- [42] F. Moscoso, M. Sieira, A. Domí'nguez , F.J. Deive, M.A. Longo, M.A. Sanroma'n, 2013, Efficient biosynthesis of a chitinase from *Halobacterium salinarum* expressed in *Escherichia coli*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(11), pp. 1653-1659, doi:10.1002/jctb.4232.
- [43] J. Hou, J. Han, L. Cai, J. Zhou, Y. Lu, C. Jin, J. Liu, H. 2014, Characterization of gens for chitin catabolism in *Haloferax mediterranei*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), pp. 1185-1194, doi: 10.1007/s00253-013-4969-8.
- [44] D. Y. YSorokin, S. V. Toshchakov, T. V. Kolganova, I. V. Kublanov, 2015, Halo(natrono)archaea isolated from hypersaline lakes utilize cellulose and chitin as growth substrates, *Frontiers in Microbiology*, 6, doi: 10.3389/fmicb.2015.00942.
- [45] R. M. Yennamalli, A. J. Rader, J. D. Wolt, T. Sen Z, 2011, Thermostability in endoglucanases is fold-specific, *BMC Structural Biology*, 11(10), doi:10.1186/1472-6807-11-10.
- [46] X. Li, H.Y. Yu, 2013, Characterization of a halostable endoglucanase with organic solvent-tolerant property from *Haloarcula* sp, *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, pp. 101-106, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.08.047.
- [47] X. Li, H. Y. Yu, 2012, Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus* sp. L1, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(8), pp. 1117–1124, doi: 10.1007/s10295-012-1120-2.
- [48] A. D. Malik, I. J. Furtado, 2018, Clarification of saline textile dye waters using Haloarchaeal aerobic sequential bioreactor system,

- International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8, pp. 22-28, doi: 10.1007/s13205-021-03090-2
- [49] G. Uma, M. M. Babu, V. S. G. Prakash, S. J. Nisha, T. Citarasu, 2020, Nature and bioprospecting of haloalkaliphilics: a review, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(66), doi: 10.1007/s11274-020-02841-2.
- [50] C. M. Anderson, R. S. DeFries, R. Litterman, P. A. Matson, D. C. Nepstad, S. Pacala, W.H. Schlesinger, M.R. Shaw, P. Smith, C. Weber, C.B. Field, 2019, Natural climate solutions are not enough, *Science*, 363(6430), pp. 933-934, doi: 10.1126/science.aaw2741.
- [51] D. Barnard, A. Casanueva, M. Tuffin, D. Cowan, 2010, Extremophiles in biofuel synthesis, *Environmental Technology*, 3, pp. 871-888, doi: 10.1080/09593331003710236
- [52] T. Zhang, S. Datta, J. Eichler, N. Ivanova, S. D. Axen, C. A. Kerfeld, F. Chen, N. Kyrpides, P. Hugenholtz, J.H. Cheng, K.L. Sale, B. Simmons, E. Rubin, 2011, Identification of a haloalkaliphilic and thermostable cellulase with improved ionic liquid tolerance, *Green Chemistry*, 8, pp. 2083-2090, doi:10.1039/c1gc15193b
- [53] M. A. Amoozegar, M. Siroosi, S. Atashgahi, H. Smidt, A. Ventosa, 2017, Systematics of Haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes, *Microbiology*, 163, pp. 623-645, doi:10.1099/mic.0.000463.
- [54] Bertus van den Burg, 2003, Extremophiles as a source for novel enzymes, *Current Opinion in Microbiology*, 6, pp. 213-218, doi:10.1016/s1369-5274(03)00060-2.
- [55] D. Alsafadi, F. Paradisi, 2014, Covalent immobilization of alcohol dehydrogenase (ADH2) from *Haloferax volcanii*: how to maximize activity and optimize performance of halophilic enzymes, *Molecular Biotechnology*, 56, pp. 240-247, doi: 10.1007/s12033-013-9701-5
- [56] X. Li, H. Y. Yu, 2014, Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production, *Folia Microbiologica*, 59, pp. 455-463, doi:

10.1007/s12223-014-0320-8.

- [57] R. M. Camacho, J. C. Mateos, O. González-Reynoso, L. A. Prado, J. Córdova, 2009, Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, pp. 901-909, doi: 10.1007/s10295-009-0568-1.
- [58] M. M. Del Campo, R. M. Camacho, J. C. Mateos-Díaz, M. Müller-Santos, J. A. Córdova. J. Rodríguez , 2015, Solid-state fermentation as a potential technique for esterase/lipase production by halophilic archaea, *Extremophiles*, 19, pp. 1121-1132, doi: 10.1007/s00792-015-0784-8.
- [59] M. F. Najafi, D. Deobagkar, 2005, Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100, *Electronic Journal of Biotechnology*, 8, pp. 197-203.
- [60] K. S. Hung, S. M. Liu, W. S. Tzou, F.P. Lin, C.L. Pan, T.Y. Fang, K.H. Sun, S.J. Tang, 2011, Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1, *Process Biochemistry*, 46, pp. 1257-1263, doi:10.1016/j.procbio.2011.02.009.
- [61] M. S. Butt, M. Tahir-Nadeem, Z. Ahmad, M. T. Sultan, 2008, Xylanases and their applications in baking industry, *Food Technology and Biotechnology*, 46, pp. 22-31.
- [62] J. Elms, D. Fishwick, J. Walker, R. Rawbone, P. Jeffrey, P. Griffin, M. Gibson, A.D. Curran, 2008, Prevalence of sensitisation to cellulase and xylanase in bakery workers, *Occupational and Environmental Medicine*, 60, pp. 802-804, doi: 10.1136/oem.60.10.802.
- [63] C. Zhong, M.W. Lau, V. Balan, B.E. Dale, Y.J. Yuan, 2009, Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, pp. 667-676, doi: 10.1007/s00253-009-2001-0.
- [64] A.M. Kakhki, M A. Amoozegar, E M. Khaledi, 2011, Diversity of hydrolytic enzymes in Haloarchaeal strains isolated from salt lake, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(4), pp 705-714, doi:10.1007/BF03326255.

- [65] Pecher, A Börck, 1981, In vivo susceptibility of halophilic and methanogenic organisms to protein synthesis inhibitors, *FEMS Microbiology Letter*, 10(3), pp. 295-297, doi: 10.1111/j.1574-6968.1981.tb06258.x
- [66] A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn, F.O. Glöckner, 2013, Evaluation of genral 16S ribosomal RNA gen PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Research*, 41, doi: 10.1093/NAR/GKS808.
- [67] L. Nosalova, M. Piknova, L. Malinicova, M. Pelova, P. Pristas, 2024, Biodiversity and biotechnological potential of cultivable halophilic bacteria from Slana voda (Oravska Polhora, Slovakia) natural salt spring, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 22, pp. 8631-8642.
- [68] Rahel Elevi Bardavid, Aharon Oren, 2008, Sensitivity of *Haloquadratum* and *Salinibacter* to antibiotics and other inhibitors: implications for the assessment of the contribution of archaea and bacteria to heterotrophic activities in hypersaline environments, *FEMS Microbiology Ecology*, 63, pp. 309-315, doi: 10.1111/J.1574-6941.2007.00433.X.
- [69] E.O. Casamayor, R. Massana, S. Benlloch, L. Øvreås, B. Díez, V.J. Goddard, J.M. Gasol, I. Joint, F.R. Valera, C. Pedrós-Alió, 2002, Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of gentic fingerprinting methods in a multipond solar saltern, *Environmental Microbiology*, 4, pp 338–348, doi:10.1046/J.1462-2920.2002.00297.X.
- [70] V.L. Cono, G.L. Spada, F. Smedile, F. Crisafi, L. Marturano, A. Modica, H.H.N Khanh, P.D. Thinh, C.T.T Hang, E.A. Selivanova, N.K. Ban, M.M. Yakimov, 2024, Unique features of extremely halophilic microbiota inhabiting solar saltworks fields of Vietnam, *Microorganisms*, 12(10), pp. 1975, doi:10.3390/MICROORGANISMS12101975/S1.
- [71] L. Hu, H. Pan, Y. Xue, A. Ventosa, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant, Y. Ma, 2008, *Halorubrum luteum* sp. nov., isolated from Lake

- Chagannor, Inner Mongolia, China, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(7), pp. 1705-1708, doi:10.1099/ijs.0.65700-0.
- [72] H. Minegishi, M. Kamekura, Y. Shimane, T.K. Ihara, K. Nakasone, A. Echigo, R. Usami, T. Itoh, K. Ihara, 2012, Gene orders in the upstream of 16S rRNA genes divide genera of the family Halobacteriaceae into two groups, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(1), pp. 188-195, doi: 10.1099/ijs.0.031708-0.
- [73] A. Gibtan, H.S. Song, J.Y. Kim, Y.B. Kim, N. Park, K. Park, S.J. Lee, J. Kwon, S.W. Roh, H.S. Lee, 2018, *Halorubrum aethiopicum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from commercial rock salt, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), pp. 416-422, doi: 10.1099/ijsem.0.002525.
- [74] T.J. Mcgenity, W.D. Grant, 1995, Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov, *Systematic and Applied Microbiology*, 18, pp. 237-243, doi: 10.1016/S0723-2020(11)80394-2.
- [75] S. Chen, J. He, J. Zhang, Y. Xu, J. Huang, L.X. Ke, 2017, *Halorubrum salsamenti* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from a brine of salt mine, *Current Microbiology*, 74(11), pp. 1358-1364, doi:10.1007/s00284-017-1325-8.

PHỤ LỤC 1

Kết quả giải trình tự của chủng vi sinh vật tuyển chọn VS7M5:

> VS7M5.3- 16S rRNA

```

50   ATTCCGGTTA GATCCTGCCG GAGGCCATTG CTATTGGGAT TCGATTAGCC
100  ATGCTAGTCG CACGAGTTCA GACTCGTGGC GAATAGCTCA GTAACACGTG
150  GCCAAACTAC CCTTCGGAGC ACGATACCCT CGGGAAACTG AGGTTAATAG
200  TGCATACCAC AATCCACCTG GAATGAGGAT TGTGCCAAAT GCTCCGGCGC
250  CGAAGGATGT GGCTGCGGCC GATTAGGTAG ACGGTGGGGT AACGGCCAC
300  CGTGCCAATA ATCGGTACGG GTCATGAGAG TGAGAACCNG GAGACGGAAT
350  CTGAGACAAG ATTCCGGGCC CTACGGGGCG CAGCAGGCGC GAAACCTTTA
400  CACTGCACGC CAGTGCGATA AGGGAATCCC AAGTGCGTAG GCATAGAGCC
450  TACGCTTTTG TACACCGTAG GGAGGTGTAC GAATAAGGGC TGGGCAAGAC
500  CGGTGCCAGC CGCCGCGGTA ATACCGGCAG CCCGAGTGAT GGCCGATCTT
550  ATTGGGCCTA AAGCGTCCGT AGCTGGCCGC GCAAGTCTAT CGGAAAATCC
600  ACCCGCTCAA CGGGTGGGCG TCCGGTAGAA ACTGCGTGGC TTGGGACCGG
650  AAGGCGCGAC GGGTACGTCC GGGGTAGGAG TGAAATCCTG TAATCCTGGA
700  CGGACCACCG ATGGCGAAAG CACGTCGCGA GGACGGATCC GACAGTGAGG
750  GACGAAAGCC AGGGTCTCGA ACCGGATTAG ATACCCGGGT AGTCCTGGCC
800  GTAAACAATG TCTGTTAGGT GTGGCTCCCA CTACGAGTGG GTGCTGTGCC
850  GTAGGGAAGC CGCTAAACAG ACCGCCTGGG AAGTACGTCC GCAAGGATGA
900  AACTTAAAGG AATTGGCGGG GGAGCACTAC AACCGGAGGA GCCTGCGGTT
950  TAATTGGA CTACGCGCGA CATCTACCA GCGTCGACTG TAATAATGAC
1000 GATCAGGTTG ATGACCTTAT CCGAGTTTCA GAGAGGAGGT GCATGGCCGC)
1050 CGTCAGCTCG TACCGTGAGG CGTCCTGTTA AGTCAGGCAA CGAGCGAGAC
1100 CCGCATCCTT ACTTGCCAGC AGCACTGCGA AGTGGCTGGG GACAGTAGGG
1150 AGACCGCCGT GGCCAACACG GAGGAAGGAA CGGGCAACGG TAGGTCAGTA
1200 TGCCCCGAAT GCGCTGGGCA ACACGCGGGC TACAATGGTC GAGACAAAGG
1250 GTTCCAAC TC GAAAGGAGA CGGTAATCTC AGAACTCGA TCGAGTTCGG
1300 ATTGTGGGCT GCAACTCGCC CACATGAAGC TGGATTCGGT AGTAATCGCG
1350 TGTATAAGC GCGCGGTGAA TACGTCCCTG CTCCTTGAC ACACCGCCCG
1400 TCAAAGCACC CGAGTGAGGT CCGGATGAGG CTCGTTACAC GAGTCGAATC
1450 TGGGCTTCGC AAGGGGGCTT AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG TAGGGGAATC
1453 TGCGGCTGGA TCA

```

Hà Nội, ngày 27 tháng 11 năm 2024

GIẤY CHỨNG NHẬN

Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhận được bài báo: “Bước đầu phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cổ ưa mặn tiềm năng sinh cellulase, chitinase, xylanase và hyaluronidase” của các tác giả: Cao Thị Thúy Hằng^{1, 2}, Nguyễn Thị Thuận¹, Võ Thị Diệu Trang¹, Phan Thị Thuỳ Trang², Đinh Thành Trung¹, Trần Nguyễn Hà Vy¹, Hoàng Hồng Hạnh¹, Phạm Đức Thịnh^{1, 2}, Huỳnh Hoàng Như Khánh^{1, 2}.

¹*Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang,*

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²*Học viện Khoa học và Công nghệ,*

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Bài báo này chúng tôi đã tiến hành biên tập, phản biện và chấp nhận đăng tải trên Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Bản B) trong thời gian thích hợp.

Tạp chí làm Giấy chứng nhận này để các tác giả sử dụng khi cần thiết.

TỔNG BIÊN TẬP



TS. Nguyễn Thị Hương Giang

**Bước đầu phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cổ ưa mặn tiềm năng sinh
cellulase, chitinase, xylanase và hyaluronidase**

**Cao Thị Thúy Hằng^{1,2}, Nguyễn Thị Thuận¹, Võ Thị Diệu Trang¹,
Phan Thị Thuỳ Trang², Đinh Thành Trung¹, Trần Nguyễn Hà Vy¹,
Hoàng Hồng Hạnh¹, Phạm Đức Thịnh^{1,2}, Huỳnh Hoàng Như Khánh^{1,2*}**

¹*Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2 Hùng Vương, phường Lộc Thọ, TP Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam*

²*Học viện Khoa học và công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Ngày nhận bài 8/11/2024; ngày chuyển phản biện 11/11/2024; ngày nhận phản biện 18/11/2024; ngày chấp nhận đăng 27/11/2024

Tóm tắt:

Haloarchaea là vi khuẩn cổ ưa mặn có khả năng sản sinh enzyme hoạt động hiệu quả trong môi trường siêu mặn. Nghiên cứu này đã phân lập 27 chủng vi sinh vật từ cánh đồng muối Hòn Khói, Khánh Hòa và sàng lọc năm chủng tiềm năng thuộc nhóm haloarchaea qua thử nghiệm độ nhạy anisomycin. Các chủng này được sàng lọc khả năng sinh enzyme phân giải polysaccharide như cellulase/xylanase, chitinase và hyaluronidase bằng phương pháp đĩa thạch sử dụng cơ chất CMC, chitin và acid hyaluronic. Kết quả cho thấy, chủng VS7M5.3 có hoạt tính mạnh trên cả ba cơ chất, đặc biệt với CMC và acid hyaluronic. Hai chủng VS7M5.1 và VS7M5.7 cũng có hoạt tính enzyme đáng chú ý. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam tập trung vào vi khuẩn cổ nuôi cấy được, phân lập từ môi trường siêu mặn tại đồng muối Hòn Khói và sàng lọc thành công các chủng tiềm năng sinh enzyme phân giải polysaccharide. Nghiên cứu đã bước đầu xác định các chủng có hoạt tính enzyme mạnh, đặc biệt là VS7M5.3, mở ra tiềm năng khai thác nguồn vi sinh vật bản địa cho các ứng dụng công nghệ sinh học.

Từ khóa: cellulase, chitinase, haloarchaea, hyaluronidase, xylanase.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

**Preliminary isolation and screening of halophilic archaea with potential to
produce cellulase, chitinase, xylanase, and hyaluronidase enzymes**

**Thi Thuy Hang Cao^{1,2}, Thi Thuan Nguyen¹, Thi Dieu Trang Vo¹,
Thi Thuy Trang Phan Phan², Thanh Trung Dinh¹, Nguyen Ha Vy Tran¹,
Hong Hanh Hoang¹, Duc Thinh Pham^{1,2}, Hoang Nhu Khanh Huynh^{1,2*}**

¹*Nhatrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology, 2 Hung Vuong Street, Nha Trang City, Khanh Hoa Province, Vietnam*

²*Graduate University of Sciences and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam*

Received 8 November 2024; revised 2 December 2024; accepted 6 December 2024

Abstract:

Haloarchaea are halophilic archaea capable of producing enzymes that function effectively in hypersaline environments. This study isolated 27 microbial strains from the salt fields of Hon Khoi, Khanh Hoa, and screened five potential haloarchaea strains using anisomycin sensitivity tests. These strains were assessed for their ability to produce polysaccharide-degrading enzymes, including cellulase or xylanase, chitinase, and hyaluronidase, using agar plate assays with carboxymethyl cellulose (CMC), chitin, and hyaluronic acid as substrates. The results showed that strain VS7M5.3 exhibited strong activity on all three substrates, particularly carboxymethyl cellulose and hyaluronic acid. Two other strains, VS7M5.1 and VS7M5.7, also demonstrated noteworthy enzyme activities. This is the first study in Vietnam to focus on culturable halophilic archaea isolated from hypersaline environments in the salt fields of Hon Khoi, successfully screening potential strains for polysaccharide - degrading enzyme production. The study has preliminarily identified strains with strong enzymatic activity, especially VS7M5.3, highlighting the potential of exploiting local microbial resources for biotechnological applications.

Keywords: cellulase, chitinase, haloarchaea, hyaluronidase, xylanase.

Classification numbers: 1.6, 4.6

1. Đặt vấn đề

Haloarchaea, hay vi khuẩn cổ ưa mặn, là nhóm vi sinh vật phát triển mạnh trong các môi trường siêu mặn như hồ muối, biển Chết và các đồng muối nhân tạo [1, 2]. Các vi sinh vật này có khả năng chịu nồng độ muối cao nhờ cơ chế thích nghi đặc biệt, đồng thời sản sinh các enzyme có hoạt tính vượt trội trong điều kiện khắc nghiệt. Trong môi trường siêu mặn, nguồn carbon chủ yếu bao gồm cellulose, xylan, chitin, và hemicellulose - những polysaccharide đóng vai trò quan trọng trong chu trình carbon trên trái đất [3, 4].

Cellulose, xylan, và chitin là các polysaccharide chính, cấu thành thành tế bào thực vật và vỏ chitin của động vật, đại diện cho nguồn carbon hữu cơ lớn nhất trong hệ sinh thái trên cạn và đại dương [5]. Để sử dụng những nguồn carbon này, các vi sinh vật siêu mặn, bao gồm Haloarchaea, sản sinh các enzyme chuyên biệt như cellulase, xylanase và chitinase. Các enzyme này không chỉ phân giải polysaccharide thành năng lượng mà còn có những đặc tính đặc biệt như chịu mặn, bền nhiệt và ổn định ở pH thấp, làm cho Haloarchaea trở thành đối tượng tiềm năng trong các ứng dụng công nghiệp, xử lý môi trường, nông nghiệp và thủy sản [3].

Đặc biệt, enzyme hyaluronidase - thủy phân acid hyaluronic (HA), một polysaccharide quan trọng trong cơ thể người và động vật - đang nhận được nhiều sự chú ý. HA đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sinh học như di chuyển tế bào, biệt hóa, sửa chữa tổn thương và điều trị ung thư. Tuy nhiên, trọng lượng phân tử cao của HA làm giảm khả năng hấp thụ và hiệu quả điều trị, đòi hỏi sự phát triển các enzyme sinh học an toàn để cắt mạch HA, tạo ra các sản phẩm có khối lượng phân tử thấp với ứng dụng tiềm năng trong y-dược phẩm [6]. Các nghiên cứu phân tích hệ gen gần đây đã phát hiện nhiều enzyme thuộc nhóm CAZyme (Carbohydrate - Active enzymes) từ Haloarchaea, trong đó có hyaluronidase, nhấn mạnh tiềm năng lớn của nhóm vi sinh vật này trong công nghệ sinh học.

Tại Việt Nam, mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về cellulase, xylanase và chitinase từ vi khuẩn hiếu khí, vi nấm, hoặc vi sinh vật chịu mặn thông thường [7-9], các nghiên cứu về enzyme từ Haloarchaea vẫn còn rất hạn chế. Việc nghiên cứu nhóm vi khuẩn cổ này gặp nhiều thách thức vì các chủng chịu mặn khó phân lập và nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm [10]. Hầu hết các phân tích vi sinh vật biển hiện nay tập trung vào đa dạng hệ gen (metagenomics), thay vì các nghiên cứu thực nghiệm về khả năng sản sinh enzyme [11, 12].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và tuyển chọn các chủng Haloarchaea từ đồng muối Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam. Mục tiêu chính là xác định các chủng có khả năng sản xuất enzyme thủy phân polysaccharide (cellulase, xylanase, chitinase và hyaluronidase), từ đó tìm kiếm nguồn enzyme đặc biệt phục vụ các ứng dụng công nghệ sinh học hiện đại. Đây là bước đầu tiên để khai thác tiềm năng từ nguồn tài nguyên vi sinh vật bản địa, đồng thời cung cấp dữ liệu thực nghiệm góp phần phát triển lĩnh vực công nghệ sinh học.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu được thu thập tại cánh đồng muối Hòn Khói, Ninh Diêm, Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa, một trong những khu vực sản xuất muối lớn nhất miền Trung Việt Nam vào tháng 6/2023. Mẫu được thu thập từ các vị trí được chọn tại ruộng muối, chứa trong chai nhựa vô trùng, bảo quản ở 4°C và chuyển về phòng thí nghiệm (hình 1).

Ký hiệu mẫu	Mẫu	Vị trí thu mẫu	Độ mặn của mẫu (g/Lít)	Nhiệt độ tại thời điểm thu mẫu (°C)	pH mẫu
VS1	Nước muối và trầm tích	12°32'7.732" N	375	40,8	7,07
VS7	Nước muối	12°32'16.735" N	165	36,5	7,60
VS8	Nước muối	12°32'20.868" N	320	42,8	6,80
VS9	Nước muối và trầm tích	12°32'23.496" N	340	60,2	6,90



Hình 1. Địa điểm thu mẫu ở các ruộng muối Hòn Khói, Khánh Hòa vào tháng 6/2023.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu: Xylan (Megazyme - Ireland), Cellulose (Sigma, Đức), Chitin (Sigma, Đức), cao chiết nấm men (YE) (Merck, Đức), Pepton (Sigma, Đức), kháng sinh anisomycin (Santa Cruz, Mỹ), Hyaluronic acid chiết xuất từ dây rốn người (HA) (Sigma, Đức) và các hóa chất khác đều có nguồn gốc từ Hãng Sigma, Đức.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập cổ khuẩn Haloarchaeae: Một lượng 100 µl từ mỗi mẫu được cấy vào môi trường tăng trưởng (MGM) với nồng độ muối 23% (w/v). Môi trường MGM bao gồm: 1% (w/v) soy peptone, 0,5% yeast extract, 1,5% agar và các loại muối: 3,1 M NaCl, 0,1 M MgCl₂·6H₂O, 0,1 M MgSO₄·7H₂O, 0,07 M KCl và 5×10⁻³ M CaCl₂·2H₂O (dung dịch CaCl₂ được tiệt trùng riêng trước khi bổ sung vào môi trường). Độ pH của môi trường được điều chỉnh trong khoảng 7,2-7,4. Các mẫu đã cấy được ủ ở 40°C trong thời gian tối đa một tháng. Các khuẩn lạc sẽ mọc trên màng lọc và tiếp tục được chuyển sang môi trường MGM nhiều lần để được dòng thuần. Các chủng này được bảo quản trong tủ lạnh để lưu trữ ngắn hạn và sử dụng nitơ lỏng để bảo quản lâu dài ở -80°C [13].

Thử nghiệm độ nhạy của vi sinh vật đối với kháng sinh: Để xác định các chủng Haloarchaea trong số các chủng vi sinh vật đã phân lập, thử nghiệm độ nhạy kháng sinh anisomycin được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Mỗi đĩa thạch được sử dụng chứa 30 µg kháng sinh anisomycin [3, 13]: Các chủng vi sinh vật nhạy cảm với anisomycin được lựa chọn để tiếp tục sàng lọc khả năng sinh enzyme thủy phân polysaccharide, bao gồm chitinase, cellulase, xylanase và hyaluronidase.

Sàng lọc Haloarchaea theo định hướng sinh enzyme thủy phân chitin: Để sàng lọc định tính khả năng sinh chitinase, các chủng cổ khuẩn thuần được cấy trên môi trường thạch MGM không chứa peptone, bổ sung 23% (w/v) muối và 1% (w/v) chitin nguồn carbon duy nhất, ủ ở 40°C trong 15-30 ngày. Vùng trong suốt xung quanh các vùng sinh khối vi sinh vật chỉ thị sự sinh chitinase [13].

Sàng lọc Haloarchaea theo định hướng sinh enzyme thủy phân cellulose/xylan: Để sàng lọc định tính khả năng sinh cellulase/xylanase, các chủng cổ khuẩn thuần được cấy trên môi trường thạch MGM không chứa peptone, bổ sung 23% (w/v) muối và 1% (w/v) CMC nguồn carbon duy nhất, ủ ở 40°C trong 15-30 ngày. Sau đó, đĩa môi trường được nhuộm với dung dịch thuốc nhuộm iodin trong 15 phút, cuối cùng đĩa thạch được rửa lại với nước nhiều lần để nhìn thấy vòng phân giải rõ ràng, chủng vi sinh thủy phân CMC sẽ tạo vùng không màu xung quanh điểm sinh khối vi sinh vật phát triển.

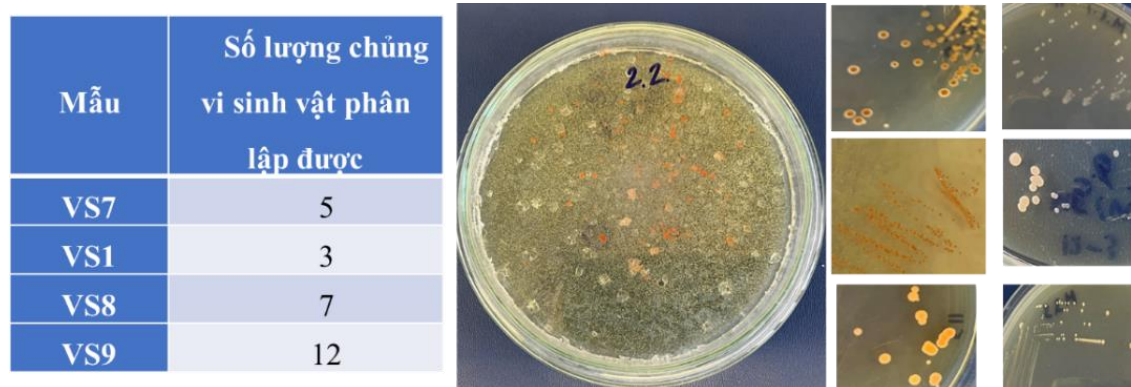
Phương pháp sàng lọc Haloarchaea sinh hyaluronidase: Hoạt tính hyaluronidase được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Môi trường thạch được chuẩn bị với các thành phần: 1% thạch Noble, 0,4 mg/ml hyaluronic acid, 1% muối NaCl, albumin huyết thanh bò (BSA) và 0,1% sodium azide, tạo ra các giếng đường kính 6mm trên đĩa thạch. Để kiểm tra hoạt tính enzyme, 0,1 ml dung dịch nuôi cấy vi sinh trong môi trường MGM được thêm vào từng giếng. Sau đó, các đĩa được ủ ở 37°C trong 3-5 ngày, tiếp theo nhuộm đĩa thạch với dung dịch acetic acid 2N trong 30 phút. Trong môi trường này, hyaluronic acid không bị phân hủy sẽ tạo thành kết tủa, làm vùng thạch xung quanh giếng trở nên mờ đục. Các vùng trong suốt xuất hiện quanh giếng là dấu hiệu của hoạt tính enzyme hyaluronidase, cho thấy sự phân hủy hyaluronic acid bởi enzyme do vi sinh vật tiết ra.

Phương pháp xử lý số liệu: Các thử nghiệm đánh giá hoạt tính enzyme được thực hiện ít nhất ba lần lặp lại độc lập.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập cổ khuẩn từ các mẫu thu ở các đồng muối Hòn Khói

Khu vực Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, nổi tiếng với các cánh đồng muối tự nhiên, tạo nên môi trường siêu mặn đặc trưng và lý tưởng cho sự phát triển của các vi sinh vật ưa mặn, đặc biệt là vi khuẩn cổ. Các hệ sinh thái siêu mặn này đóng vai trò như một nguồn tài nguyên quý giá để nghiên cứu các vi sinh vật ưa cực, vốn có khả năng sinh tồn và hoạt động hiệu quả trong điều kiện khắc nghiệt.



Hình 2. Các chủng vi sinh vật trên môi trường phân lập sau 3 tuần nuôi cấy và một số khuẩn lạc đã được làm thuần.

Từ 4 mẫu thu nhận tại ruộng muối Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, đã phân lập được 27 chủng vi sinh vật, một số đặc điểm của vi sinh vật phân lập được thể hiện ở hình 2. Trong tổng số 27 chủng vi sinh vật đã được phân lập, mẫu VS9 có số lượng vi sinh vật được phân lập nhiều nhất (12 chủng), tiếp theo là mẫu VS8 (7 chủng), VS7 (5 chủng), và thấp nhất là VS1 (3 chủng). So với nghiên cứu của M.Y. Bafghi và cs (2019) [13] (phân lập được 500 chủng từ 3 mẫu), số lượng chủng phân lập trong nghiên cứu này thấp hơn. Sự khác biệt có thể bắt nguồn từ điều kiện môi trường, như nồng độ muối, hàm lượng chất hữu cơ, hoặc phương pháp phân lập. Cụ thể, hàm lượng muối trong các mẫu của nghiên cứu này dao động từ 165375 g/l, cao hơn rất nhiều so với mức 2,3-2,8 g/l trong các mẫu của M.Y. Bafghi và cs (2019) [13]. Điều này cho thấy, các chủng vi sinh vật được phân lập trong nghiên cứu này là những chủng có khả năng thích nghi và tồn tại ở điều kiện siêu mặn, đặc trưng của môi trường đồng muối. Ngoài ra, nhiệt độ tại thời điểm thu mẫu dao động từ 36,5 đến 60,2°C và môi trường nuôi cấy được duy trì ở 40°C trong 4 tuần nuôi cấy, cho thấy các chủng vi sinh vật này cũng có khả năng chịu nhiệt cao, phù hợp với các điều kiện khắc nghiệt của môi trường siêu mặn.

Hình ảnh các đĩa phân lập cho thấy các chủng vi sinh vật có sự khác biệt rõ rệt về hình thái khuẩn lạc, bao gồm kích thước, màu sắc và bề mặt khuẩn lạc. Đặc biệt là các khuẩn lạc có màu đỏ hoặc hồng và kết hợp với các thông tin từ các nghiên cứu trước đây, có thể dự đoán rằng đây là các chủng cổ khuẩn có khả năng thuộc các họ *Haloarculaceae*, *Halobacteriaceae* và *Haloferacaceae*. Các họ này bao gồm các chi như *Halorubrum*, *Haloferax* và *Haloarcula*, vốn phổ biến trong môi trường siêu mặn và thường thể hiện màu sắc khuẩn lạc đặc trưng do sự hiện diện của sắc tố carotenoid như bacterioruberin [14].

Với điều kiện độ mặn cao (165-375 g/l) tại đồng muối Hòn Khói, các chủng phân lập được nhiều khả năng là các loài ưa mặn cực đoan (extreme halophiles), phù hợp với các loài cổ khuẩn đã được nghiên cứu [15]. Hơn nữa, kết quả phân tích metagenomics trong một công bố liên quan của chúng tôi đã xác định rằng các nhóm cổ khuẩn chính trong mẫu nghiên cứu bao gồm *Halorubrum*, *Halobacterium* và *Haloarcula* từ các họ *Halobacteriaceae*, *Haloferacaceae* và *Haloarculaceae*. Đặc biệt, mẫu VS7 có sự hiện diện cao của nhóm *Nanohaloarchaeota* (78,5%), cho thấy tính đặc thù về điều kiện môi trường siêu mặn tại khu vực đồng muối này [16].

Trong số 27 chủng vi sinh vật được phân lập, để bước đầu xác định chúng thuộc nhóm cổ khuẩn hay vi khuẩn chịu mặn, chúng tôi tiến hành thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh anisomycin [13]. Anisomycin là một kháng sinh được biết đến với khả năng ức chế

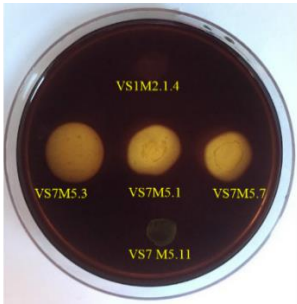
tổng hợp protein ở sinh vật nhân thực và cổ khuẩn bằng cách gắn vào vị trí trung tâm peptidyl transferase trên ribosome, ngăn chặn sự hình thành liên kết peptide trong quá trình dịch mã. Tuy nhiên, ribosome của vi khuẩn nhân sơ, bao gồm cả vi khuẩn chịu mặn, có cấu trúc khác biệt tại vị trí này, khiến anisomycin không thể gắn kết hiệu quả, dẫn đến sự kháng thuốc tự nhiên ở các vi khuẩn này [17]. Kết quả cho thấy, có 5 chủng vi sinh vật nhạy cảm với anisomycin, bao gồm VS1M2.1.4, VS7M5.1, VS7M5.3, VS7M5.7 và VS7M5.11. Các chủng vi sinh vật này được sử dụng để sàng lọc khả năng sinh enzyme phân cắt chitin, cellulose/xylan và HA.

3.2. Kết quả sàng lọc haloarchaeae có khả năng sinh enzyme phân cắt chitin, cellulose/xylan và acid hyaluronic

Haloarchaea là nhóm vi sinh vật cực đoan có khả năng thích nghi và phát triển trong môi trường có nồng độ muối cao, đồng thời có tiềm năng ứng dụng lớn trong các quy trình công nghệ sinh học hiện đại nhờ khả năng tổng hợp các enzyme hoạt động hiệu quả ở điều kiện khắc nghiệt. Trong nghiên cứu này, 5 chủng vi sinh vật, bao gồm VS1M2.1.4, VS7M5.1, VS7M5.3, VS7M5.7 và VS7M5.11 đã được sàng lọc khả năng phân giải polysaccharide, cụ thể với các cơ chất sử dụng là chitin, CMC và acid HA. Kết quả thử nghiệm, được trình bày chi tiết ở bảng 1, cho thấy các chủng này có tiềm năng sản sinh enzyme với hoạt tính phân giải rõ rệt trên các cơ chất polysaccharide thử nghiệm.

Bảng 1. Hoạt tính trên các cơ chất chitin, carboxymethyl cellulose và acid hyaluronic của Haloarchaea.

Ký hiệu chủng cổ khuẩn	Hoạt tính enzyme trên các cơ chất		
	Chitin	Carboxymethyl cellulose	Acid hyaluronic
VS1M2.1.4	+/-	-	+/-
VS7M5.1	+/-	+++	+
VS7M5.3	++	+++	+++
VS7M5.7	++	++	+/-
VS7 M5.11	+/-	-	++



Đĩa thạch carboxymethyl cellulose

+/-: hoạt tính rất yếu hoặc không rõ ràng; +: hoạt tính yếu; ++: hoạt tính trung bình; +++: hoạt tính mạnh.

Kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy, sự khác biệt đáng kể về hoạt tính enzyme giữa các chủng cổ khuẩn phân lập. Trong đó, chủng VS7M5.3 và VS7M5.1 nổi bật với hoạt tính cao trên CMC, cho thấy khả năng sản sinh enzyme cellulase và xylanase. Đây là các enzyme quan trọng trong công nghiệp năng lượng sinh học, đặc biệt trong việc chuyển hóa lignocellulose thành nhiên liệu sinh học như bioethanol [18]. Ngoài ra, trong lĩnh vực xử lý sinh học, enzyme cellulase và xylanase từ các chủng này có thể được ứng dụng để phân hủy chất thải nông nghiệp giàu lignocellulose trong môi trường mặn, giúp giảm thiểu ô nhiễm và tạo ra các sản phẩm có giá trị.

Hoạt tính chitinase được ghi nhận ở mức trung bình đối với VS7M5.3 và VS7M5.7, trong khi các chủng khác có hoạt tính yếu hoặc không rõ ràng. Các enzyme chitinase không chỉ hỗ trợ xử lý sinh học chất thải như vỏ tôm, cua mà còn tạo ra các sản phẩm giá trị gia tăng như N-acetylglucosamine, một hợp chất quan trọng trong y học và công nghiệp thực phẩm. Tại Việt Nam, mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về vi sinh vật sinh chitinase như

Aspergillus spp. [9], *Bacillus* spp. [19], các nghiên cứu về chitinase từ cổ khuẩn vẫn còn hạn chế. Do đó, kết quả này cung cấp thông tin mới, góp phần mở rộng phạm vi nghiên cứu vi sinh vật sinh enzyme tại các khu vực siêu mặn trong nước.

Về khả năng sinh hyaluronidase, chủng VS7M5.3 thể hiện hoạt tính cao nhất, trong khi VS7M5.11 đạt mức trung bình và các chủng khác có hoạt tính thấp hơn. Hyaluronidase là enzyme thủy phân HA, một polysaccharide quan trọng tham gia vào các quá trình sinh lý và bệnh lý như di chuyển tế bào, sửa chữa tổn thương và hỗ trợ điều trị ung thư [6]. Sự ổn định của enzyme này trong môi trường mặn cao từ các chủng cổ khuẩn có thể mở ra tiềm năng ứng dụng trong y học, đặc biệt là sản xuất các chế phẩm HA có trọng lượng phân tử thấp.

Nhìn chung, chủng VS7M5.3 nổi bật với hoạt tính enzyme cao trên cả ba cơ chất, cho thấy tiềm năng ứng dụng đa dạng trong các ngành công nghiệp liên quan đến năng lượng sinh học, xử lý chất thải và y sinh học. Các phát hiện này không chỉ làm phong phú thêm dữ liệu về vi sinh vật tại Việt Nam mà còn mở ra hướng khai thác các enzyme từ cổ khuẩn trong môi trường khắc nghiệt, góp phần vào phát triển công nghệ sinh học bền vững.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và sàng lọc thành công 27 chủng vi sinh vật từ môi trường siêu mặn tại ruộng muối Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, trong đó có 5 chủng được xác định thuộc nhóm Haloarchaea nhờ khả năng nhạy cảm với anisomycin. Đây là các chủng cổ khuẩn nuôi cấy được trong điều kiện phòng thí nghiệm, một bước quan trọng trong việc nghiên cứu và khai thác tiềm năng của nhóm vi sinh vật này. Kết quả sàng lọc cho thấy, hai chủng có hoạt tính phân giải mạnh với CMC, một chủng có hoạt tính cao với hyaluronan và hai chủng khác thể hiện hoạt tính trung bình trên cơ chất chitin chứng tỏ khả năng sinh enzyme cellulase/xylanase, chitinase và hyaluronidase. Những phát hiện này không chỉ khẳng định khả năng sinh enzyme phân giải polysaccharide của các chủng cổ khuẩn mà còn mở ra hướng nghiên cứu sâu hơn để thu nhận enzyme và phát triển các ứng dụng trong công nghệ sinh học.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Nhiệm vụ Hợp tác quốc tế mã số QTIT01.01/23-24. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ quý báu từ những người nông dân và chủ nhân của cánh đồng muối Hòn Khói, Ninh Diêm, Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa trong quá trình thu thập mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Tschitschko, T.J. Williams, M.A. Allen, et al. (2016), “Ecophysiological distinctions of Haloarchaea from a Hypersaline Antarctic Lake as determined by metaproteomics”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, pp.3165-3173, DOI: 10.1128/AEM.00473-16.
- [2] J. Li, Y. Gao, H. Dong, et al. (2022), “Excellent candidates for removing pollutants from hypersaline wastewater”, *Trends Biotechnol.*, **40**, pp.226-239, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2021.06.006.
- [3] A.K. Makhdoumi, M.A. Amoozegar, K.E. Mahmodi (2011), “Diversity of hydrolytic enzymes in Haloarchaeal strains isolated from salt Lake”, *International Journal of Environmental Science & Technology*, **8(4)**, pp.705-714, DOI: 10.1007/BF03326255.

[4] R.M. Espinosa, M.G. Alonso, L.S. Cabrera, et al. (2022), “Industrial applications of enzymes from Haloarchaea”, *Extremozymes and Their Industrial Applications*, pp.289-320, DOI: 10.1016/B978-0-323-90274-8.00014-9.

[5] J. Verbančič, J.E. Lunn, M. Stitt, et al. (2018), “Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis”, *Mol. Plant*, **11**, pp.75-94, DOI: 10.1016/J.MOLP.2017.10.004.

B.A. Buhren, H. Schruppf, N.P. Hoff, et al. (2016), “Hyaluronidase: From clinical applications to molecular and cellular mechanisms”, *Eur. J. Med. Res.*, **21**, DOI: 10.1186/S40001-016-0201-5.

[7] N.N. An, N.M. Tan, N.T.T. Hien, et al. (2019), “Isolation, selection and enhanced cellulase production of TH-VK22 and TH-VK24 bacterial strains”, *Journal of Science and Technology*, **39B**, pp.248-259, DOI: 10.46242/jst-juh.v39i03.481.

[8] C.T. Giang, L.H.T. Vo, T.K. Le (2024), “Isolation and selection of salt tolerant bacteria in Can Gio district, Ho Chi Minh city with fixed nitrogen and phosphate solubilizing activity”, *CTU Journal of Science*, **60**, pp.438-447, DOI: 10.22144/ctujos.2024.365.

[9] N.T. Ha (2012), “Optimisation of the culture conditions for chitinase production by aspergillus protuberans isolated from Can Gio mangrove forest”, *CTU Journal of Science*, **22B**, pp.26-35.

[10] M. Rafiq, N. Hassan, M. Rehman, et al. (2023), “Challenges and approaches of culturing the unculturable archaea”, *Biology (Basel)*, **12(12)**, DOI: 10.3390/biology12121499.

[11] L.M. Cyclic, S. Dassarma, W. Pecher, et al. (2020), “Metagenomic insights into the diversity of halophilic microorganisms indigenous to the karak salt mine”, *Pakistan*, **11**, pp.1-14, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01567.

[12] S. Nag, P. DasSarma, D.J. Crowley, et al. (2023), “Genomic analysis of Haloarchaea from diverse environments, including permian halite, reveals diversity of ultraviolet radiation survival and DNA photolyase gene variants”, *Microorganisms*, **11**, DOI: 10.3390/microorganisms11030607.

[13] M.Y. Bafghi, H. Babavalian, M.A. Amoozegar (2019), “Isolation, screening and identification of Haloarchaea with chitinolytic activity from hypersaline Lakes of Iran”, *Arch. Biol. Sci.*, **71**, pp.71-81, DOI: 10.2298/ABS180525049Y.

[14] E.S. Cho, I.T. Cha, S.W. Roh, et al. (2021), “*Haloferax litoreum* Sp. Nov., *Haloferax marinisediminis* Sp. Nov., and *Haloferax marinum* Sp. Nov., low salt-tolerant Haloarchaea isolated from seawater and sediment”, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **114**, pp.2065-2082, DOI: 10.1007/S10482-021-01661-0/metrics.

[15] E.O. Casamayor, R. Massana, S. Benlloch, et al. (2002), “Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern”, *Environ. Microbiol.*, **4**, pp.338-348, DOI: 10.1046/J.1462-2920.2002.00297.X.

[16] V.L. Cono, G.L. Spada, F. Smedile, et al. (2024), “Unique features of extremely halophilic microbiota inhabiting solar saltworks fields of Vietnam”, *Microorganisms*, **12**, DOI: 10.3390/Microorganisms12101975/S1.

[17] R.E. Bardavid, A. Oren (2008), “Sensitivity of haloquadratum and salinibacter to antibiotics and other inhibitors: Implications for the assessment of the contribution of

archaea and bacteria to heterotrophic activities in hypersaline environments”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **63**, pp.309-315, DOI: 10.1111/J.1574-6941.2007.00433.X.

[18] P. Bajaj, R. Mahajan (2019), “Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**, pp.8711-8724, DOI: 10.1007/S00253-019-10146-0/METRICS.

[19] L.T. Mai, L.V.K. Trang, C.K. Cuong, et al. (2020), “Study on selection of chitinase - producing *Bacillus thuringiensis* and survey their chitinase biosynthesis affecting factors”, *Journal of Science and Technology, University of Danang*, **18**, pp.56-61.

Số: 224 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 11 tháng 4 năm 2025

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 364/QĐ-VHL ngày 01/03/2025 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 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 850/QĐ-HVKHCN ngày 31/05/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học đợt 1 năm 2021;

Căn cứ Quyết định số 64/QĐ-HVKHCN ngày 26/02/2024 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;

Căn cứ Quyết định số 1226/QĐ-HVKHCN ngày 01/11/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc gia hạn thời gian học tập lần 3 cho học viên Phan Thị Thùy Trang;

Xét đề nghị của Trưởng khoa Sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Phan Thị Thùy Trang với đề tài: “Phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn có tiềm năng sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide”

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.

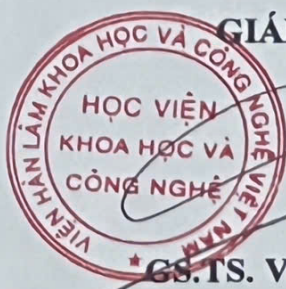
Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

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

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa 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.07.

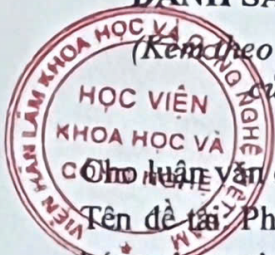


GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lâm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 224 /QĐ-HVKHCN ngày 11 / 4 /2025
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Cho luận văn của học viên: Phan Thị Thùy Trang

Tên đề tài: Phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn có tiềm năng sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: 1. TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh

- Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Cao Thị Thúy Hằng

- Viện Hải dương 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.	PGS.TS. Đào Việt Hà	Hóa sinh học	Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	TS. Lê Đình Hải	Ký sinh trùng và vi sinh vật học thú y	Phân Viện Thú Y Miền Trung, Bộ Nông nghiệp và Môi trường	Phản biện 1
3.	TS. Nguyễn Xuân Vy	Sinh học	Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 2
4.	TS. Phan Thị Hoài Trinh	Công nghệ sinh học	Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	TS. Phan Quốc Thông	Vật liệu Y sinh	Trường Đại học Khánh Hòa, Ủy ban Nhân dân tỉnh Khánh Hòa	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./. *[Signature]*



Nha Trang, ngày 22 tháng 05 năm 2025

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 224/QĐ-HVKHCN ngày 11/04/2025 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 Phan Thị Thùy Trang

Tên đề tài: Phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn có tiềm năng sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 22/05/2025 Hội đồng đã họp tại Phòng họp tầng 1, Viện Hải dương học (cơ sở số 02 Hùng Vương) vào lúc 09h00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

1. PGS.TS. Đào Việt Hà
2. TS. Phan Thị Hoài Trinh
3. TS. Lê Đình Hải
4. TS. Nguyễn Xuân Vy
5. TS. Phan Quốc Thông

- Chủ tịch hội đồng
Thư ký hội đồng
Phản biện 1
Phản biện 2
Ủy viên hội đồng

Thành viên vắng mặt: 0/5 (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

1. Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
2. Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
3. Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
4. Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
5. **Phản biện 1: TS. Lê Đình Hải** thông qua bản nhận xét của về luận văn và có những ý chính như sau:

- Đề tài cung cấp dữ liệu khoa học quan trọng về khả năng sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide của các chủng Haloarchaea ở Việt Nam, mở ra định hướng ứng dụng sản xuất enzyme phục vụ công nghiệp và y học.



- Kết quả luận văn được trình bày, rõ ràng, trung thực và chính xác.
- Nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo.
- Nội dung nghiên cứu trình bày rõ ràng, đầy đủ, khoa học, phù hợp với nội dung nghiên cứu, phương pháp, vật liệu nghiên cứu được trình bày chi tiết, đầy đủ cơ sở khoa học và phù hợp với các nội dung, mục tiêu nghiên cứu. Nghiên cứu mang tính khoa học và có độ tin cậy cao. Tài liệu tham khảo được trích dẫn đầy đủ và được cập nhật đến năm 2024.

- Kết quả nghiên cứu:

- + Đã sàng lọc được 5 chủng vi khuẩn cổ trong số 27 chủng vi khuẩn phân lập.
- + Đã đánh giá tiềm năng sinh enzyme thủy phân polysaccharide của 5 chủng vi khuẩn cổ từ đó chọn được 02 chủng có hoạt tính mạnh đối với chitin, cellulose/xylan và hyaluronic acid.
- + Đã khuếch đại và giải trình tự gen 16S RNA của 1 chủng vi khuẩn cổ có hoạt tính cao nhất và xác định có độ tương đồng cao với các chủng thuộc chi *Halorubrum*.

- Những điểm cần chỉnh sửa trong luận văn:

- + Phần mở đầu cần bổ sung ý nghĩa khoa học và thực tiễn, đóng góp mới của đề tài.
- + Phần phương pháp cần bổ sung tài liệu tham khảo.
- + Phương pháp mục 2.2.2.4 xác định đặc điểm hình thái của các chủng cổ khuẩn tuyển chọn không trình bày kết quả, nên có thể lược bỏ.
- + Xem xét đổi tên mục 2.2.1.3 thử nghiệm độ nhạy vi sinh vật đối với kháng sinh thành sàng lọc các chủng vi khuẩn cổ nếu mục đích của thí nghiệm này là sàng lọc.
- + Chỉnh sửa phần lập ý ở trang 41.
- + Rà soát lại lỗi chính tả, thống nhất định dạng tài liệu tham khảo.
- + Làm sao để duy trì độ ẩm của đĩa thạch môi trường khi kéo dài thời gian phân lập lên đến 30 ngày?

*** Kết luận chung:**

Luận văn đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một luận văn thạc sĩ.

6. Phản biện 2: TS. Nguyễn Xuân Vy đã thông qua bản nhận xét của về luận văn và có các ý kiến:

- Phản biện 2 đồng ý với các nhận xét, góp ý của Phản biện 1.
- Những điểm cần chỉnh sửa trong luận văn:
 - + Phần mở đầu cần trình bày ngắn gọn lại.
 - + Xem xét bổ sung phần tổng quan tình hình nghiên cứu ở Việt Nam.
 - + Phần phương pháp nghiên cứu cần làm rõ mẫu thu nhận là nước ót ở ruộng muối.

+ Phần kết quả nghiên cứu:

Extreme halophiles không in nghiêng (Trang 34).

Rà soát các thông tin khoa học ở Bảng 3.5.

Định dạng tài liệu tham khảo theo đúng quy định.

*** Kết luận chung:**

Luận văn đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một luận văn thạc sỹ.

7. Ý kiến của các thành viên Hội đồng

*** TS. Phan Quốc Thông** thông qua bản nhận xét luận văn và có các ý kiến:

- Đồng ý với ý kiến nhận xét của 2 phản biện.

- Vì sao các chủng vi sinh vật mọc trên môi trường phân lập có sự khác nhau về màu sắc khuẩn lạc sau 20 ngày và 30 ngày nuôi cấy ở 37°C?

*** TS. Phan Thị Hoài Trinh** có các ý kiến:

- Mục 1.3 nên viết đủ ý thành: Enzyme bẻ gãy mạch polysaccharide từ Haloarchaea hoặc vi khuẩn cổ chịu mặn.

- Mục 1.3.3, acid hyaluronic (HA) nên viết đầy đủ vì lần đầu trình bày.

- Mục 2.2.1.3 nên ghi cụ thể kháng sinh anisomycin.

- Mục 2.2.2.4 đến 2.2.2.7 nên tách ra thành nhóm riêng là: Phương pháp phân loại chủng vi khuẩn cổ chịu mặn tuyển chọn.

- Mục 3.1.1 cần viết cụ thể là vi khuẩn thay cho cụm từ vi sinh vật.

- Rà soát các lỗi chính tả: polysaccharide, Haloarchaea, Gram âm...

- Cần thống nhất ký hiệu chủng vi khuẩn ở Bảng 3.1 và 3.2.

- Thống nhất định dạng tài liệu tham khảo.

- Ở Bảng 2.1 (Trang 19), vì sao độ mặn và nhiệt độ giữa các khu vực thu mẫu có sự chênh lệch cao?

- Có thể bổ sung hình ảnh thử hoạt tính nhạy cảm kháng sinh anisomycin vào báo cáo không?

- Phần kết luận và kiến nghị cần trình bày ngắn gọn và súc tích.

*** PGS.TS Đào Việt Hà** có các ý kiến:

- Rà soát các lỗi chính tả, kiểm tra lại độ chuẩn xác khoa học của một số câu văn trong phần thảo luận.

- Viết lại kết luận và kiến nghị.

- Vì sao lựa chọn vi khuẩn cổ chịu mặn là đối tượng nghiên cứu?

8. Học viên trả lời:

Câu 1. Làm sao để duy trì độ ẩm của đĩa thạch môi trường khi kéo dài thời gian phân lập lên đến 30 ngày?

Trả lời: Để duy trì độ ẩm của đĩa thạch trong thời gian dài học viên đã thực hiện phương pháp sau:

- Bọc parafilm quanh nắp đĩa để hạn chế bay hơi.
- Đặt đĩa tủ ẩm và đặt trong tủ một tô nước cất vô trùng để tạo buồng ủ có độ ẩm cao, tránh quạt gió mạnh.
- Tăng nhẹ nồng độ agar (2–2,5%)
- Đặt ngửa đĩa (nắp trên) để giảm bay hơi.

Câu 2. Vì sao các chủng vi sinh vật mọc trên môi trường phân lập có sự khác nhau về màu sắc khuẩn lạc sau 20 ngày và 30 ngày nuôi cấy ở 37°C?

Trả lời: Sau 20 và 30 ngày nuôi cấy ở 37°C, màu sắc khuẩn lạc khác nhau do vi sinh vật thay đổi hoạt động trao đổi chất, tích lũy hoặc phân hủy sắc tố, mất ẩm môi trường, hoặc hình thành bào tử làm biến đổi màu theo thời gian.

Câu 3. Ở Bảng 2.1 (Trang 19), vì sao độ mặn và nhiệt độ giữa các khu vực thu mẫu có sự chênh lệch cao?

Trả lời: Độ mặn và nhiệt độ giữa các khu vực thu mẫu trong Bảng 2.1 (Trang 19) có sự chênh lệch cao do mẫu được lấy từ nước ót tại các ruộng muối Ninh Hòa, trong khoảng thời gian 10–13h trưa, khi trời nắng gắt. Tùy vào thời điểm cụ thể và mức độ bốc hơi tại từng ruộng, các thông số như độ mặn và nhiệt độ thay đổi rõ rệt.

Câu 4. Vì sao lựa chọn vi khuẩn cổ chịu mặn là đối tượng nghiên cứu?

Trả lời: Vi khuẩn cổ chịu mặn được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu vì chúng thích nghi tốt trong môi trường có độ mặn cao như nước ót ruộng muối – nơi điều kiện khắc nghiệt khiến nhiều vi sinh vật khác không tồn tại. Chúng có khả năng sinh tổng hợp các enzyme bền mặn, bền nhiệt, có tiềm năng ứng dụng cao trong công nghiệp sinh học và xử lý môi trường. Ngoài ra, vi khuẩn cổ hiện vẫn là đối tượng nghiên cứu mới ở Việt Nam, góp phần làm tăng tính mới và giá trị khoa học cho đề tài.

9. Nhận xét của thầy hướng dẫn về học viên

TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh đại diện tập thể hướng dẫn đã đọc bản nhận xét của giáo viên hướng dẫn và có những đánh giá cao về quá trình làm việc nghiêm túc của học viên.

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

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

Trưởng ban: TS. Lê Đình Hải

Ủy viên: TS. Phan Quốc Thông

Ủy viên: TS. Phan Thị Hoài Trinh

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: 05

Số phiếu thu về: 05

Tổng số điểm: 39,6

Điểm trung bình: 7,92

Điểm thưởng công trình công bố: 0,8

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: 8,72

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận văn đạt yêu cầu của luận văn thạc sĩ.

+ Nội dung và tên đề tài luận văn không trùng lặp với các công trình đã công bố.

+ Học viên cần chỉnh sửa luận văn theo nhận xét của 02 phản biện và các góp ý của Hội đồng.

+ Trình bày ngắn gọn và đảm bảo tính khoa học các phần mở đầu, thảo luận, kết luận và kiến nghị.

+ Rà soát chỉnh sửa các thuật ngữ, tên khoa học trong luận văn.

+ Thống nhất cách trích dẫn và định dạng tài liệu tham khảo theo quy định của Học viên Khoa học và Công nghệ.

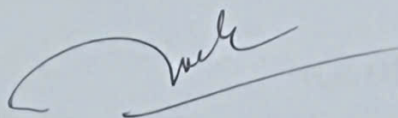
11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

Luận văn có nội dung nghiên cứu đáp ứng được yêu cầu của một luận văn thạc sĩ, học viên chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng và hoàn thiện hồ sơ gửi cơ sở đào tạo đúng hạn.

Buổi họp đã kết thúc vào 11 giờ 10 phút ngày 22/5/2025.

Nha Trang, ngày 22 tháng 5 năm 2025

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG



Phan Thị Hoài Trinh

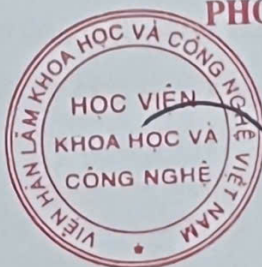
CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



Đào Việt Hà

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Lê Đình Hải Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 1

Cơ quan công tác: Phân viện Thú y miền Trung

Họ và tên học viên: Phan Thị Thùy Trang

Tên đề tài: “Phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn có tiềm năng sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide..”

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NỘI DUNG NHẬN XÉT

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

Hiện nay, nhu cầu tìm kiếm các nguồn enzyme mới có khả năng hoạt động ổn định trong điều kiện khắc nghiệt ngày càng gia tăng, nhằm đáp ứng yêu cầu phát triển của các ngành công nghiệp sinh học, thực phẩm, dược phẩm và xử lý môi trường. Trong bối cảnh đó, vi khuẩn cổ chịu mặn (*Haloarchaea*) được xem như một đối tượng tiềm năng nhờ khả năng sinh trưởng trong môi trường siêu mặn và sản xuất các enzyme đặc thù có tính bền vững cao đối với độ mặn, nhiệt độ và pH. Tuy nhiên, so với các nhóm vi sinh vật khác, nghiên cứu về *Haloarchaea* còn rất hạn chế, đặc biệt tại Việt Nam – nơi có điều kiện tự nhiên lý tưởng để phân lập các chủng vi khuẩn cổ chịu mặn có hoạt tính nhưng chưa được nghiên cứu nhiều. Chính vì vậy tác giả đặt vấn đề nghiên cứu là hết sức cấp thiết.

Hiện nay trong việc khai thác đa dạng sinh học để phục vụ công nghệ sinh học bền vững là xu hướng toàn cầu. Trong khi các nghiên cứu về vi khuẩn hiếu khí và vi nấm đã được triển khai mạnh mẽ, thì nhóm *Haloarchaea* – vốn có nhiều tiềm năng nhưng ít được chú ý – đang thu hút sự quan tâm ngày càng lớn từ giới nghiên cứu quốc tế, đặc biệt trong lĩnh vực enzyme học và công nghệ sinh học môi trường.

Đề tài có ý nghĩa khoa học đó là góp phần mở rộng hiểu biết về sự đa dạng sinh học của vi sinh vật cổ tại Việt Nam, đồng thời cung cấp dữ liệu khoa học quan trọng về khả năng sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide của các chủng *Haloarchaea* bản địa. Đây là cơ sở nền tảng để tiếp tục khai thác gene, biểu hiện tái tổ hợp enzyme và phát triển các ứng dụng công nghệ cao trong tương lai.

Về ý nghĩa thực tiễn, kết quả của đề tài không chỉ góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu về các chủng *Haloarchaea* có giá trị tại Việt Nam mà còn có thể được ứng dụng vào sản xuất enzyme phục vụ công nghiệp và y học. Đặc biệt, việc phân lập thành công các chủng vi khuẩn cổ sinh các enzyme có thể hỗ trợ cho sự phát triển của ngành dược phẩm.

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:

Xét về đối tượng, phạm vi nghiên cứu, kết quả thu được thì đề tài nghiên cứu chưa thấy có sự trùng lặp với các kết quả nghiên cứu trong nước và thế giới.

Luận văn là một phần của Nhiệm vụ Hợp tác quốc tế mã số QTIT01.01/23-24; các kết quả được trình bày rõ ràng, có nhiều hình ảnh minh họa; được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang (nay là Viện Hải Dương Học) nên đảm bảo được tính trung thực và độ chính xác cao. Các trích dẫn tài liệu được thể hiện khá đầy đủ, và cập nhật.

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, 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:

Để hoàn thành được luận án, tác giả đã sử dụng các phương pháp khác nhau gồm: phương pháp phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn, phương pháp sàng lọc vi khuẩn cổ, phương pháp đánh giá hoạt tính enzyme của các chủng đã phân lập, phương pháp tách chiết DNA, phương pháp PCR và giải trình tự gen 16sRNA để định danh vi khuẩn. Đây đều là những phương pháp thường quy được thực hiện ở các phòng thí nghiệm hiện nay. Các phương pháp này phù hợp với mục tiêu, nội dung và kết quả thu được.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Kết quả của luận văn bao gồm:

- Đã sàng lọc được 5 chủng vi khuẩn cổ trong số 27 chủng phân lập.
- Đã đánh giá tiềm năng sinh thủy phân polysaccharide của 5 chủng vi khuẩn cổ từ đó chọn được 2 chủng có hoạt tính mạnh đối với chitin, cellulose/xylan và hyaluronic acid.
- Đã khuếch đại và giải trình tự gen 16s RNA của 1 chủng vi khuẩn cổ có hoạt tính cao nhất và xác định chúng tương đồng cao với các chủng thuộc chi *Halorubrum*.

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

Phần mở đầu có thể bổ sung thêm ý nghĩa khoa học và thực tiễn, đóng góp mới của đề tài.

Trong phần phương pháp tác giả có thể bổ sung thêm thông tin phương pháp tác giả thực hiện theo tác giả nào, như nhóm phương pháp xác định tiềm năng sinh enzyme thủy phân polysaccharide từ các chủng vi khuẩn thu được, phương pháp PCR....

Trong phần phương pháp mục 2.2.2.4. xác định đặc điểm hình thái của các chủng cổ khuẩn tuyển chọn không trình bày kết quả, nên có thể lược bỏ.

Có thể xem xét đổi tên mục 2.2.1.3. thử nghiệm độ nhạy của vi sinh vật đối với kháng sinh thành sàng lọc các chủng vi khuẩn cổ nếu mục đích của thí nghiệm này là sàng lọc.

Trong phần kết quả (lỗi trình bày) trang 41, tác giả mô tả có 2 đoạn lặp lại “Quá trình khuếch đại.... phân tích giải trình tự.

Các đầu mục bổ sung thêm dấu chấm ví dụ 2.1.1..

Một số danh pháp khoa học nên in nghiêng.

Phần tài liệu tham khảo nên căn chỉnh lại, in nghiêng tên tạp chí và không viết tắt cho đúng với quy định của cơ sở đào tạo..

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?

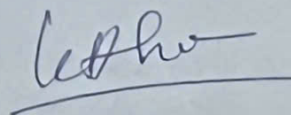
Các kết quả nghiên cứu đã được đã được chấp nhận đăng trên tạp chí Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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?):

Tôi cho rằng để hoàn thành luận văn này, học viên và giáo viên hướng dẫn đã đầu tư rất nhiều công sức. Luận văn được trình bày rất chặt chẽ, logic, rất đẹp, đúng với quy định của cơ sở đào tạo. Nội dung và hàm lượng khoa học như vậy là phù hợp với một luận văn thạc sĩ. Vì vậy, có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

Nha Trang, ngày 22. tháng 5. năm 2025

Người nhận xét



Lê Đình Hải

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Xuân Vy. Học hàm, học vị: TS

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 2

Cơ quan công tác: Viện Hải dương học

Họ và tên học viên: Phan Thị Thùy Trang

Tên đề tài: Phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn có tiềm năng sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide

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:

Việc tìm kiếm nguồn enzyme từ vi sinh vật để thủy phân polysaccharide hiện nay được quan tâm nhiều. Nghiên cứu này đã tìm kiếm khả năng sinh emzym từ đối tượng rất mới là vi khuẩn chịu mặn

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:

Đây là hướng nghiên cứu còn rất mới trên thế giới. Tại Việt Nam, có lẽ đây là lần đầu tiên nghiên cứu này phân lập được các chủng cổ chịu mặn. Các nghiên cứu trước đã được trích dẫn một cách cập nhật và đầy đủ.

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, nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành đào tạo.

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

- Quá trình thu thập mẫu, phân lập vi khuẩn, tạo dòng thuần và bảo quản được thực hiện theo các phương pháp hiện hành.
- Phương pháp thử nghiệm độ nhạy của vi sinh vật đối với kháng sinh thực hiện trong nghiên cứu này là các phương pháp đang được áp dụng.
- Phương pháp thử hoạt tính thủy phân chitin, xylan và HA cũng là phương pháp được áp dụng hiện nay.
- Chỉ thị 16S là chỉ thị thường được dùng trong việc hỗ trợ định danh vi khuẩn cũng được áp dụng trong nghiên cứu này.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Nghiên cứu này đã thực hiện thành công ba nội dung:

- a. Phân lập được 27 chủng vi khuẩn từ nước ót tại Ninh Hòa và thử nghiệm hoạt tính kháng kháng sinh của chúng, kết quả có 5 chủng nhạy cảm với kháng sinh.
 - b. Xác định được hai chủng thể hiện khả năng sinh enzyme phân giải cả Chitin, HA và CMC.
 - c. Xác định được một chủng bằng chỉ thị 16S là thành viên của chi *Halorubrum*, là một chi thuộc vi khuẩn cổ chịu mặn.
6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

Nhìn chung đề tài được viết khá tốt, ít sai sót, nội dung nghiên cứu đa dạng, logic với nhau. Tuy nhiên cần chỉnh sửa lại chút ít cho rõ ràng hơn:

- Phần mở đầu: Tương đối dài, nên hạn chế các thông tin vì trong phần tổng quan đã thể hiện. Nên thể hiện từ carboxymethyl cellulose (CMC) trong phần giới thiệu. Từ đó trở về sau chỉ sử dụng CMC mà không cần giải thích thêm.
- Phần tổng quan: Nên có phần tổng quan các nghiên cứu tương tự tại Việt Nam nếu có.
- Phần phương pháp: Mẫu thu thập cần thể hiện là nước ót.
- Phần Kết quả: Extreme halophiles không phải là tên latin nên không in nghiêng để tránh hiểu lầm (Tr 34). Đoạn đầu của trang 38 nó liên quan đến phần tổng quan, không nên đưa vào phần kết quả. Hình điện di agarose DNA tổng số không rõ ràng, nếu có hình khác thì nên thay thế. Tương tự là hình điện di 16S. Trình tự 16S nên đưa vào phụ lục. Mã số GB trong bảng 3.5 chưa phù hợp, ví dụ mã số 16S của chủng *Halorubrum luteum* CGSA15 phải là DQ987877. Khi so sánh thì nên đưa nguồn trích dẫn của chủng tham chiếu, ví dụ, nguồn trích dẫn cho chủng trên là Hu et al. 2008..... Vì vậy Bảng 3.5 nên hoàn thiện lại.
- Phần tài liệu tham khảo cần hoàn thiện thêm: ví dụ TLTK số 1 thiếu thông tin tên tác giả và nguồn, Số 5, Học viện KHCN, Hà Nội thay vì Nha Trang; in nghiêng tên la tinh

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?

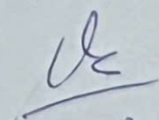
Học viên là đồng tác giả trong công trình trên Tạp chí Khoa học và Công nghệ

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?):

Luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được

Nha Trang ngày 22 tháng 5 năm 2025

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)


Nguyễn Xuân Uy

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

Họ tên học viên: Phan Thị Thùy Trang

Lớp: BIO21A

Tên đề tài luận văn: Phân lập vi khuẩn cổ chịu mặn có tiềm năng sinh enzyme chuyển hóa polysaccharide.

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8420114

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh

2. TS. Cao Thị Thúy Hằng

Ngày bảo vệ luận văn: 22/05/2025

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	Trình bày ngắn gọn và đảm bảo tính khoa học cho các phần mở đầu, thảo luận, kết luận và kiến nghị.	Đã viết lại phần kết luận và kiến nghị cho ngắn gọn, khoa học hơn; Phần mở đầu cùng nhiều nội dung thuộc phần thảo luận đã được trình bày lại (tại các trang: 1, 18, 19, 26, 33, 34, 44, 46) ngắn gọn và đảm bảo tính khoa học theo góp ý.
2	Rà soát chỉnh sửa các thuật ngữ, tên khoa học trong luận văn.	Đã rà soát chỉnh sửa các thuật ngữ, tên khoa học trong luận văn.
3	Thống nhất các trích dẫn và định dạng tài liệu tham khảo theo quy định của Học viện Khoa học và Công nghệ.	Đã thống nhất các trích dẫn và định dạng tài liệu tham khảo theo quy định.
4	Rà soát lại lỗi chính tả và các phần lặp ý.	Đã rà soát và chỉnh sửa lỗi chính tả, diễn đạt lại các phần lặp ý trong luận văn (tại các trang 34, 41).
5	Phần mở đầu cần bổ sung ý nghĩa khoa học và thực tiễn.	Đã bổ sung ý nghĩa khoa học và thực tiễn ở phần mở đầu.

6	Rà soát lại các thông tin khoa học ở Bảng 3.5 và bổ sung tài liệu tham khảo.	Đã rà soát và tiến hành chỉnh sửa lại các thông tin khoa học ở Bảng 3.5 và bổ sung tài liệu tham khảo tương ứng.
7	Thống nhất ký hiệu chủng vi khuẩn ở Bảng 3.1 và 3.2.	Đã thống nhất ký hiệu chủng vi khuẩn ở Bảng 3.1 và 3.2
8	Chỉnh sửa một số tiểu mục trong luận văn.	Đã chỉnh sửa các tiểu mục theo góp ý (tại các trang 6, 12, 14, 21, 23, 26).

Nha Trang, ngày 06 tháng 06 năm 2025

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

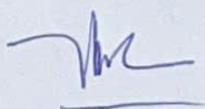


Đào Việt Hà

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN
Hướng dẫn 1 **Hướng dẫn 2**

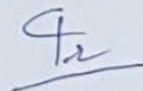


Huỳnh Hoàng Như Khánh



Cao Thị Thúy Hằng

HỌC VIÊN



Phan Thị Thùy Trang

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO