

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thanh Xuân

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI
KHUẨN ƯA NHIỆT Ở SUỐI NƯỚC NÓNG QUẢNG
NGUYÊN, HÀ GIANG CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP
POLYHYDROXYALKANOAT**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGUYỄN THỊ THANH XUÂN

NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

2026

Hà Nội - 2026

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thanh Xuân

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI KHUẨN
ƯA NHIỆT Ở SUỐI NƯỚC NÓNG QUẢNG NGUYÊN, HÀ GIANG
CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP POLYHYDROXYALKANOAT**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. TS. Đào Hải Yến
2. TS. Nguyễn Kim Thoa

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo tính trung thực và khách quan. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất kỳ nghiên cứu nào. 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



Nguyễn Thị Thanh Xuân

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Nguyễn Kim Thoa, Phòng các chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Cô không chỉ là người hướng dẫn tận tình mà còn là người đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành đề tài luận văn này. Nhờ những định hướng và góp ý quý báu của cô, tôi đã có những bước tiến quan trọng trong nghiên cứu.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến TS. Đào Hải Yến, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Nhờ sự hướng dẫn tận tâm và những chia sẻ kinh nghiệm quý báu của cô, tôi đã hoàn thành luận văn.

Khóa luận này được thực hiện nhờ kinh phí của hợp phần đề án “Nghiên cứu thu nhận và tinh chế nhựa sinh học PHA dạng PHV hoặc copolymer từ các chủng vi khuẩn phân lập ở Việt Nam” (Mã số: TĐNSH0.07/22-24).

Tôi xin trân trọng cảm ơn các thầy cô giáo Khoa Sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ đã luôn quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu. Đồng thời, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ đã luôn quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình và bạn bè, những người luôn đồng hành, động viên tôi trong suốt thời gian qua.

Hà Nội, ngày 23 tháng 6 năm 2026

Học viên cao học



Nguyễn Thị Thanh Xuân

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tổng quan về polyhydroxyalkanoat (PHA).....	3
1.1.1. Khái niệm về nhựa sinh học PHA.....	3
1.1.2. Phân loại nhựa sinh học PHA	4
1.1.3. Đặc tính hóa lý của một số loại PHA	5
1.1.4. Ứng dụng của nhựa sinh học PHA.....	7
1.2. Các vi sinh vật ưa nhiệt có khả năng tổng hợp PHA và các loại PHA thu nhận được.....	9
1.2.1. Các vi sinh vật ưa nhiệt có khả năng sinh tổng hợp PHA.....	9
1.2.2. Con đường sinh tổng hợp PHA	11
1.3. Tình hình nghiên cứu.....	13
1.3.1. Trên thế giới	13
1.3.2. Việt Nam	14
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	16
2.1. Vật liệu	16
2.2. Dụng cụ, thiết bị máy móc, hóa chất	16
2.2.1. Dụng cụ.....	16
2.2.2. Thiết bị máy móc	16
2.2.3. Hóa chất.....	17
2.2.4. Môi trường nuôi cấy.....	17
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	17
2.3.1. Phương pháp lấy mẫu nước và bùn ở suối nước nóng.....	17
2.3.2. Phương pháp phân lập vi sinh vật ưa nhiệt.....	18
2.3.3. Đánh giá sơ bộ khả năng tích lũy PHA nội bào của các chủng vi khuẩn phân lập.....	18
2.3.4. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn	19
2.3.5. Lên men sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.....	21
2.3.6. Ảnh hưởng của các yếu tố lên men sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn	21
2.3.7. Xác định sinh khối khô tế bào	23
2.3.8. Tách chiết PHA	23
2.3.9. Xác định thành phần monomer của PHA	23
2.3.9. Phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)	23
2.3.10. Phân tích kết quả.....	24

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	25
3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn hiếu khí ở suối nước nóng Quảng Nguyên	25
3.2 Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng tích lũy PHA	28
3.3 Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn	31
3.4. Đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn	37
3.5. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6	38
3.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ	39
3.5.2. Ảnh hưởng của pH ban đầu	41
3.5.3 Ảnh hưởng của nguồn carbon	43
3.5.4 Ảnh hưởng của nguồn nitơ	46
3.5.5 Ảnh hưởng của tỷ lệ C:N	49
3.6 Phân tích thành phần của PHA thu nhận từ chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6	50
KẾT LUẬN	53
KIẾN NGHỊ	54
TÀI LIỆU THAM KHẢO	55

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
PHA	Polyhydroxyalkanoat	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Polyhydroxybutyrate	Polyhydroxybutyrate
scl	short chain length	Chuỗi ngắn
mcl	medium chain length	Chuỗi trung bình
lcl	long chain length	Chuỗi dài
PVC	Polyvinyl chloride	Polyvinyl chloride

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Mật độ vi khuẩn hiếu khí trong các mẫu nước và bùn suối nước nóng Quảng Nguyên.	25
Bảng 3.2. Số lượng và ký hiệu các chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu nước và bùn suối nước nóng Quảng Nguyên.	27
Bảng 3.3. Khả năng bắt màu Sudan Black B của các chủng vi khuẩn phân lập.	29
Bảng 3.4. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của ba chủng HG2.3, HG5.2 và HG5.6.	31
Bảng 3.5. Sinh khối khô và hàm lượng PHA thu nhận được sau quá trình lên men 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn.	37
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	40
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	42
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến hàm lượng PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	44
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hàm lượng PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	47
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của tỷ lệ C/N đến hàm lượng PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	49

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 1.1. Cấu trúc nhựa sinh học PHA.....	4
Hình 1.2. Cấu trúc của polyhydroxybutyrate (PHB).	6
Hình 1.3. Cấu trúc của P(3HB-co-3HV).....	7
Hình 1.4. Ứng dụng của PHA trong đời sống.....	9
Hình 3.1. Khuẩn lạc thu được từ các mẫu nước và bùn tại các vị trí khảo sát suối nước nóng Quảng Nguyên.....	28
Hình 3.2. Nhuộm Sudan Black B, Nile Blue A và ảnh TEM của các chủng HG2.3, HG5.2 và HG5.6.....	30
Hình 3.3. Sản phẩm khuếch đại gene 16S rRNA của 3 chủng vi khuẩn HG2.3, HG5.2 và HG5.6. M: 1 kb ladder (Thermo Scientific).	35
Hình 3.4. So sánh mức độ tương đồng gene 16S rRNA của chủng HG2.3 với các chủng trên Ngân hàng Gene NCBI.....	35
Hình 3.5. So sánh mức độ tương đồng gene 16S rRNA của chủng HG5.2 với các chủng trên Ngân hàng Gene NCBI.....	36
Hình 3.6. So sánh mức độ tương đồng gene 16S rRNA của chủng HG5.6 với các chủng trên Ngân hàng Gene NCBI.....	36
Hình 3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	39
Hình 3.8. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	42
Hình 3.9. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	44
Hình 3.10. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	47
Hình 3.11. Ảnh hưởng của tỷ lệ C/N đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	49
Hình 3.12. Sắc ký đồ GC–MS/MS của PHB chuẩn (Sigma Aldrich) (phía trên) và PHA thu nhận từ chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6 sau quá trình methanolysis.	51
Hình 3.13. Phổ FTIR của PHA thu nhận từ chủng <i>Geobacillus</i> sp. HG5.6.	51

MỞ ĐẦU

Ngày nay, ô nhiễm nhựa đang trở thành một trong những thách thức môi trường lớn nhất của con người, với hơn 400 triệu tấn nhựa được sản xuất hàng năm, phần lớn kết thúc ở đại dương và đất liền. Những mảnh nhựa vi mô xâm nhập vào chuỗi thức ăn, gây hại cho động vật hoang dã, cá voi và chim biển nuốt phải túi ni lông, dẫn đến cái chết hàng loạt. Nhựa phân hủy chậm, tồn tại hàng trăm năm và tích lũy trong cơ thể sinh vật biển. Nếu con người không có những hành động kịp thời để giảm thiểu rác thải nhựa dùng một lần và tái chế nhựa, ô nhiễm nhựa sẽ đe dọa hệ sinh thái toàn cầu.

Polyhydroxyalkanoat (PHA) là một nhóm polymer sinh học phân hủy hoàn toàn, được sản xuất bởi nhiều vi khuẩn như *Cupriavidus necator* thông qua quá trình lên men đường hoặc lipid. PHA có tính chất tương tự nhựa tổng hợp với độ bền cơ học cao, tính dẻo và khả năng chống nước, nhưng phân hủy hoàn toàn trong môi trường tự nhiên chỉ trong vài tháng mà không gây độc. Ứng dụng phổ biến của PHA là làm bao bì thực phẩm, vật liệu y tế (chỉ khâu tự tiêu, màng bọc nông nghiệp)... giúp giảm thiểu ô nhiễm toàn cầu [1,2].

Polyhydroxyalkanoat (PHA) nổi bật với các đặc tính vượt trội như độ bền cơ học cao (mô đun đàn hồi 2.5-3 GPa, cường độ kéo 35-40 MPa), có tính đàn hồi linh hoạt, khả năng chống thấm khí và hơi nước tốt (khoảng 560 g $\mu\text{m}^2/\text{ngày}$), cùng nhiệt độ nóng chảy cao tương đương với nhựa hóa học. Chúng hoàn toàn phân hủy sinh học trong môi trường tự nhiên mà không để lại độc tố, biocompatible và có tính piezo điện, ứng dụng làm vật liệu y tế, bao bì thực phẩm và nông nghiệp. So với nhựa truyền thống, PHA thân thiện với môi trường hơn nhờ nguồn gốc sinh học và khả năng điều chỉnh tính chất qua thành phần monomer đa dạng [3].

Nhiều loài vi khuẩn tổng hợp PHA như chất dự trữ carbon và năng lượng, nổi bật là *Cupriavidus necator* với năng suất cao, cùng *Bacillus spp.* (như *Bacillus australimaris*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*), *Pseudomonas aeruginosa* và *Alcaligenes sp.*, các loài ưa mặn như *Halomonas alkaliantarctica*, *Halomonas sp. TD01*, *Haloferax mediterranei*,... Những vi khuẩn này phát triển tốt trong điều kiện dư thừa carbon nhưng hạn chế ni-tơ, cho phép sản xuất công nghiệp hiệu quả từ nguyên liệu thải [4,5,6,7].

Việt Nam, nằm trên vành đai địa chất năng động, sở hữu tiềm năng địa nhiệt đáng kể với hệ thống suối nước nóng và các hệ sinh thái địa nhiệt đặc trưng, phân

bộ rộng khắp từ Bắc vào Nam và tập trung dọc theo các đứt gãy địa chất [8]. Các nguồn nước nóng này hình thành khi nước ngầm thấm sâu vào lòng đất, được làm nóng bởi nhiệt độ địa nhiệt rồi trôi lên bề mặt qua các khe nứt. Nhiệt độ nước ở các suối đa dạng, từ ấm (30-40°C), nóng vừa (41-60°C), đến rất nóng (61-100°C), thậm chí có những nguồn đạt trên 100°C [8]. Miền Bắc nổi bật với các suối như Kim Bôi (Hòa Bình), Mỹ Lâm (Tuyên Quang)..., trong khi đó, miền Trung có Sơn Kim (Hà Tĩnh), Thanh Tân (Thừa Thiên Huế)..., và miền Nam có Bình Châu (Bà Rịa – Vũng Tàu), Đam Rông (Lâm Đồng). Suối nước nóng Quảng Nguyên, hay còn gọi là suối khoáng nóng Nậm Choong, là một điểm đến thiên nhiên độc đáo tại xã Quảng Nguyên, huyện Xín Mần, tỉnh Hà Giang. Vi khuẩn và vi khuẩn cổ ưa nhiệt (thermophiles) và ưa siêu nhiệt (hyperthermophiles) chiếm ưu thế, sở hữu các enzyme bền nhiệt (thermozymes) giúp chúng duy trì hoạt động trao đổi chất. Bên cạnh đó, các vi sinh vật ưa axit, ưa kiềm hoặc ưa kim loại nặng cũng thường được tìm thấy.

Dựa vào điều kiện lên men giúp tránh sự tạp nhiễm của các vi khuẩn ưa ấm và điều kiện phù hợp của suối nước nóng Quảng Nguyên cho vi khuẩn ưa nhiệt sinh tổng hợp PHA và các công bố về vi sinh vật ưa nhiệt sinh tổng hợp nhựa sinh học ở Việt Nam còn hạn chế, đề tài “*Nghiên cứu phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn ưa nhiệt ở suối nước nóng Quảng Nguyên, Hà Giang có khả năng sinh tổng hợp polyhydroxyalkanoat*” được thực hiện để tìm và thu nhận được các chủng vi khuẩn ưa nhiệt ở suối nước nóng Quảng Nguyên, Hà Giang có khả năng tích lũy nhựa sinh học PHA. Từ đó, có thể thu nhận nhựa PHA từ các chủng vi khuẩn ưa nhiệt đã được tuyển chọn. PHA thu nhận được là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo ứng dụng nhựa sinh học PHA vào đời sống con người.

Mục tiêu nghiên cứu của luận văn là:

- Thu nhận được các chủng vi khuẩn ưa nhiệt ở suối nước nóng Quảng Nguyên, Hà Giang có khả năng tích lũy nhựa PHA.
- Xác định điều kiện lên men để thu nhận PHA từ các chủng vi khuẩn ưa nhiệt đã tuyển chọn và đánh giá các đặc tính cơ lý của PHA thu được.

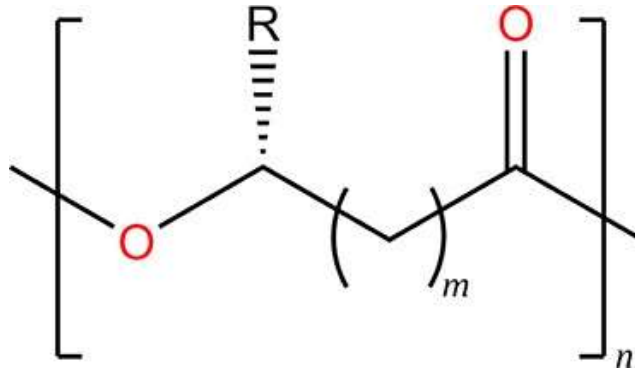
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về polyhydroxyalkanoat (PHA)

1.1.1. Khái niệm về nhựa sinh học PHA

Polyhydroxyalkanoat (PHA) là họ polyester sinh học được sản xuất tự nhiên bởi nhiều loài vi khuẩn dưới dạng hạt ngưng tụ nội bào (carbonosomes), đóng vai trò như chất dự trữ carbon và năng lượng trong điều kiện dư thừa carbon nhưng hạn chế nitơ, photpho hoặc oxy [9]. Được phát hiện lần đầu vào năm 1926 bởi Maurice Lemoigne, PHA bao gồm hơn 150 monomer hydroxyalkanoic khác nhau (từ C3-C14), tạo nên một phổ tính chất đa dạng, từ loại cứng giòn như polystyrene đến loại đàn hồi như cao su (P(3HB-co-3HHx)), tùy thuộc vào tỷ lệ đồng trùng hợp và điều kiện nuôi cấy [10]. Không giống acid polylactic cần ủ phân hữu cơ công nghiệp, PHA phân hủy sinh học trong môi trường tự nhiên (đất, nước ngọt, nước mặn, bùn hoạt tính) bởi nhiều loài vi sinh vật, chuyển hóa hoàn toàn thành CO₂, H₂O và sinh khối mà không tạo microplastic hay độc tố [11]. Với tính tương thích sinh học cao, PHA được FDA phê duyệt cho các ứng dụng y tế như sản xuất chỉ khâu tự tiêu, viên nén phóng thích thuốc và vật liệu cấy ghép, đồng thời là giải pháp thay thế bền vững cho các thành phần nhựa hóa học trong bao bì thực phẩm, túi ni lông, khay nông nghiệp và sản phẩm dùng một lần [12].

Bên cạnh những ưu điểm về môi trường, PHA còn nhận được sự quan tâm đặc biệt do có nguồn gốc hoàn toàn từ các quá trình sinh học. Nhiều chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp PHA từ các nguồn cơ chất tái tạo như đường, tinh bột, dầu thực vật, glycerol thô hoặc các phụ phẩm nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm. Điều này tạo ra cơ hội xây dựng các quy trình sản xuất vật liệu theo hướng kinh tế tuần hoàn, vừa tận dụng nguồn chất thải hữu cơ vừa giảm sự phụ thuộc vào tài nguyên hóa thạch. Trong bối cảnh ô nhiễm nhựa đang trở thành vấn đề môi trường toàn cầu, PHA được đánh giá là một trong những vật liệu sinh học có triển vọng phát triển mạnh mẽ trong tương lai nhờ khả năng cân bằng giữa hiệu năng sử dụng và tính bền vững môi trường.



Hình 1.1. Cấu trúc nhựa sinh học PHA [13].

1.1.2. Phân loại nhựa sinh học PHA

Nhựa sinh học PHA được phân loại chủ yếu dựa trên độ dài chuỗi carbon của các monomer hydroxyalkanoic (R-3-hydroxyalkanoates) tạo nên các nhóm có tính chất vật lý khác biệt rõ rệt. Nhóm ngắn chuỗi (scl-PHA, C3-C5) bao gồm polyhydroxybutyrate (PHB - C4, cứng giòn như polystyrene, T_m 175°C, độ kết tinh cao > 60%) và polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV - C3-C5, cải thiện độ dẻo bằng 5% HV) [14]. Nhóm chuỗi trung bình (mcl-PHA, C6-C14) như P(3HO/3HHx/3HA) có tính đàn hồi cao (độ kéo dài > 400%), điểm nóng chảy thấp (40-60°C), phù hợp để làm elastomer và màng mỏng. Nhóm chuỗi dài (lcl-PHA, >C14) hiếm gặp hơn, có độ nhớt cao và tính chất giống sáp, nên ít được ứng dụng trong công nghiệp. Ngoài ra, PHA còn được phân loại theo cấu trúc bên (R group): thẳng, phân nhánh, không bão hòa hoặc halogen thay thế, với hơn 150 monomer đã biết, cho phép điều chỉnh tính chất từ nhiệt dẻo đến cao su thông qua quá trình đồng trùng hợp [15].

Ngoài phân loại theo độ dài chuỗi carbon, sự khác biệt về tỷ lệ đồng trùng hợp giữa các monomer cũng đóng vai trò quan trọng trong việc xác định tính chất cuối cùng của vật liệu PHA. Chỉ cần thay đổi tỷ lệ giữa các đơn vị monomer như 3-hydroxybutyrate (3HB) và 3-hydroxyvalerate (3HV), hoặc bổ sung các monomer chuỗi dài hơn, vật liệu thu được có thể chuyển đổi từ trạng thái giòn, cứng sang mềm dẻo và đàn hồi hơn đáng kể. Điều này cho thấy PHA không phải là một polymer đơn lẻ mà là một họ vật liệu có khả năng “thiết kế phân tử” linh hoạt thông qua kiểm soát sinh học trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật.

Bên cạnh yếu tố cấu trúc monomer, điều kiện nuôi cấy vi sinh vật cũng ảnh hưởng trực tiếp đến sự phân loại và tính chất của PHA thu được. Các yếu tố như nguồn carbon, tỷ lệ C/N, nhiệt độ và mức độ oxy hòa tan có thể làm thay đổi đáng

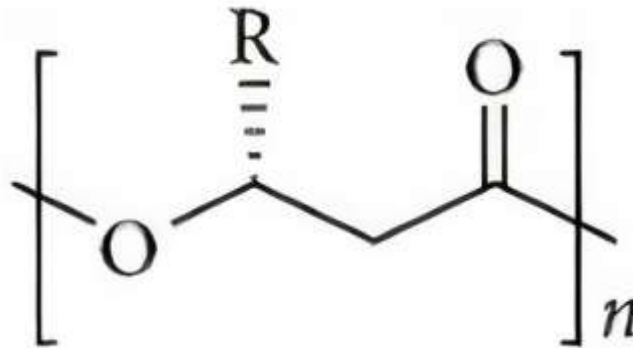
kể thành phần monomer tích lũy trong tế bào. Trong điều kiện thiếu dinh dưỡng nhưng dư thừa nguồn carbon, vi sinh vật thường ưu tiên tích lũy PHA như một cơ chế sinh tồn, đồng thời có thể điều chỉnh loại monomer được tổng hợp tùy theo cơ chất cung cấp. Điều này dẫn đến sự đa dạng lớn trong cấu trúc PHA ngay cả khi sử dụng cùng một chủng vi sinh vật.

Sự đa dạng trong cấu trúc của PHA cũng tạo ra sự khác biệt rõ rệt về tính chất nhiệt và cơ học giữa các nhóm polymer. PHA mạch ngắn thường có độ kết tinh cao, dẫn đến tính giòn và độ cứng lớn, trong khi PHA mạch trung bình có độ kết tinh thấp hơn nhưng lại thể hiện tính đàn hồi vượt trội. Ngược lại, các PHA mạch dài có cấu trúc ít trật tự hơn, làm giảm nhiệt độ chuyển pha và tăng tính mềm dẻo nhưng đồng thời hạn chế khả năng ứng dụng do độ ổn định cơ học thấp. Sự tương quan giữa cấu trúc và tính chất này là cơ sở quan trọng để lựa chọn loại PHA phù hợp cho từng ứng dụng cụ thể trong thực tế.

1.1.3. Đặc tính hóa lý của một số loại PHA

Các loại PHA khác nhau thể hiện sự đa dạng rõ rệt về đặc tính hóa lý, phụ thuộc chủ yếu vào thành phần monomer và mức độ kết tinh của polymer.

Polyhydroxybutyrate (PHB) thuộc nhóm PHA mạch ngắn (scl-PHA), có điểm nóng chảy cao khoảng 175°C, độ kết tinh 60-80%, mô đun Young 3.5-4 GPa, độ bền kéo 40 MPa nhưng giòn, với độ giãn dài chỉ 3-8%, hệ số thấm O₂ thấp (7.9×10^{-13} cm³ cm/cm² s Pa) và Tg khoảng 2-5°C [16]. Polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) cải thiện đáng kể: Tm giảm xuống 120-160°C (tùy tỉ lệ của monomer 3HV 5-20%), độ giãn dài tăng 50-200%, độ bền va đập cao hơn PHB, hệ số thấm nước hơi thấp hơn (≈ 3 g mm/m² ngày), phù hợp với gia công đùn ép. Nhóm PHA mạch trung bình (mcl-PHA) như P(3HO/3HHx) thể hiện tính đàn hồi cao với độ giãn dài > 400%, Tm 40 - 60°C, mô đun đàn hồi thấp 5 - 20 MPa, độ bền kéo 10-20 MPa, hệ số thấm khí cao hơn (O₂: 1.5×10^{-11} cm³ cm/cm² s Pa) và tính chất elastomer lý tưởng cho màng co giãn [17].



Hình 1.2. Cấu trúc của polyhydroxybutyrate (PHB) [18].

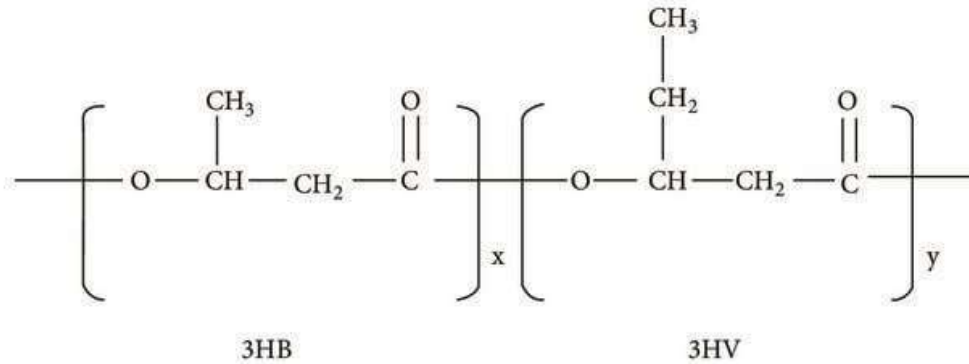
Polyhydroxybutyrate (PHB) có điểm nóng chảy cao 175°C , T_g $2-5^{\circ}\text{C}$, độ kết tinh 60-80%, mô đun Young 3.5-4 GPa, độ bền kéo 40 MPa nhưng giòn (độ giãn dài 3-8%), hệ số thấm O_2 thấp $7.9 \times 10^{-13} \text{ cm}^3 \text{ cm/cm}^2 \text{ s Pa}$, chống UV tốt, tan trong chloroform. P(3HB-co-3HV) cải thiện đáng kể với T_m giảm $120-160^{\circ}\text{C}$ (tùy 3-20% 3HV), độ giãn dài tăng 50-200%, độ bền va đập cao hơn, hệ số thấm hơi nước $\approx 3 \text{ g mm/m}^2 \text{ ngày}$, độ kết tinh giảm 38-55%, phù hợp đùn ép và ứng dụng trong sản xuất bao bì [18]. PHA terpolymer như P(3HB-co-3HV-co-4HV) có độ kết tinh thấp hơn (38-49%), M_n 45-87 kDa, M_w 201-248 kDa, độ xốp bề mặt cao, độ nhám tăng theo tỷ lệ 4HV, tính đàn hồi tốt hơn PHB và tốc độ phân hủy sinh học nhanh hơn trong môi trường sống [19].

Polyhydroxybutyrate (PHB) là loại PHA đơn giản nhất với cấu trúc $[-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-]_n$, có điểm nóng chảy cao $170-180^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ thủy tinh hóa T_g $0-5^{\circ}\text{C}$, độ kết tinh cao 60-80%, mô đun đàn hồi 3.5-4 GPa, độ bền kéo 28-45 MPa nhưng giòn với độ giãn dài chỉ 3-8% [20]. PHB có hệ số thấm oxy thấp ($7.9 \times 10^{-13} \text{ cm}^3 \text{ cm/cm}^2 \text{ s Pa}$), chống tia UV tốt, ổn định nhiệt độ lên đến 200°C , tan trong chloroform và dichloromethane, trọng lượng phân tử trung bình M_w 200-1000 kDa. Tính chất này làm PHB phù hợp cho vật liệu cứng nhưng hạn chế bởi độ giòn và khó gia công [20].

Khác với PHB, polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) thể hiện sự cải thiện đáng kể về tính chất cơ học nhờ sự xuất hiện của đơn vị 3-hydroxyvalerate trong chuỗi polymer. Sự đồng trùng hợp này làm giảm độ kết tinh của vật liệu, từ đó tăng độ dẻo và khả năng chịu va đập so với PHB thuần. PHBV cũng có nhiệt độ nóng chảy thấp hơn và khả năng gia công tốt hơn, giúp mở rộng phạm vi ứng dụng trong bao bì thực phẩm và vật liệu dùng một lần.

P(3HB-co-3HV) có cấu trúc đồng trùng hợp 3-hydroxybutyrate (3HB) và 3-

hydroxyvalerate (3HV), với Tm giảm theo tỷ lệ 3HV: 175°C (0% HV) → 100°C (20% HV), độ giãn dài cải thiện đáng kể 50-200% (so với 3-8% của PHB), độ kết tinh giảm 38-55%. Độ bền va đập tăng, hệ số thấm hơi nước thấp ≈ 3 g mm/m² ngày, mô đun đàn hồi 1-2 GPa, phù hợp đùn ép và ép phun. Tỷ lệ 3HV 5-15% tối ưu cho bao bì thực phẩm và màng nông nghiệp nhờ cân bằng độ cứng, dẻo [19].



Hình 1.3. Cấu trúc của P(3HB-co-3HV) [20].

PHA Terpolymer như P(3HB-co-3HV-co-4HV) có độ kết tinh thấp hơn (38-49%), trọng lượng phân tử Mn 45-87 kDa, Mw 201-248 kDa, độ nhám bề mặt tăng theo tỷ lệ 4HV, tạo độ xốp cao và tính đàn hồi vượt trội so với PHB/PHBV. Tốc độ phân hủy sinh học nhanh hơn nhờ cấu trúc không đều, hệ số thấm khí cao hơn (O₂ permeability tăng), điểm nóng chảy phụ thuộc thành phần nhưng thường 110-140°C. Terpolymer lý tưởng cho ứng dụng y tế để sản xuất màng cấy ghép và bao bì cần độ dẻo cao [21].

Ngoài các tính chất cơ học, đặc tính nhiệt và khả năng xử lý của các loại PHA cũng có sự khác biệt đáng kể. PHB có nhiệt độ nóng chảy tương đối cao nhưng khoảng chênh lệch giữa nhiệt độ nóng chảy và nhiệt độ phân hủy lại nhỏ, gây khó khăn trong quá trình gia công nhiệt. Trong khi đó, PHBV và mcl-PHA có khoảng nhiệt độ gia công rộng hơn, giúp quá trình ép phun, đùn hoặc tạo màng trở nên thuận lợi hơn. Sự khác biệt này là yếu tố quan trọng khi lựa chọn loại PHA phù hợp cho từng ứng dụng công nghiệp cụ thể.

1.1.4. Ứng dụng của nhựa sinh học PHA

Nhờ sự kết hợp giữa tính phân hủy sinh học, khả năng tương thích sinh học và nguồn gốc tái tạo, PHA được xem là một trong những nhóm vật liệu polymer sinh học có phạm vi ứng dụng đa dạng nhất hiện nay. Không chỉ thay thế các loại nhựa

có nguồn gốc dầu mỏ trong những sản phẩm sử dụng ngắn hạn, PHA còn được nghiên cứu và phát triển cho nhiều ứng dụng có giá trị gia tăng cao trong y học, nông nghiệp, bao bì thực phẩm và công nghiệp kỹ thuật. Khả năng điều chỉnh tính chất cơ học thông qua thay đổi thành phần monomer cho phép tạo ra các loại PHA có độ cứng, độ dẻo và tốc độ phân hủy khác nhau, đáp ứng yêu cầu của nhiều lĩnh vực ứng dụng chuyên biệt.

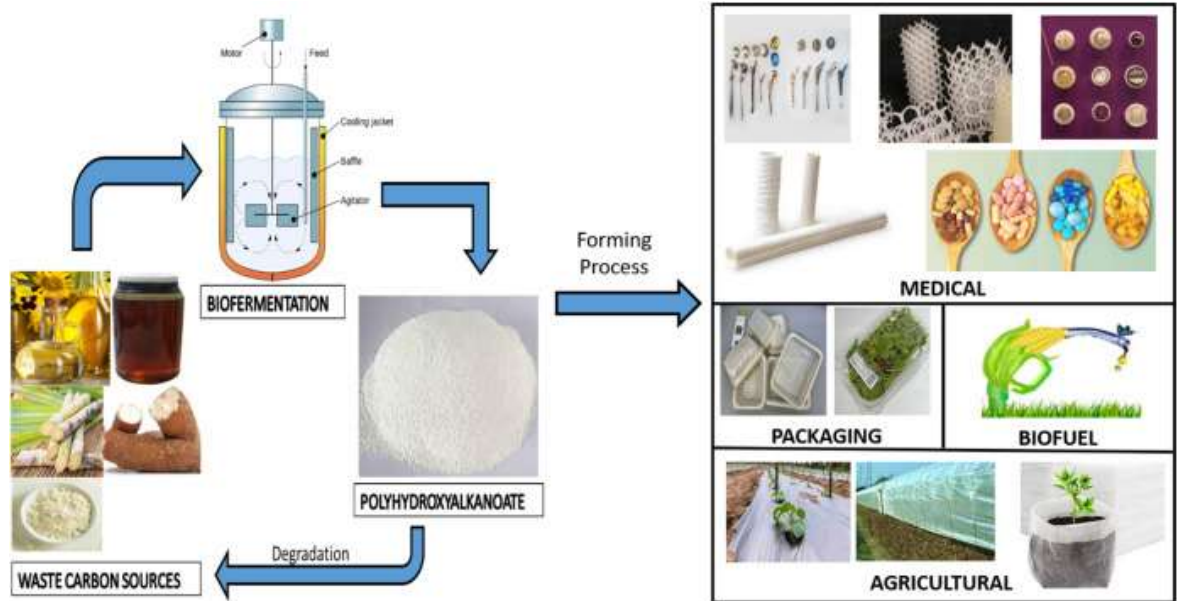
PHA được ứng dụng rộng rãi trong y tế nhờ tính tương thích sinh học vượt trội và khả năng phân hủy hoàn toàn trong cơ thể. Chúng tạo thành chỉ khâu tự tiêu (surgical sutures), hệ thống phóng thích thuốc kiểm soát (controlled drug delivery) như viên nén sinh học và hạt nano mang thuốc ung thư. Màng cấy ghép xương/khớp, giá đỡ mô (tissue engineering scaffolds) từ P(3HB-co-3HHx) hỗ trợ tái tạo sụn, dây chằng nhờ tính đàn hồi và độ xốp lý tưởng. Vật liệu chỉnh hình như đĩa nẹp xương, stent mạch máu phân hủy sau 6-12 tháng cũng được FDA phê duyệt [22].

Một trong những ưu điểm nổi bật giúp PHA được quan tâm trong lĩnh vực vật liệu sinh học là khả năng phân hủy thành các sản phẩm không gây độc cho môi trường và cơ thể sống. So với nhiều polymer truyền thống, PHA có thể được xử lý sau sử dụng thông qua các quá trình sinh học tự nhiên mà không tạo ra lượng lớn chất thải tồn lưu lâu dài. Đặc điểm này không những làm tăng giá trị ứng dụng của vật liệu mà còn phù hợp với xu hướng phát triển các sản phẩm thân thiện với môi trường và nền kinh tế tuần hoàn đang được thúc đẩy trên phạm vi toàn cầu.

Trong bao bì, PHA thay thế nhựa PE/PP truyền thống nhờ khả năng chống thấm khí O₂ (barrier properties) tương đương PET nhưng phân hủy sinh học 100%. Màng bọc thịt cá tươi, khay đựng thực phẩm, túi mua sắm siêu thị từ PHBV có độ trong suốt cao, chống dầu mỡ và hơi nước hiệu quả. Túi rác hữu cơ, cốc/chén dùng một lần phân hủy hoàn toàn trong bãi chôn lấp công nghiệp hoặc môi trường biển trong 3 - 6 tháng, giảm lượng vi nhựa đáng kể [23].

Nông nghiệp sử dụng PHA làm màng phủ đất (mulch films) phân hủy tự nhiên sau vụ mùa, loại bỏ nhu cầu thu gom thủ công. Lưới đánh cá, dây buộc cây trồng, khay gieo hạt từ mcl-PHA chịu nước mặn và phân hủy trong đại dương sau 1-2 năm. Ống tưới nhỏ giọt sinh học giảm tắc nghẽn và ô nhiễm đất, thay thế PVC truyền thống ở các nước nhiệt đới [24]. PHA làm lớp phủ giấy chống dầu mỡ cho hộp thức ăn nhanh, chất kết dính sinh học trong gỗ ép, sợi dệt may (PHA fibers) kháng khuẩn tự nhiên. Làm phụ gia tương thích cho nhựa composite PLA/PBS, cải

thiện độ dai va đập. Trong điện tử, màng cách điện sinh học và vỏ pin phân hủy đang được nghiên cứu thương mại hóa [24].



Hình 1.4. Ứng dụng của PHA trong đời sống [24].

Bên cạnh các ứng dụng thương mại đã được triển khai, nhiều hướng nghiên cứu mới về PHA vẫn đang tiếp tục được phát triển nhằm mở rộng phạm vi sử dụng của vật liệu này. Các nghiên cứu tập trung vào việc cải thiện tính chất cơ học, giảm giá thành sản xuất và kết hợp PHA với các vật liệu sinh học khác để tạo ra các hệ vật liệu đa chức năng. Sự phát triển của công nghệ lên men vi sinh vật và các quy trình thu hồi polymer hiệu quả hơn được kỳ vọng sẽ thúc đẩy quá trình thương mại hóa PHA ở quy mô lớn, góp phần thay thế dần các loại nhựa hóa dầu trong nhiều lĩnh vực sản xuất và tiêu dùng.

1.2. Các vi sinh vật ưa nhiệt có khả năng tổng hợp PHA và các loại PHA thu nhận được

1.2.1. Các vi sinh vật ưa nhiệt có khả năng sinh tổng hợp PHA

Vi sinh vật ưa nhiệt là nhóm sinh vật có khả năng sinh trưởng và phát triển tối ưu ở nhiệt độ cao, thường trong khoảng từ 45–80°C. Sự thích nghi với điều kiện nhiệt độ khắc nghiệt giúp các vi sinh vật này sở hữu hệ enzyme bền nhiệt cùng các cơ chế bảo vệ tế bào đặc biệt, cho phép duy trì hoạt động trao đổi chất trong môi trường mà nhiều vi sinh vật thông thường không thể tồn tại. Trong những năm gần đây, các chủng vi sinh vật ưa nhiệt đã thu hút sự quan tâm đáng kể trong lĩnh vực công nghệ sinh học do tiềm năng ứng dụng trong sản xuất enzyme công nghiệp, nhiên liệu sinh học và đặc biệt là sinh tổng hợp PHA.

Vi sinh vật ưa nhiệt là những loài có khả năng sinh trưởng và hoạt động ở nhiệt độ cao (thường từ 40 – 60 °C hoặc hơn) và một số chủng trong số chúng có thể sinh tổng hợp polyhydroxyalkanoat (PHA) [25]. Vi sinh vật ưa nhiệt sản xuất PHA thường thuộc các chi *Pseudomonas* hoặc *Bacillus*, có khả năng tích lũy PHA dưới dạng hạt dự trữ carbon khi môi trường dư thừa nguồn C nhưng hạn chế N, P hoặc S. Đây là những vi sinh vật chịu nhiệt tốt, giúp quá trình lên men không bị lấn tạp các vi sinh vật khác. Ví dụ, chủng *Pseudomonas* sp. SG4502 có thể sản xuất PHA mạch trung bình (mcl-PHA) từ phụ phẩm biodiesel ở 45 – 55 °C [26].

Trong lĩnh vực vật liệu bền vững, việc ứng dụng vi khuẩn ưa nhiệt trong sản xuất nhựa sinh học được xem là một bước đột phá quan trọng nhờ khả năng chuyển hóa hiệu quả các nguồn nguyên liệu tái tạo thành PHA có giá trị [21, 22]. Các vi sinh vật ưa nhiệt có thể sử dụng đa dạng nguồn carbon, bao gồm cả sinh khối lignocellulose, để tổng hợp nhựa sinh học với hiệu suất cao. Nhiều nghiên cứu cho thấy chúng có thể đạt hàm lượng PHA lên tới 75% sinh khối tế bào trong điều kiện tối ưu, trong đó glucose thường được sử dụng như nguồn carbon chủ yếu do khả năng chuyển hóa mạnh thành PHB - dạng PHA phổ biến nhất [25]. Những nghiên cứu tiên phong trong công nghệ sinh học vi sinh vật ưa nhiệt đã ghi nhận nhiều tiến bộ đáng kể trong quá trình tổng hợp PHA, qua đó khẳng định tiềm năng của nhóm vi khuẩn này. Chẳng hạn, các chủng *Cupriavidus cauae* PHS1 và *Geobacillus stearothermophilus* đã chứng minh khả năng sản xuất PHA từ nhiều loại cơ chất khác nhau ở nhiệt độ cao, giúp giảm nguy cơ nhiễm tạp và nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp. Đặc biệt, *C. cauae* PHS1 được xem là một lựa chọn thay thế tiềm năng cho các vi khuẩn sinh PHA ưa ấm nhờ khả năng tổng hợp polyhydroxybutyrate hiệu quả từ acetate và phenol ở 45 °C khi sử dụng gluconate làm cơ chất. Bên cạnh đó, chủng *G. stearothermophilus* K4E3_SPR_NPP đã được ứng dụng thành công trong sản xuất PHA từ nước thải ngành công nghiệp sữa, cho thấy khả năng tận dụng các nguồn cơ chất giá rẻ [25]. Tương tự, *Aneurinibacillus* sp. H1 có khả năng chuyển hóa glycerol thành poly(3-hydroxybutyrate) cùng các copolymer chứa tỷ lệ mol đáng kể của 3-hydroxyvalerate và 4-hydroxybutyrate trong điều kiện tối ưu ở 45 °C [23, 24]. Ngoài ra, *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 - một vi khuẩn ưa nhiệt mức độ trung bình - sở hữu hệ gen thể hiện tính đa dạng chuyển hóa cao, cho phép sử dụng nhiều loại cơ chất như lignocellulose và glycerol cho quá trình sản xuất PHA [26].

So với các vi sinh vật sinh tổng hợp PHA hoạt động ở nhiệt độ trung bình, các chủng ưa nhiệt mang lại nhiều lợi thế trong quá trình sản xuất ở quy mô công

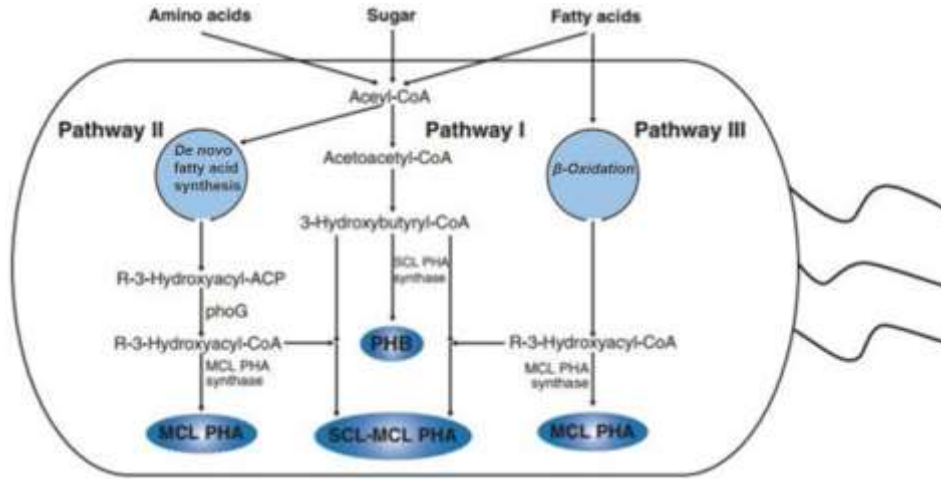
nghiệp. Nhiệt độ nuôi cấy cao giúp giảm nguy cơ nhiễm tạp từ các vi sinh vật ngoại lai, từ đó giảm yêu cầu về điều kiện vô trùng nghiêm ngặt và chi phí vận hành hệ thống. Đồng thời, khả năng hoạt động ổn định của các enzyme liên quan đến quá trình tổng hợp PHA ở nhiệt độ cao có thể góp phần nâng cao hiệu suất chuyển hóa cơ chất và tích lũy polymer trong tế bào. Đây được xem là một hướng tiếp cận tiềm năng nhằm cải thiện tính kinh tế của quy trình sản xuất PHA sinh học.

Ngoài ưu thế về điều kiện sinh trưởng, nhiều nghiên cứu còn cho thấy vi sinh vật ưa nhiệt có khả năng sử dụng đa dạng nguồn carbon, bao gồm các phụ phẩm nông nghiệp, chất thải hữu cơ và nguyên liệu tái tạo giá rẻ để sinh tổng hợp PHA. Đặc điểm này góp phần giảm chi phí nguyên liệu đầu vào, vốn được xem là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến giá thành sản phẩm PHA. Do đó, việc tìm kiếm, phân lập và tối ưu hóa các chủng vi sinh vật ưa nhiệt có năng suất tích lũy PHA cao đang trở thành một trong những hướng nghiên cứu quan trọng nhằm thúc đẩy quá trình thương mại hóa vật liệu nhựa sinh học trong tương lai.

1.2.2. Con đường sinh tổng hợp PHA

Quá trình sinh tổng hợp PHA trong vi khuẩn diễn ra chủ yếu như một cơ chế dự trữ năng lượng và carbon khi tế bào rơi vào điều kiện mất cân bằng dinh dưỡng, đặc biệt là khi nguồn carbon dư thừa nhưng các nguyên tố thiết yếu như nitơ, photpho hoặc oxy bị giới hạn. Trong điều kiện này, vi sinh vật chuyển hướng dòng chuyển hóa từ tăng trưởng tế bào sang tích lũy polymer nội bào dưới dạng hạt PHA. Các hạt này được hình thành trong tế bào chất và được bao bọc bởi một lớp màng phospholipid kèm theo các protein đặc hiệu, giúp ổn định cấu trúc và điều hòa quá trình tổng hợp, phân giải polymer.

PHA được tổng hợp qua 3 enzyme chính: β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase và PHA synthase, chuyển hóa các nguồn carbon như axit béo hoặc đường thành polymer, và diễn ra khi môi trường dư thừa carbon nhưng thiếu ni-tơ hoặc phot-pho. Ở vi sinh vật ưa nhiệt, quá trình này diễn ra hiệu quả ở nhiệt độ cao, giúp tăng năng suất và giảm ô nhiễm do các vi sinh vật khác gây ra. Chúng thường sản xuất PHA chiếm 30-50% sinh khối khô [26].



Hình 1.5. Con đường sinh tổng hợp PHA trong tế bào [27]

Quá trình bắt đầu từ acetyl-CoA, được chuyển thành acetoacetyl-CoA do β -ketothiolase (PhaA) xúc tác, sau đó được khử thành (R)-3-hydroxybutyryl-CoA do enzyme acetyl-CoA reductase (PhaB) xúc tác, và cuối cùng được polymer hóa thành PHA bởi PHA synthase (PhaC) [28,29].

Ba con đường chính: Con đường I (Acetoacetyl-CoA): phổ biến nhất ở *Cupriavidus necator*, từ acetyl-CoA qua PhaA và PhaB tạo hydroxyacyl-CoA rồi polymer hóa. Con đường II (β -oxidation axit béo): Axit béo được chuyển thành Acyl-CoA, oxy hóa β tạo (R)-3-hydroxyacyl-CoA, dùng trực tiếp cho PhaC; thường ở *Pseudomonas*. Con đường III (Tổng hợp axit béo *de novo*): Từ acetyl-CoA tạo 3-hydroxyacyl-ACP qua FAS, chuyển sang CoA cho PhaC [30].

PhaR thường điều hòa âm tính để kiểm soát tích lũy PHA khi hạt PHA quá nhiều. Các con đường này cho phép sản xuất PHA đa dạng từ scl-PHA đến mcl-PHA tùy chủng và nguồn carbon [31,32].

Sau khi được tổng hợp, PHA được tích lũy dưới dạng hạt dự trữ trong tế bào chất, chiếm một tỷ lệ đáng kể khối lượng khô của tế bào trong điều kiện tối ưu, có thể lên đến 50–80%. Khi điều kiện môi trường trở nên thuận lợi trở lại, vi sinh vật có thể huy động PHA như một nguồn carbon và năng lượng thông qua quá trình depolymer hóa. Cơ chế này giúp tế bào thích nghi linh hoạt với sự biến động của môi trường sống, đồng thời là cơ sở sinh học cho việc khai thác PHA như một vật liệu có khả năng phân hủy sinh học trong các điều kiện tự nhiên.

1.3. Tình hình nghiên cứu

Trong những thập kỷ gần đây, nghiên cứu về polyhydroxyalkanoate (PHA) đã thu hút sự quan tâm mạnh mẽ trên phạm vi toàn cầu, đặc biệt trong bối cảnh ô nhiễm nhựa hóa dầu ngày càng nghiêm trọng. Các hướng nghiên cứu ban đầu tập trung chủ yếu vào việc phân lập và tối ưu hóa các chủng vi sinh vật có khả năng tích lũy PHA cao, cũng như cải thiện hiệu suất sinh tổng hợp trong điều kiện nuôi cấy nhân tạo. Tuy nhiên, do chi phí sản xuất còn cao so với nhựa truyền thống, PHA vẫn chủ yếu được ứng dụng trong các lĩnh vực có giá trị gia tăng cao như y sinh và vật liệu đặc biệt.

Hiện nay, xu hướng nghiên cứu PHA đang chuyển dịch mạnh sang việc tối ưu hóa quy trình sản xuất theo hướng bền vững và kinh tế hơn. Nhiều công trình tập trung vào việc sử dụng nguồn carbon giá rẻ từ phụ phẩm nông nghiệp, chất thải hữu cơ và dầu thải công nghiệp nhằm giảm chi phí nguyên liệu đầu vào. Đồng thời, các công nghệ lên men liên tục, lên men hai giai đoạn và kỹ thuật nuôi cấy mật độ cao cũng được nghiên cứu nhằm tăng năng suất tích lũy polymer trong tế bào vi sinh vật. Những cải tiến này đóng vai trò quan trọng trong việc thu hẹp khoảng cách chi phí giữa PHA và các loại nhựa hóa dầu truyền thống.

Bên cạnh cải tiến quy trình sinh học, nhiều nghiên cứu cũng tập trung vào việc biến đổi di truyền các chủng vi sinh vật nhằm tăng khả năng tổng hợp PHA hoặc điều chỉnh thành phần monomer của polymer. Việc ứng dụng công nghệ sinh học phân tử cho phép điều khiển biểu hiện các enzyme chủ chốt trong con đường tổng hợp PHA, từ đó nâng cao hiệu suất và tạo ra các loại PHA có tính chất cơ lý mong muốn. Ngoài ra, các nghiên cứu về đồng nuôi cấy vi sinh vật cũng được quan tâm nhằm tận dụng ưu điểm của nhiều chủng khác nhau trong cùng một hệ thống sản xuất. Ở góc độ ứng dụng, các nghiên cứu gần đây không chỉ dừng lại ở việc sản xuất PHA mà còn mở rộng sang phát triển vật liệu composite và vật liệu chức năng. PHA được phối trộn với các polymer sinh học khác hoặc gia cường bằng sợi tự nhiên nhằm cải thiện độ bền cơ học và khả năng chịu nhiệt. Ngoài ra, các hướng nghiên cứu mới còn bao gồm ứng dụng PHA trong lĩnh vực bao bì thông minh, vật liệu y sinh thế hệ mới và thiết bị phân hủy sinh học trong điện tử mềm. Những kết quả này cho thấy tiềm năng phát triển lâu dài của PHA trong nhiều lĩnh vực công nghiệp khác nhau.

1.3.1. Trên thế giới

Trên thế giới, các nghiên cứu về vi khuẩn sinh tổng hợp PHA đã được thực hiện khá rộng rãi từ cuối thế kỷ XX, với trọng tâm là các chủng vi khuẩn dễ nuôi cấy như *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Halomonas* và một số vi sinh vật ưa mặn, ưa nhiệt, ưa kiềm. PHA được biết đến là polyester sinh học phân hủy sinh học, được vi sinh vật tổng hợp từ nguồn carbon dư thừa trong điều kiện thiếu một số chất dinh dưỡng như nitrogen, phosphorus hoặc sulfur [26,33].

Nhiều nghiên cứu quốc tế đã tập trung vào việc biến đổi điều kiện nuôi cấy và tối ưu nguồn carbon (đường, dầu thực vật, chất thải nông nghiệp) nhằm nâng cao hàm lượng PHA trong sinh khối tế bào, từ vài phần trăm đến hơn 80% sinh khối khô, tùy loại chủng và môi trường. Gần đây, các nhóm khoa học trên thế giới đã hướng đến việc khai thác một số vi sinh vật ưa mặn, ưa nhiệt, ưa kiềm để tổng hợp PHA nhằm giảm chi phí năng lượng, tận dụng điều kiện môi trường tự nhiên và tạo ra vật liệu sinh học có tính chất cơ lý đặc biệt [26,33].

Ngoài PHA copolymer điển hình như P(3HB-co-3HV), ngày càng nhiều công trình quốc tế công bố các PHA terpolymer (ví dụ P(3HB-co-3HV-co-3HHx) và P(3HB-co-3HV-co-4HB)) có khả năng điều chỉnh tính mềm dẻo, độ bền va đập và tính phân hủy sinh học, phù hợp hơn với ứng dụng trong y sinh và bao bì sinh học. Điều này cho thấy xu hướng chuyển từ các chủng vi sinh truyền thống sang khai thác đa dạng sinh học ở các môi trường đặc biệt như biển, đất mặn, nước nóng và đảo nhiệt đới để tìm kiếm các chủng mới có khả năng sinh tổng hợp PHA hiệu quả [21,34,35].

1.3.2. Việt Nam

Tại Việt Nam, việc nghiên cứu PHA mới bắt đầu phát triển trong hai thập kỷ gần đây, chủ yếu tập trung vào phân lập, tuyển chọn và đánh giá khả năng sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn thường gặp và vi sinh vật thích nghi trong điều kiện cực đoan. Một số nghiên cứu đã sử dụng vi khuẩn ưa mặn phân lập từ đảo Trường Sa Lớn và các vùng đất mặn khác để sản xuất PHA, cho thấy hàm lượng PHA có thể đạt từ vài % đến hơn 30% sinh khối khô tùy chủng. Các chủng vi khuẩn chủ yếu được báo cáo thuộc các chi như *Halomonas*, *Salinicola*, *Bacillus*... và được định danh bằng phân tích gen 16S rRNA [26,33,36].

Ngoài nhóm ưa mặn, các nhóm vi khuẩn chịu mặn và chịu nhiệt khác cũng được quan tâm vì có tiềm năng giúp giảm chi phí năng lượng và nước tinh khiết trong nuôi cấy công nghiệp. Tuy nhiên, đa số nghiên cứu trong nước hiện nay vẫn tập trung vào vùng biển, đất mặn, nước thải và các nguồn carbon thông thường như glucose, dầu cọ, dầu đậu nành, trong khi việc khai thác vi khuẩn ưa nhiệt từ suối nước nóng để sinh tổng hợp PHA còn rất hạn chế [37,38].

Các nghiên cứu về vi khuẩn ưa nhiệt ở Việt Nam chủ yếu hướng đến việc phân lập các chủng có khả năng sinh enzyme bền nhiệt (như α -amylase, chitinase) thay vì sinh tổng hợp PHA [38]. Một số báo cáo đã phân lập thành công các chủng ưa nhiệt từ suối nước nóng Trường Xuân (Khánh Hòa), Bình Châu (Bà Rịa – Vũng

Tàu) hay suối nước nóng Mỹ Lâm (Tuyên Quang), nhưng mục tiêu chủ yếu là thu nhận enzyme công nghiệp, chưa triển khai sâu vào việc tuyển chọn chủng ưa nhiệt có khả năng sinh tổng hợp PHA [26,37,38].

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu nước và bùn được thu thập tại suối nước nóng Quảng Nguyên, Hà Giang (22.648692° N, 104.916131° E).

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

2.2.1. Dụng cụ

- Đĩa petri, ống nghiệm thủy tinh
- Đầu tít và pipet các loại
- Ống falcon 50 ml, ống đong
- Ống eppendorf 1,5 ml
- Bình tam giác
- Đèn cồn, que cấy
- Đũa thủy tinh
- Giấy đo pH

2.2.2. Thiết bị máy móc

- Cân điện tử (Ohaus, Mỹ)
- Máy khuấy từ (IKA, Đức)
- Máy lắc nuôi vi khuẩn Eppendorf (Đức), box nuôi cấy vi khuẩn (Thermo Fisher Scientific, Mỹ)
- Tủ sấy, tủ ẩm, nồi hấp thanh trùng, lò vi sóng (Sanyo, Nhật Bản)
- Tủ lạnh 5°C, tủ lạnh -20°C (Panasonic, Nhật Bản)
- Máy ly tâm (Eppendorf, Đức)
- Bể điện di và bộ nguồn điện di (Thermo Fisher Scientific, Mỹ)
- Máy quang phổ (Agilent Technologies, Mỹ)
- Máy vortex (IKA, Đức)
- Kính hiển vi huỳnh quang (Olympus, Nhật Bản), kính hiển vi điện tử (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

2.2.3. Hóa chất

- LB Broth (Thermo Fisher Scientific, Mỹ)
- Cao nấm men (HiMedia Laboratories, Ấn Độ)
- NaCl (Sigma-Aldrich, Đức)
- Gelzan™ CM (Gelrite) (DuPont, Mỹ)
- GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher, Litva)
- Thuốc nhuộm Nile blue A (Sigma-Aldrich, Đức)
- Thuốc nhuộm Sudan Black (Sigma-Aldrich, Đức)
- Agarose (Sigma-Aldrich, Đức)
- PHB (Sigma-Aldrich, Đức)

2.2.4. Môi trường nuôi cấy

- Môi trường LB Broth (g/L) (Tryptone 10 g/L, Cao nấm men 5 g/L, NaCl 10 g/L) và LB + Gelrite (giống môi trường LB và thêm 20 g/L Gelrite).
- Môi trường khoáng cơ bản (g/L): glucose 30, peptone 5, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005, MnSO_4 0,005, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02, NaCl 30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2, và K_2HPO_4 1,6.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp lấy mẫu nước và bùn ở suối nước nóng

Mẫu nước và bùn được thu thập tại suối nước nóng Quảng Nguyên, tỉnh Hà Giang, tại các điểm có nhiệt độ đặc trưng khác nhau, bao gồm khoảng 40 °C, 50 °C, và 60 °C. Các điểm lấy mẫu được lựa chọn nhằm đại diện cho các vi môi trường có điều kiện nhiệt độ khác nhau, phục vụ cho việc phân lập các vi sinh vật ưa nhiệt.

Tại mỗi điểm lấy mẫu, các thông số hiện trường như nhiệt độ được đo trực tiếp tại chỗ bằng nhiệt kế chuyên dụng. Mẫu nước được thu vào các chai thủy tinh chịu nhiệt (Pyrex) đã được tiệt trùng, dung tích khoảng 500 mL, có nắp kín. Mẫu được lấy ở lớp nước bề mặt hoặc gần vị trí dòng chảy chính.

Mẫu bùn được thu thập tại lớp bùn lắng ở đáy hoặc ven dòng chảy bằng muôi cán dài đã được khử trùng và vô trùng trước khi sử dụng, nhằm đảm bảo an toàn và hạn chế nhiễm chéo. Bùn sau khi thu được chuyển vào các dụng cụ chứa vô trùng thích hợp (ống Falcon hoặc chai thủy tinh). Tất cả các mẫu được ghi mã số, thời

gian, nhiệt độ và vị trí lấy mẫu, sau đó được bảo quản trong thùng giữ nhiệt và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong thời gian sớm nhất để tiến hành các thí nghiệm phân lập và nuôi cấy tiếp theo.

2.3.2. Phương pháp phân lập vi sinh vật ưa nhiệt

Các chủng vi sinh vật ưa nhiệt được phân lập từ mẫu nước và bùn thu thập tại suối nước nóng bằng phương pháp cấy trực tiếp. Mẫu nước được lắc đều, trong khi mẫu bùn được đồng nhất hóa. Sau đó, mẫu được pha loãng thập phân ở các mức 10^{-1} và 10^{-2} trong dung dịch sinh lý vô trùng (0,85% NaCl). Mỗi độ pha loãng, 500 μ L mẫu được cấy trải trên bề mặt môi trường LB (Luria–Bertani) bổ sung Gelrite 1,5% thay cho agar nhằm tăng độ bền nhiệt của môi trường.

Các đĩa nuôi cấy được ủ ở 55 °C trong 24–72 giờ nhằm chọn lọc các vi sinh vật có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ cao. Sau thời gian ủ, các khuẩn lạc riêng rẽ với hình thái khác nhau được lựa chọn và cấy chuyển nhiều lần trên cùng một môi trường để thu nhận dòng thuần.

Các chủng phân lập được bảo quản ngắn hạn trên thạch nghiêng LB-Gelrite ở 4°C và bảo quản dài hạn trong môi trường LB bổ sung glycerol (20%, v/v) ở -20°C hoặc -80°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.3.3. Đánh giá sơ bộ khả năng tích lũy PHA nội bào của các chủng vi khuẩn phân lập

Tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được tiến hành sàng lọc định tính ban đầu khả năng sinh tổng hợp PHA bằng phương pháp nhuộm Sudan Black B theo phương pháp của Hartman (1940) [39]. Các chủng được nuôi cấy trên đĩa thạch dinh dưỡng và phủ bằng dung dịch Sudan Black B 0,3%. Sau khi nhuộm, các đĩa được rửa nhẹ bằng ethanol 60% để loại bỏ lượng thuốc nhuộm dư không liên kết. Các khuẩn lạc vẫn giữ màu xanh đen sau bước rửa được xem là các chủng có khả năng sinh PHA, trong khi các khuẩn lạc không sinh PHA không giữ lại thuốc nhuộm.

Các chủng cho kết quả dương tính với phép thử Sudan Black B tiếp tục được khảo sát khả năng tích lũy PHA bằng kính hiển vi huỳnh quang theo phương pháp của Spiekermann và cs. (1999). Những tế bào phát huỳnh quang màu cam hoặc hồng đặc trưng dưới kính hiển vi được xem là các chủng sinh PHA mạnh. Cuối cùng, các chủng dương tính được lựa chọn để phân tích bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) nhằm quan sát trực tiếp các hạt PHA nội bào [40].

2.3.4. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

a) Đặc điểm hình thái

Các chủng vi khuẩn ưa nhiệt sàng lọc ở trên được hoạt hóa và nuôi cấy trên môi trường LB bổ sung Gelrite. Cụ thể, dịch giống của từng chủng được cấy ria trên bề mặt đĩa môi trường LB + Gelrite và ủ ở nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng của vi khuẩn ưa nhiệt trong 24–48 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, đặc điểm hình thái khuẩn lạc được quan sát trực tiếp bằng mắt thường và ghi nhận dựa trên các tiêu chí gồm hình dạng, màu sắc, độ nổi, bề mặt, mép khuẩn lạc, độ bóng và độ trong của khuẩn lạc.

Đặc điểm hình thái tế bào được xác định bằng phương pháp soi kính hiển vi quang học. Sinh khối vi khuẩn từ khuẩn lạc riêng rẽ được lấy bằng que cấy vô trùng, hòa đều trong một giọt nước cất vô trùng trên lam kính, dàn mỏng, cố định nhiệt và tiến hành nhuộm Gram theo quy trình tiêu chuẩn. Tiêu bản sau nhuộm được quan sát dưới kính hiển vi quang học Olympus CH-2 (Olympus, Nhật Bản) ở vật kính dầu 100x. Các đặc điểm về hình dạng tế bào, cách sắp xếp tế bào và phản ứng Gram được ghi nhận. Kết quả quan sát được sử dụng làm cơ sở mô tả đặc điểm hình thái ban đầu của các chủng vi khuẩn ưa nhiệt nghiên cứu.

b) Đặc điểm sinh lý

Khả năng sinh trưởng hiếu khí được xác định bằng cách nuôi cấy các chủng trên môi trường LB trong điều kiện có oxy. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng được khảo sát bằng cách nuôi cấy các chủng ở các mức nhiệt độ khác nhau, trong khoảng 30–65 °C. Ảnh hưởng của pH được đánh giá trên môi trường LB được điều chỉnh đến các giá trị pH khác nhau trong khoảng pH 5,5–9,0. Khả năng chịu muối được xác định bằng cách nuôi cấy các chủng trên môi trường LB có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau, từ 0 đến 3%. Sinh trưởng của vi khuẩn được đánh giá dựa trên độ đục của môi trường lỏng. Nhiệt độ, pH và nồng độ NaCl tối ưu được xác định tại điều kiện cho sinh trưởng mạnh nhất.

c) Đặc điểm sinh hóa

- Hoạt tính catalase được xác định bằng cách nhỏ dung dịch H₂O₂ 3% lên sinh khối vi khuẩn tươi; phản ứng dương tính được ghi nhận khi xuất hiện bọt khí ngay sau khi nhỏ thuốc thử.

- Thử nghiệm Voges–Proskauer được thực hiện trong môi trường MR–VP broth; sau thời gian nuôi cấy, bổ sung thuốc thử α -naphthol và KOH, phản ứng dương tính được xác định khi môi trường chuyển sang màu đỏ hồng.

- Khả năng sử dụng và lên men các nguồn carbon khác nhau được khảo sát trên môi trường cơ sở có bổ sung riêng rẽ từng nguồn đường, bao gồm glucose, galactose, inositol, L-arabinose, cellobiose, glycerol, lactose, mannitol, rhamnose, ribose, sorbitol và D-xylose. Các ống môi trường được cấy giống và ủ trong 24–72 giờ. Kết quả dương tính được xác định dựa trên sự sinh trưởng của vi khuẩn.

- Khả năng thủy phân tinh bột, casein và gelatin được đánh giá trên các môi trường khoáng + Gelrite có bổ sung 3 g/L peptone chứa các cơ chất tương ứng. Đối với thủy phân tinh bột, các chủng được cấy trên môi trường có bổ sung tinh bột; sau nuôi cấy, đĩa được nhỏ dung dịch iodine. Vòng sáng xung quanh khuẩn lạc thể hiện phản ứng thủy phân tinh bột dương tính. Khả năng thủy phân casein được kiểm tra trên môi trường chứa casein; sự xuất hiện của vòng phân giải trong suốt quanh khuẩn lạc sau khi nhỏ axit trichloroacetic được ghi nhận là kết quả dương tính. Thủy phân gelatin được đánh giá trên môi trường gelatin; phản ứng dương tính được xác định khi môi trường bị hóa lỏng sau nuôi cấy và không đông lại khi làm lạnh.

d) Trình tự gen 16S rRNA

Tiến hành tách chiết DNA hệ gen các chủng vi khuẩn tiềm năng bằng GeneJET Genomic Purification kit (Thermo Fisher, Mỹ). Sau đó, DNA được điện di trên gel agarose 0,8%, 100 V, trong 30 phút để kiểm tra. Sử dụng DNA hệ gen để làm khuôn cho phản ứng khuếch đại gen 16S rRNA với cặp mồi đặc hiệu 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3').[43] với thành phần phản ứng:

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μ l)
Taq polymerase buffer	10x	5 μ l
Mồi xuôi	10 pmol	1 μ l
Mồi ngược	10 pmol	1 μ l
DNA khuôn	20 ng	2 μ l
dNTPs	10 mM	2 μ l
Nuclease-free water		39 μ l

Chu trình nhiệt: 95°C 5 phút, 35 chu kỳ (95°C 1 phút, 55°C 45 giây, 72°C 1 phút), 72°C 5 phút, 4°C

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8% để quan sát và tinh sạch bằng Kit GenJET PCR Purification (Thermo Fisher, Mỹ) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất, sau đó được gửi đi giải trình tự. Kết quả trình tự đoạn gen được xử lý bằng các phần mềm và chương trình tin sinh học như BioEdit được so sánh mức độ tương đồng các nucleotide bằng công cụ Basic Local Alignment Sequences Tool BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) với các trình tự sẵn có trong cơ sở dữ liệu.

2.3.5. Lên men sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Khả năng sinh trưởng và tích lũy polyhydroxyalkanoate (PHA) của các chủng tuyển chọn được đánh giá trong điều kiện lên men lắc. Khuẩn lạc đơn của từng chủng vi khuẩn được cấy vào ống nghiệm chứa 5 mL môi trường LB và nuôi ở nhiệt độ 45 °C, lắc 200 rpm qua đêm để hoạt hóa. Sau đó được cấy chuyển vào môi trường LB lỏng và nuôi qua đêm để thu dịch giống. Dịch giống được bổ sung vào bình tam giác chứa môi trường khoáng có glucose là nguồn carbon và peptone là nguồn nitơ với tỷ lệ giống 5%. Môi trường được điều chỉnh pH về 7,0 trước khi khử trùng. Quá trình lên men được thực hiện ở 45 °C trong 72 giờ trên máy lắc. Sau thời gian nuôi cấy, dịch lên men được thu nhận để xác định sinh khối khô và hàm lượng PHA tích lũy trong tế bào.

2.3.6. Ảnh hưởng của các yếu tố lên sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

a) Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được khảo sát trong điều kiện lên men lắc. Chủng HG5.6 được hoạt hóa trên môi trường LB, sau đó cấy chuyển vào môi trường LB lỏng để chuẩn bị dịch giống. Dịch giống được bổ sung vào bình tam giác chứa môi trường khoáng với glucose là nguồn carbon và peptone là nguồn nitơ. Môi trường được điều chỉnh pH 7,0 trước khi khử trùng. Quá trình nuôi cấy được thực hiện ở các mức nhiệt độ khác nhau gồm 30, 35, 40, 45, 50, 55 và 60 °C trên máy lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 72 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, dịch lên men được thu nhận để đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng nghiên cứu.

b) Ảnh hưởng của pH

Ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường đến khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được khảo sát bằng cách điều chỉnh pH môi trường khoáng ở các giá trị 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 và 8,5 trước khi khử trùng. Quá trình nuôi cấy được thực hiện với glucose là nguồn carbon, peptone là nguồn nitơ, ở 50 °C trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 72 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, dịch lên men được thu nhận để đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng nghiên cứu.

c) Ảnh hưởng của nguồn carbon

Ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được khảo sát bằng cách bổ sung riêng rẽ các nguồn carbon khác nhau vào môi trường khoáng. Các nguồn carbon sử dụng trong nghiên cứu bao gồm glucose, galactose, lactose, sucrose, ribose, xylose, tinh bột và glycerol. Quá trình nuôi cấy được thực hiện với peptone là nguồn nitơ, ở 50 °C, pH 7,0 trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 72 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, dịch lên men được thu nhận để đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng nghiên cứu.

d) Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được khảo sát bằng cách bổ sung riêng rẽ các nguồn nitơ khác nhau vào môi trường khoáng. Các nguồn nitơ sử dụng trong nghiên cứu bao gồm NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, KNO₃, cao nấm men và peptone. Quá trình nuôi cấy được thực hiện với glucose là nguồn carbon, ở 50 °C, pH 7,0 trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 72 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, dịch lên men được thu nhận để đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng nghiên cứu.

e) Ảnh hưởng của tỉ lệ C/N

Ảnh hưởng của tỷ lệ carbon/nitơ (C/N) đến khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được khảo sát bằng cách thay đổi tỷ lệ giữa glucose và peptone trong môi trường khoáng. Các tỷ lệ C/N khảo sát bao gồm 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1 và 40:1 (mol/mol). Quá trình nuôi cấy được thực hiện ở 50 °C, pH 7,0 trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 72 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, dịch lên men được thu nhận để đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng nghiên cứu.

2.3.7. Xác định sinh khối khô tế bào

5 - 10 mL sinh khối tế bào thu được sau quá trình nuôi cấy được rửa kỹ bằng nước cất nhằm loại bỏ các thành phần môi trường còn sót lại, sau đó sấy trong tủ sấy đối lưu ở 50 °C đến khối lượng không đổi. Sinh khối khô thu được được cân để xác định khối lượng tế bào khô (Dry Cell Weight – DCW), được sử dụng làm chỉ tiêu đánh giá tổng sinh khối tế bào.

2.3.8. Tách chiết PHA

Để tách chiết PHA, sinh khối tế bào khô được xử lý bằng sodium hypochlorite (NaClO) và chloroform (CHCl₃) theo tỷ lệ 1:100 (w/v). Hỗn hợp được ủ ở 60 °C trong 2 giờ dưới điều kiện lắc nhẹ với tốc độ 100 vòng/phút. Sau thời gian ủ, lớp pha nước phía trên chứa sinh khối còn dư và NaClO được loại bỏ cẩn thận, trong khi pha chloroform phía dưới chứa PHA hòa tan được thu nhận và chuyển vào đĩa Petri thủy tinh. Để loại bỏ lipid tế bào và các tạp chất, hỗn hợp methanol và nước được bổ sung vào dịch chiết theo tỷ lệ 7:3 (v/v), sau đó hỗn hợp được ly tâm ở 8500×g trong 15 phút. Phần dịch nổi được loại bỏ, còn phần kết tủa thu được được rửa hai lần bằng ethanol 95% (v/v). PHA tinh sạch sau đó được làm khô tự nhiên qua đêm ở nhiệt độ phòng và cân khối lượng. Sinh khối còn lại được xác định bằng cách lấy khối lượng tế bào khô ban đầu trừ đi khối lượng PHA tinh sạch thu được. Tỷ lệ tích lũy PHA được tính bằng tỷ lệ giữa hàm lượng PHA và tổng sinh khối khô tế bào (DCW). Tất cả các thí nghiệm được thực hiện với ba lần lặp lại.

2.3.9. Xác định thành phần monomer của PHA

Thành phần monomer của PHA được xác định bằng phương pháp axit methanol kết hợp GC–MS/MS. Sinh khối tế bào khô được xử lý với hỗn hợp HCl/methanol (85:15, v/v) có bổ sung toluene và ủ ở 100 °C trong 2 giờ. Sau phản ứng, mẫu được chiết bằng hexane, ly tâm và thu pha hữu cơ để phân tích. Phân tích GC–MS/MS được thực hiện trên hệ thống TRACE 1300 kết nối đầu dò TSQ 8000 Evo (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) sử dụng cột HP-5ms Ultra Inert. Khí helium được sử dụng làm khí mang với tốc độ dòng 1,5 mL/phút. Các monomer được định danh dựa trên thời gian lưu và phổ khối so sánh với mẫu chuẩn PHB, PHBV và thư viện phổ NIST 19. Hàm lượng 3HB được xác định bằng phương pháp đường chuẩn ngoài.

2.3.9. Phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) được sử dụng để đặc trưng cấu trúc

hóa học của PHA và xác định các nhóm chức đặc trưng của polymer. Phổ FTIR được ghi nhận trên thiết bị Thermo Nicolet NEXUS 670 FT-IR spectrometer (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) trong khoảng số sóng từ 4000–500 cm^{-1} , tập trung phân tích các dao động kéo giãn đặc trưng của nhóm carbonyl ester và liên kết alkyl thường gặp ở polyhydroxyalkanoate.

2.3.10. Phân tích kết quả

Dữ liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel (Microsoft Office Home 2024, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Tất cả các thí nghiệm được thực hiện tối thiểu với ba lần lặp lại và kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD). Các đồ thị được xây dựng bằng phần mềm OriginPro 8.5.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn hiếu khí ở suối nước nóng Quảng Nguyên

Nhằm thu nhận các chủng vi khuẩn hiếu khí có khả năng thích nghi với điều kiện nhiệt độ cao, các mẫu nước và bùn đã được thu thập từ nhiều vị trí khác nhau tại suối nước nóng Quảng Nguyên, tỉnh Hà Giang, nơi có nhiệt độ dao động từ 40–60°C. Quy trình phân lập được thiết kế theo hướng mô phỏng tối đa các điều kiện tự nhiên của hệ sinh thái suối nước nóng, trong đó nước khoáng tại chỗ được sử dụng thay thế nước cất trong môi trường nuôi cấy nhằm duy trì thành phần hóa học đặc trưng của môi trường sống bản địa.

Các mẫu sau khi thu thập được xử lý trong vòng 24 giờ, tiến hành pha loãng thập phân và trải đĩa trên môi trường LB thạch bổ sung Gelrite, sau đó ủ ở 55 °C nhằm chọn lọc các vi khuẩn ưa nhiệt. Sự hình thành khuẩn lạc được theo dõi tại các thời điểm 24, 48 và 72 giờ.

Từ các mẫu nước và bùn thu thập được, chúng tôi tiến hành phân lập trực tiếp và thu nhận các khuẩn lạc có đặc điểm hình thái khác biệt (hình dạng, màu sắc, kích thước, đặc điểm mép và bề mặt khuẩn lạc) để lựa chọn, tách dòng, làm thuần và bảo quản phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả phân lập được trình bày trong Bảng 3.1, Bảng 3.2 và Hình 3.1.

Bảng 3.1. Mật độ vi khuẩn hiếu khí trong các mẫu nước và bùn suối nước nóng Quảng Nguyên.

Tên mẫu	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL hoặc CFU/g)
Mẫu nước	3×10^3
Mẫu bùn 1	$5,4 \times 10^4$
Mẫu bùn 2	$4,3 \times 10^4$
Mẫu bùn 3	$3,5 \times 10^4$
Mẫu bùn 4	$4,6 \times 10^5$

Kết quả trình bày trong Bảng 3.1 cho thấy mật độ vi khuẩn hiếu khí trong các mẫu suối nước nóng Quảng Nguyên có sự khác biệt rõ rệt giữa pha nước và pha bùn. Cụ thể, mật độ vi khuẩn trong mẫu nước đạt 3×10^3 CFU/mL, trong khi các mẫu bùn dao động từ $3,5 \times 10^4$ đến $4,6 \times 10^5$ CFU/g. Như vậy, mật độ vi khuẩn trong các mẫu bùn cao hơn từ một đến hai bậc log so với mẫu nước. Sự khác biệt này phản ánh đặc điểm phân bố điển hình của vi sinh vật trong các hệ sinh thái suối nước nóng, trong đó pha trầm tích đóng vai trò là nơi cư trú chính của vi sinh vật. So với pha nước, môi trường bùn có khả năng tích lũy chất hữu cơ, khoáng chất và tế bào vi sinh vật, đồng thời hạn chế sự pha loãng và cuốn trôi do dòng chảy. Ngoài ra, các hạt rắn trong trầm tích cung cấp bề mặt cho vi sinh vật bám dính, tạo điều kiện hình thành các cấu trúc vi sinh vật dạng màng sinh học. Trong pha trầm tích, phần lớn vi sinh vật tồn tại dưới dạng bám dính trên bề mặt hạt (particle-attached microorganisms) thay vì ở trạng thái sống tự do. Các tế bào vi khuẩn bám lên bề mặt khoáng hoặc vật chất hữu cơ thông qua các chất nền ngoại bào (extracellular polymeric substances, EPS), từ đó hình thành các vi cấu trúc dạng màng sinh học (biofilm). Sự bám dính này giúp vi sinh vật tránh bị cuốn trôi, đồng thời tạo điều kiện tiếp cận ổn định với nguồn dinh dưỡng hấp phụ trên bề mặt hạt. Bên cạnh đó, các vi môi trường hình thành trong biofilm (ví dụ như gradient oxy và chất dinh dưỡng) cho phép nhiều nhóm vi sinh vật cùng tồn tại và phát triển, góp phần làm tăng mật độ tế bào trong pha trầm tích so với pha nước tự do.

Đối với mẫu nước, mật độ vi khuẩn thu được trong nghiên cứu này phù hợp với các công bố trước đây. Cụ thể, Belkova *et al.* (2007) ghi nhận mật độ vi khuẩn dị dưỡng nuôi cấy được trong nước suối nước nóng ở mức $10^2 - 10^3$ CFU/mL, nằm trong cùng bậc độ lớn với giá trị 3×10^3 CFU/mL thu được trong nghiên cứu này. Điều này cho thấy mật độ vi sinh vật trong pha nước của suối Quảng Nguyên là điển hình cho các hệ suối nước nóng tự nhiên [47]. Đối với các mẫu bùn, mật độ vi khuẩn đạt mức $10^4 - 10^5$ CFU/g trong nghiên cứu này phù hợp với khoảng giá trị đã được ghi nhận trong các nghiên cứu về vi sinh vật ưa nhiệt. Theo Zeikus (1979), mật độ vi khuẩn dị dưỡng nuôi cấy được trong trầm tích suối nước nóng có thể dao động trong khoảng $10^4 - 10^6$ CFU/g, tùy thuộc vào điều kiện địa hóa và phương

pháp nuôi cấy [48]. Điều này cho thấy các giá trị thu được tại suối Quảng Nguyên là phù hợp với xu hướng chung của môi trường trầm tích địa nhiệt.

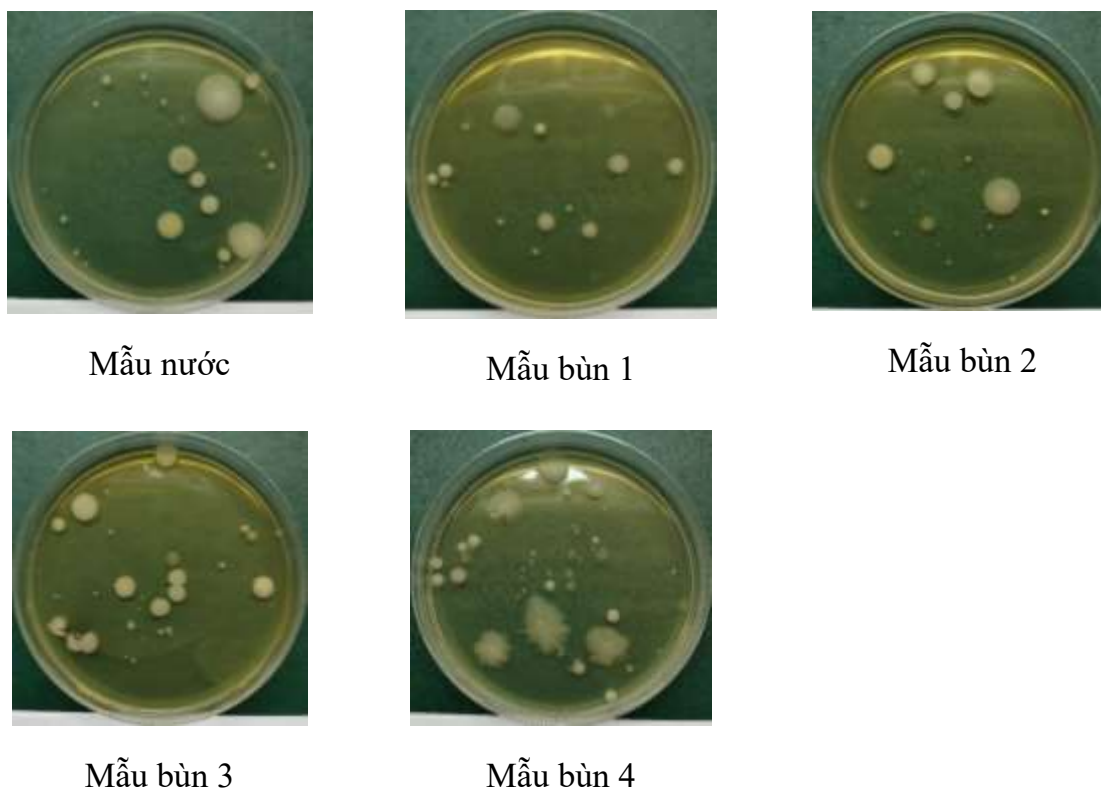
Bảng 3.2. Số lượng và ký hiệu các chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu nước và bùn suối nước nóng Quảng Nguyên.

Tên mẫu	Số chủng tách được	Ký hiệu chủng
Mẫu nước	3	HG1.1 – HG1.3
Mẫu bùn 1	3	HG2.1 – HG2.3
Mẫu bùn 2	3	HG3.1 – HG3.3
Mẫu bùn 3	5	HG4.1 - HG4.5
Mẫu bùn 4	6	HG5.1 – HG5.6
Tổng số	20	

Kết quả trình bày trong Bảng 3.2 cho thấy tổng cộng 20 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ 5 mẫu, trong đó các mẫu bùn cho số lượng chủng cao hơn so với mẫu nước. Mẫu bùn 4 không chỉ có mật độ vi khuẩn cao nhất mà còn cho số lượng chủng phân lập lớn nhất (6 chủng), tiếp theo là mẫu bùn 3 (5 chủng), trong khi mẫu nước và các mẫu bùn còn lại chỉ thu được 3 chủng. Xu hướng này cho thấy mối liên hệ giữa mật độ vi sinh vật ban đầu và khả năng thu nhận đa dạng chủng bằng phương pháp nuôi cấy. Tuy nhiên, số lượng chủng phân lập được có thể không phản ánh đầy đủ tính đa dạng thực sự của quần xã vi sinh vật trong môi trường tự nhiên. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng phần lớn vi sinh vật trong các hệ suối nước nóng không thể nuôi cấy bằng các điều kiện phòng thí nghiệm thông thường; do đó, tập hợp các chủng phân lập được chỉ đại diện cho phần vi sinh vật có khả năng sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy đã lựa chọn (Inskeep *et al.*, 2013) [49].

Hình ảnh khuẩn lạc thể hiện trong Hình 3.1 cho thấy sự đa dạng rõ rệt về hình thái khuẩn lạc giữa các mẫu nước và bùn, bao gồm sự khác biệt về kích thước, màu sắc, hình dạng và đặc điểm bề mặt. Sự đa dạng này phản ánh tính không đồng nhất của tập hợp vi khuẩn nuôi cấy được từ suối nước nóng Quảng Nguyên, đồng thời cho thấy phương pháp phân lập đã thu nhận được nhiều nhóm vi khuẩn khác nhau. Tổng hợp các kết quả từ Bảng 3.1, Bảng 3.2 và Hình 3.1 cho thấy suối nước nóng

Quảng Nguyên, đặc biệt là khu vực trầm tích, là nguồn vi sinh vật hiếu khí phong phú với mật độ cao và sự đa dạng đáng kể. Đây là cơ sở quan trọng cho các bước sàng lọc tiếp theo nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn có tiềm năng ứng dụng, đặc biệt trong sinh tổng hợp polyhydroxyalkanoate (PHA).



Hình 3.1. Khuẩn lạc thu được từ các mẫu nước và bùn tại các vị trí khảo sát suối nước nóng Quảng Nguyên.

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

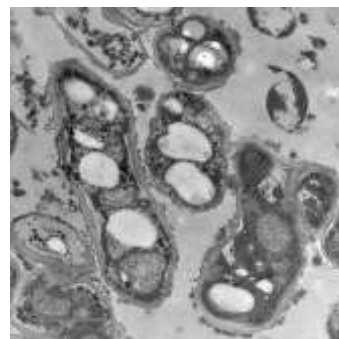
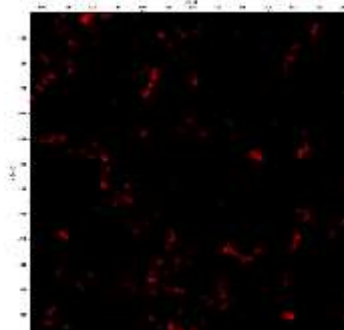
Nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng tích lũy polyhydroxyalkanoate (PHA) từ tập hợp các chủng đã phân lập, toàn bộ các chủng thu nhận được trong mục 3.1 được tiến hành sàng lọc theo quy trình hai bước dựa trên phương pháp nhuộm đặc hiệu. Trước hết, các chủng được kiểm tra khả năng tích lũy PHA bằng phương pháp nhuộm Sudan Black B, cho phép phát hiện nhanh sự hiện diện của các hạt polymer nội bào thông qua sự bắt màu đặc trưng. Dựa trên kết quả nhuộm, các chủng thể hiện tín hiệu dương tính rõ rệt được lựa chọn cho bước sàng lọc tiếp theo. Từ quá trình này, ba chủng vi khuẩn tiềm năng đã được

tuyển chọn và tiếp tục được kiểm chứng bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang Nile Blue A, kết hợp với quan sát cấu trúc siêu hiển vi bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), nhằm xác nhận sự hiện diện của các hạt tích lũy PHA trong tế bào. Kết quả sàng lọc và xác nhận khả năng tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn

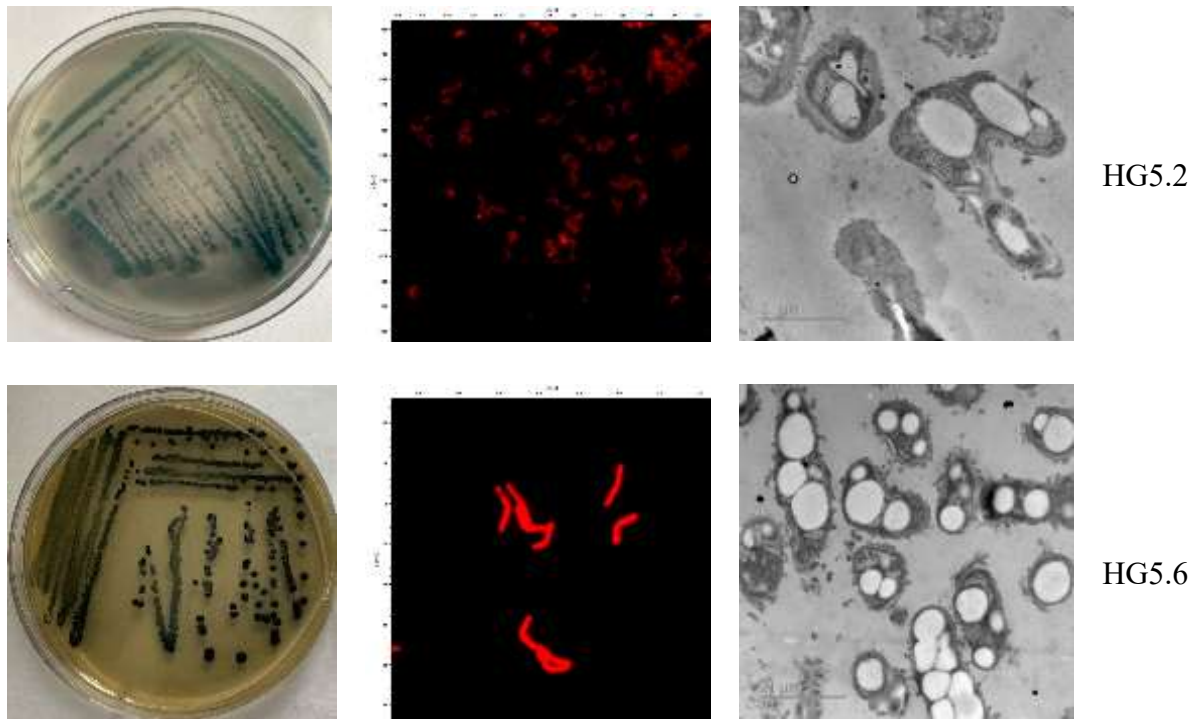
Bảng 3.3. Khả năng bắt màu Sudan Black B của các chủng vi khuẩn phân lập.

Chủng	Phản ứng với thuốc nhuộm Sudan black B	Chủng	Phản ứng với thuốc nhuộm Sudan black B
HG1.1	-	HG4.2	-
HG1.2	-	HG4.3	-
HG1.3	-	HG4.4	-
HG2.1	-	HG4.5	-
HG2.2	-	HG5.1	-
HG2.3	+	HG5.2	+
HG3.1	-	HG5.3	-
HG3.2	-	HG5.4	-
HG3.3	-	HG5.5	-
HG4.1	-	HG5.6	+++

Trong tổng số 20 chủng phân lập, có 3 chủng (HG2.3, HG5.2 và HG5.6) cho phản ứng dương tính với Sudan Black B và được lựa chọn cho các bước kiểm tra tiếp theo.



HG2.3



Hình 3.2. Nhuộm Sudan Black B, Nile Blue A và ảnh TEM của các chủng HG2.3, HG5.2 và HG5.6.

Kết quả trình bày trong Bảng 3.3 cho thấy trong tổng số 20 chủng vi khuẩn phân lập được, chỉ có 3 chủng (HG2.3, HG5.2 và HG5.6) cho phản ứng dương tính với thuốc nhuộm Sudan Black B, trong khi các chủng còn lại đều âm tính. Như vậy, tỷ lệ các chủng có khả năng tích lũy PHA ban đầu chiếm 15%, phản ánh tính chọn lọc của khả năng sinh tổng hợp và tích lũy polymer này trong quần thể vi sinh vật môi trường. Phương pháp nhuộm Sudan Black B được sử dụng rộng rãi như một kỹ thuật sàng lọc nhanh các vi khuẩn tích lũy PHA dựa trên khả năng bắt màu của các hợp chất kỵ nước nội bào (Juan *et al.*, 1998) [50]. Tuy nhiên, do thuốc nhuộm này có thể tương tác với các thành phần lipid khác ngoài PHA, phương pháp có thể cho kết quả dương tính giả hoặc phụ thuộc vào hàm lượng polymer tích lũy trong tế bào. Do đó, việc sử dụng Sudan Black B chủ yếu mang tính định hướng ban đầu và cần được kết hợp với các phương pháp đặc hiệu hơn để xác nhận.

Ba chủng vi khuẩn dương tính được tiếp tục kiểm tra bằng nhuộm huỳnh quang Nile Blue A và quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), kết quả

thể hiện trong Hình 3.2. Ở nhuộm Nile Blue A, cả ba chủng đều phát huỳnh quang màu cam đặc trưng dưới ánh sáng kích thích, cho thấy sự hiện diện của các hạt polyester nội bào. Phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn đối với các polyhydroxyalkanoate, cho phép phát hiện PHA ngay cả khi hàm lượng tích lũy thấp [51,52]. Hơn nữa, khi quan sát ảnh TEM cho thấy rõ các hạt dự trữ nội bào có dạng hình cầu hoặc hình elip nằm trong tế bào vi khuẩn, là đặc trưng hình thái điển hình của các hạt PHA. Sự hiện diện đồng thời của tín hiệu dương tính ở cả nhuộm Sudan Black B, Nile Blue A và ảnh TEM đã cung cấp bằng chứng trực tiếp và đáng tin cậy về khả năng tích lũy PHA của các chủng HG2.3, HG5.2 và HG5.6.

Việc kết hợp các phương pháp sàng lọc và xác nhận ở nhiều cấp độ khác nhau (nhuộm màu, huỳnh quang và quan sát siêu hiển vi) là cách tiếp cận hiệu quả nhằm nâng cao độ chính xác trong tuyển chọn chủng vi khuẩn tích lũy PHA. Cách tiếp cận này đã được áp dụng rộng rãi trong các nghiên cứu về PHA nhằm khắc phục hạn chế của từng phương pháp riêng lẻ và đảm bảo tính tin cậy của kết quả [53,54]. Tổng hợp các kết quả từ Bảng 3.3 và Hình 3.2 cho thấy ba chủng HG2.3, HG5.2 và HG5.6 là các chủng có khả năng tích lũy PHA rõ rệt, do đó được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo về đặc điểm sinh học của chúng.

3.3 Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Sau khi sàng lọc và xác nhận khả năng tích lũy PHA, ba chủng vi khuẩn HG2.3, HG5.2 và HG5.6 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Việc khảo sát các đặc điểm sinh học của các chủng này nhằm phục vụ định danh và làm cơ sở cho việc thiết lập các điều kiện nuôi cấy phù hợp cho sinh tổng hợp PHA. Các kết quả được trình bày ở Bảng 3.4, bao gồm đặc điểm hình thái, sinh hóa và khả năng sinh trưởng của các chủng trong các điều kiện nhiệt độ, pH và nồng độ muối khác nhau.

Bảng 3.4. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của ba chủng HG2.3, HG5.2 và HG5.6.

Đặc điểm	Chủng		
	HG2.3	HG5.2	HG5.6
Hình thái khuẩn lạc	Màu xám kem, hình	Màu trắng ngà đến vàng	Màu trắng kem đến

	dạng không đều, rìa hơi khía và bề mặt bóng, hơi trong	nhạt, dạng tròn không đều, rìa nguyên và bề mặt nhẵn, hơi bóng, dạng lồi, đục	vàng nhạt, dạng tròn, với rìa không đều, hơi khía nhẹ và bề mặt hơi khô, lồi nhẹ, đục
Hình thái tế bào	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn
Nội bào tử	+	+	+
Gram	+	+	+
Catalase	+	+	+
Voges Proskauer's	-	+	-
Lên men:			
Glucose	+	+	+
Galactose	-	-	+
Inositol	+	+	-
L-Arabinose	-	-	-
Cellobiose	-	-	+
Glycerol	+	-	+
Lactose	+	-	+
Mannitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Ribose	+	-	+
Sorbitol	+	-	-
D-Xylose	-	-	+
Thủy phân:			
Tinh bột	-	-	+

Casein	-	+	+
Gelatin	-	-	-
Hiếu khí	+	+	+
Dải nhiệt độ sinh trưởng	35 – 50 °C	40 – 65 °C	30 – 65 °C
Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	45 °C	50 °C	50 °C
Dải pH sinh trưởng	5,5 - 9,0	6,5 – 7,5	6,0 – 8,0
pH tối ưu cho sinh trưởng	7,0	7,0	7,0
Dải nồng độ NaCl cho sinh trưởng	0,5 – 2,5 %	0 – 3%	0 – 3%
Nồng độ NaCl tối ưu cho sinh trưởng	0,5 - 1 %	0,5 – 1 %	0,5 – 1 %

Kết quả trong Bảng 3.4 cho thấy ba chủng vi khuẩn HG2.3, HG5.2 và HG5.6 có nhiều đặc điểm sinh học chung, bao gồm dạng trực khuẩn, Gram dương, sinh bào tử, catalase dương tính và có khả năng sinh trưởng hiếu khí. Những đặc điểm này phù hợp với nhóm vi khuẩn ưa nhiệt dạng *Bacillus*-like, thường được phân lập từ các môi trường địa nhiệt như suối nước nóng.

Tuy nhiên, giữa các chủng vẫn tồn tại những sai khác đáng chú ý về đặc điểm sinh lý – sinh hóa. Chủng HG5.2 thể hiện phản ứng Voges–Proskauer dương tính, trong khi hai chủng còn lại âm tính. Về khả năng sử dụng cơ chất, HG5.6 có phổ chuyển hóa rộng hơn khi có thể sử dụng nhiều loại đường khác nhau như galactose, cellobiose, glycerol và D-xylose, đồng thời thể hiện hoạt tính thủy phân tinh bột và casein. Trong khi đó, HG5.2 có khả năng chuyển hóa hạn chế hơn, còn HG2.3 thể hiện kiểu trung gian. Những sai khác này phản ánh sự đa dạng chức năng giữa các chủng, có thể liên quan đến chiến lược khai thác nguồn dinh dưỡng trong môi trường tự nhiên.

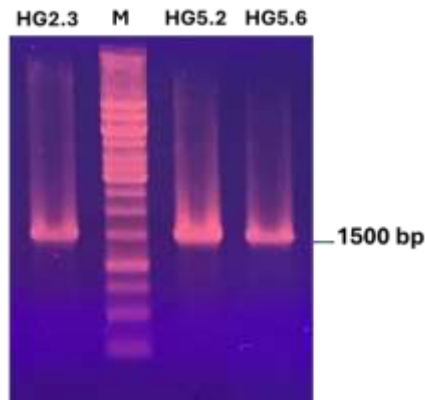
Xét về đặc điểm sinh trưởng, cả ba chủng đều phát triển trong dải nhiệt độ tương đối rộng (30–65°C), với nhiệt độ tối ưu từ 45–50°C. Khoảng nhiệt độ này phù hợp với điều kiện môi trường suối nước nóng Quảng Nguyên, nơi nhiệt độ ghi nhận dao động khoảng 40–60°C, cho thấy các chủng vi khuẩn đã thích nghi tốt với điều kiện địa nhiệt tại khu vực nghiên cứu. Khả năng sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ

rộng cũng cho thấy tính linh hoạt sinh lý, giúp các chủng duy trì hoạt động trong điều kiện môi trường biến động.

Ngoài ra, cả ba chủng đều có khả năng sinh trưởng trong môi trường có bổ sung NaCl đến 3%, với nồng độ tối ưu khoảng 0,5–1%, cho thấy đây là các vi khuẩn chịu muối nhẹ (halotolerant). Đặc điểm này phù hợp với môi trường suối nước nóng, nơi thường chứa các ion hòa tan tạo áp lực thẩm thấu nhất định. Khả năng chịu muối của các chủng vi khuẩn ưa nhiệt đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây, trong đó các vi khuẩn thuộc chi *Geobacillus* và các nhóm *Bacillus*-like có thể thích nghi với đồng thời nhiều yếu tố stress môi trường, bao gồm nhiệt độ cao và áp suất thẩm thấu, nhờ các cơ chế điều hòa nội bào và cấu trúc màng bền vững [48,55].

Nhìn chung, các đặc điểm sinh học của ba chủng vi khuẩn cho thấy sự tương đồng về mặt phân loại nhưng khác biệt về khả năng chuyển hóa và thích nghi sinh thái. Những đặc điểm này không chỉ phản ánh khả năng thích nghi của vi khuẩn với môi trường suối nước nóng mà còn cung cấp cơ sở quan trọng cho việc định hướng điều kiện nuôi cấy và lên men trong các nghiên cứu tiếp theo về sinh tổng hợp PHA.

Để xác định chính xác vị trí phân loại của các chủng vi khuẩn tuyển chọn, phương pháp phân tích trình tự gen 16S rRNA được áp dụng. Đây là công cụ phổ biến và có độ tin cậy cao trong định danh vi khuẩn ở mức chi và loài. Kết quả khuếch đại và phân tích trình tự gen 16S rRNA của các chủng HG2.3, HG5.2 và HG5.6 được trình bày trong Hình 3.3, Hình 3.4, Hình 3.5 và Hình 3.6.



Hình 3.3. Sản phẩm khuếch đại gene 16S rRNA của 3 chủng vi khuẩn HG2.3, HG5.2 và HG5.6. M: 1 kb ladder (Thermo Scientific).

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA của ba chủng vi khuẩn HG2.3, HG5.2 và HG5.6 được trình bày ở Hình 3.3 cho thấy các băng DNA rõ nét, có kích thước xấp xỉ 1,4–1,5 kb, phù hợp với kích thước đặc trưng của gen 16S rRNA ở vi khuẩn. Điều này chứng tỏ quá trình khuếch đại PCR đã thành công và sản phẩm thu được đủ chất lượng cho các phân tích trình tự tiếp theo.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Views								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus thermoaerophilus strain LUCKY-1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Aneurinibacillus ther...	2678	2678	100%	0.0	99.13%	1502	PP813862.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus thermoaerophilus strain LUCKY-5.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Aneurinibacillus ther...	2678	2678	100%	0.0	99.13%	1500	PP813869.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus thermoaerophilus strain CCM.1990 chromosome, complete genome	Aneurinibacillus ther...	2671	29274	100%	0.0	99.06%	3862904	CP080784.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus sp. X152 chromosome, complete genome	Aneurinibacillus sp. ...	2671	29296	100%	0.0	99.06%	3684835	CP014140.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus thermoaerophilus strain AFn2 chromosome, complete genome	Aneurinibacillus ther...	2671	29198	100%	0.0	99.06%	3681415	CP175530.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus thermoaerophilus strain AFNA.1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Aneurinibacillus ther...	2665	2665	100%	0.0	98.99%	1504	EF032875.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus thermoaerophilus strain HZ.16S ribosomal RNA gene, complete sequence	Aneurinibacillus ther...	2658	2658	100%	0.0	98.93%	1502	DQ890194.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus thermoaerophilus strain 1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Aneurinibacillus ther...	2656	2656	99%	0.0	99.19%	1481	MW527322.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus thermoaerophilus strain SSA4.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Aneurinibacillus ther...	2651	2651	99%	0.0	99.12%	1480	MH888755.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aneurinibacillus thermoaerophilus strain G3.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Aneurinibacillus ther...	2647	2647	99%	0.0	99.05%	1488	KJ1190161.1

Hình 3.4. So sánh mức độ tương đồng gene 16S rRNA của chủng HG2.3 với các chủng trên Ngân hàng Gene NCBI.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
Parageobacillus toebii strain NEB857 chromosome, complete genome	Parageobacillus toebii	2567	25539	100%	0.0	98.03%	3428372	CP133568.1
Parageobacillus toebii NBRC 107807 strain DSM 14580 chromosome, complete genome	Parageobacillus toebii N...	2567	25533	100%	0.0	98.03%	3270071	CP049703.1
Geobacillus toebii partial 16S rRNA gene, strain R-32653	Parageobacillus toebii	2567	2567	100%	0.0	98.71%	1478	FN428880.1
Bacillus sp. BGSC W9A84 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	Parageobacillus toebii	2564	2564	100%	0.0	98.03%	1559	AY808892.1
Geobacillus toebii strain BGSC 89A1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	Parageobacillus toebii	2564	2564	100%	0.0	97.96%	1558	AY808882.1
Parageobacillus toebii strain NEB716 chromosome, complete genome	Parageobacillus toebii	2562	25525	100%	0.0	97.96%	3402533	CP079511.1
Geobacillus sp. E263 chromosome, complete genome	Geobacillus sp. E263	2562	25419	100%	0.0	97.96%	3477599	CP041832.1
Bacillus sp. BGSC W9A22 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	Parageobacillus toebii	2558	2558	100%	0.0	97.89%	1559	AY808857.1
Bacillus sp. 34ZPM2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. 34ZPM2	2556	2556	100%	0.0	97.89%	1541	KJ722459.1
Geobacillus toebii gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain T1680	Parageobacillus toebii	2556	2556	100%	0.0	98.02%	1506	AB136120.1

Hình 3.5. So sánh mức độ tương đồng gene 16S rRNA của chủng HG5.2 với các chủng trên Ngân hàng Gene NCBI.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
Geobacillus vulcani strain BGSC 97A1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	Geobacillus vul...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1561	AY008910.1
Uncultured organism clone ELU0026-T116-S-NIPCRAMoANA_000288 small subunit ribosomal RNA gene	uncultured orga...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1468	HQ2740203.1
Uncultured organism clone ELU0184-T375-S-NIPCRAMoANA_000190 small subunit ribosomal RNA gene	uncultured orga...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1468	HQ2810248.1
Geobacillus thermopacifirivans strain Ba7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Geobacillus the...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1474	KC252601.1
Geobacillus thermopacifirivans partial 16S rRNA gene, strain R-35850	Geobacillus the...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1510	FN428896.1
Geobacillus haustoriensis strain AT 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Geobacillus hau...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1491	KC252972.1
Geobacillus thermopacifirivans strain F-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Geobacillus the...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1561	EU214815.1
Uncultured organism clone ELU0161-T363-S-NIPCRAMoANA_000514 small subunit ribosomal RNA gene	uncultured orga...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1470	HQ065883.1
Geobacillus haustoriensis strain m-T2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Geobacillus hau...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1533	EU852063.1
Geobacillus thermopacifirivans partial 16S rRNA gene, strain R-35645	Geobacillus the...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1510	FN428890.1
Uncultured organism clone ELU0041-T385-S-NIPCRAMoANA_000662 small subunit ribosomal RNA gene	uncultured orga...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1468	HQ2758157.1
Geobacillus thermopacifirivans strain Ba1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Geobacillus the...	2604	2604	100%	0.0	99.03%	1482	KC252975.1

Hình 3.6. So sánh mức độ tương đồng gene 16S rRNA của chủng HG5.6 với các chủng trên Ngân hàng Gene NCBI.

Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA với cơ sở dữ liệu NCBI (Hình 3.4–3.6) cho thấy các chủng có mức độ tương đồng rất cao với các vi khuẩn đã được công bố. Cụ thể, chủng HG2.3 có độ tương đồng cao ($\geq 99\%$) với các loài thuộc chi *Aneurinibacillus*, gần nhất với *Aneurinibacillus aneurinilyticus* và các loài lân cận trong chi. Trong khi đó, hai chủng HG5.2 và HG5.6 có mức độ tương đồng cao ($\geq 99\%$) với các loài thuộc chi *Geobacillus*, đặc biệt gần với *Geobacillus toebii* và

Geobacillus vulcani, là các vi khuẩn ưa nhiệt thường gặp trong các môi trường địa nhiệt.

Các vi khuẩn thuộc hai chi này phân bố rộng trong tự nhiên, đặc biệt ở môi trường đất và môi trường địa nhiệt, với khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ và tham gia vào chu trình dinh dưỡng. Đáng chú ý, các loài thuộc chi *Geobacillus* có hệ enzyme bền nhiệt và khả năng chuyển hóa đa dạng [48,55], trong khi *Aneurinibacillus* có khả năng thích nghi với nhiều điều kiện môi trường khác nhau [56]. Những đặc điểm này cho thấy tiềm năng ứng dụng của các chủng vi khuẩn trong các quá trình sinh tổng hợp và công nghệ sinh học, bao gồm sản xuất PHA.

Mặc dù kết quả so sánh trình tự cho thấy mức độ tương đồng cao đến mức loài, gen 16S rRNA là vùng bảo tồn và có hạn chế trong việc phân biệt các loài có quan hệ phát sinh gần nhau, đặc biệt trong các chi như *Geobacillus* và *Aneurinibacillus*. Do đó, trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn chỉ được định danh ở mức chi nhằm đảm bảo độ tin cậy của kết luận. Các chủng HG2.3, HG5.2 và HG5.6 được đặt tên là *Aneurinibacillus* sp. HG2.3, *Geobacillus* sp. HG5.2 và *Geobacillus* sp. HG5.6.

3.4. Đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của các chủng vi khuẩn *Aneurinibacillus* sp. HG2.3, *Geobacillus* sp. HG5.2 và *Geobacillus* sp. HG5.6 được đánh giá trong môi trường khoáng bổ sung glucose làm nguồn carbon và peptone làm nguồn nitơ, ở điều kiện nuôi cấy 45 °C, pH 7 trong 72 giờ. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Sinh khối khô và hàm lượng PHA thu nhận được sau quá trình lên men 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn.

Chủng	Sinh khối khô (g/L)	PHA (g/L)	PHA (% DCW)
HG2.3	1,561 ± 0,08	0,376 ± 0,02	24,09 ± 1,78
HG5.2	1,612 ± 0,06	0,303 ± 0,02	18,80 ± 1,43
HG5.6	1,734 ± 0,1	0,781 ± 0,04	45,04 ± 3,47

Kết quả ở Bảng 3.5 cho thấy cả ba chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA, tuy nhiên hiệu suất giữa các chủng có sự khác biệt rõ rệt. Trong đó, chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 đạt sinh khối khô cao nhất ($1,734 \pm 0,1$ g/L) và hàm lượng PHA lớn nhất ($0,781 \pm 0,04$ g/L), tương ứng với $45,04 \pm 3,47\%$ sinh khối khô. Hai chủng còn lại có hiệu suất tích lũy thấp hơn, với *Aneurinibacillus* sp. HG2.3 đạt $24,09 \pm 1,78\%$ và *Geobacillus* sp. HG5.2 đạt $18,80 \pm 1,43\%$. Điều này cho thấy khả năng sinh tổng hợp PHA có sự biến thiên đáng kể giữa các chủng, ngay cả khi được nuôi cấy trong cùng điều kiện. Đối với chủng *Aneurinibacillus* sp. HG2.3, hàm lượng PHA đạt 24,09% sinh khối khô phản ánh mức tích lũy trung bình so với các công bố trước đây. Cụ thể, chủng *Aneurinibacillus* sp. H1 được báo cáo có thể tích lũy PHA lên tới 55,31% sinh khối khô và đạt 2,03 g/L trong điều kiện nuôi cấy tối ưu ở 45 °C [57]. So với kết quả này, hiệu suất của *Aneurinibacillus* sp. HG2.3 thấp hơn đáng kể, điều này có thể liên quan đến điều kiện nuôi cấy chưa được tối ưu cũng như sự khác biệt đặc hiệu giữa các chủng trong cùng một chi. Trong khi đó, chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 thể hiện khả năng tích lũy PHA ở mức tương đối cao (45,04%), tương đương với mức tích lũy khoảng 46% sinh khối khô đã được ghi nhận ở một số vi khuẩn ưa nhiệt phân lập từ môi trường tự nhiên [58]. Kết quả này cho thấy *Geobacillus* sp. HG5.6 là chủng có tiềm năng đáng chú ý trong sinh tổng hợp PHA. Đáng lưu ý, khả năng tích lũy PHA không phải là đặc điểm phổ biến ở tất cả các vi khuẩn ưa nhiệt, và các báo cáo về nhóm vi khuẩn này vẫn còn tương đối hạn chế so với các vi khuẩn ưa ấm [59]. Nhìn chung, các kết quả thu được phù hợp với xu hướng chung ở vi khuẩn ưa nhiệt, trong đó khả năng tích lũy PHA phụ thuộc mạnh vào đặc điểm sinh lý của từng chủng cũng như điều kiện nuôi cấy. Điều này cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập từ suối nước nóng Quảng Nguyên, đặc biệt là *Geobacillus* sp. HG5.6, có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất PHA và cần được tiếp tục tối ưu hóa điều kiện lên men nhằm nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp.

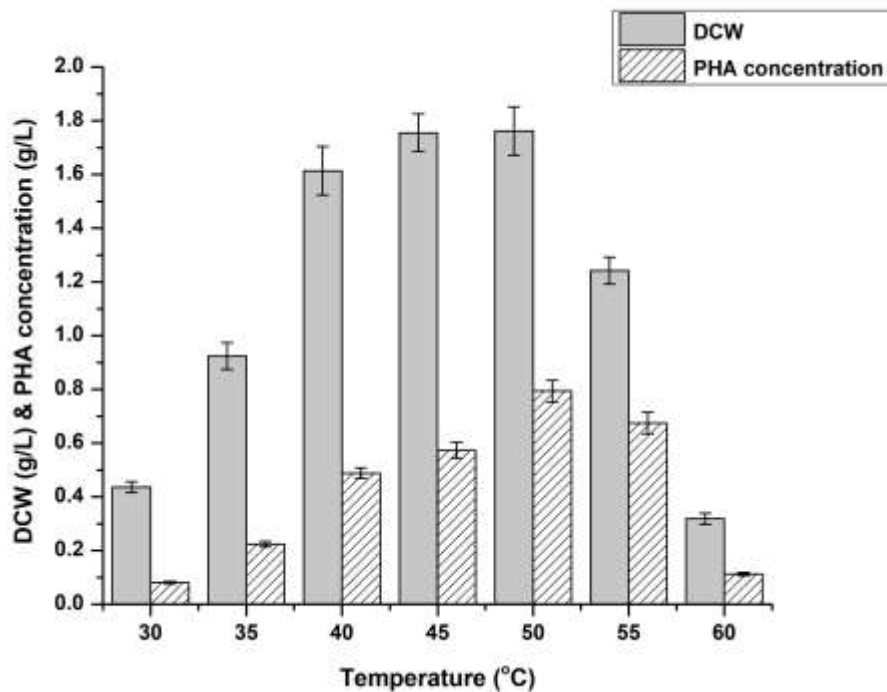
3.5. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6

Trên cơ sở kết quả đánh giá ban đầu, chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo do thể hiện khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA

vượt trội so với các chủng còn lại. Tuy nhiên, hiệu suất sinh tổng hợp PHA của vi khuẩn phụ thuộc mạnh vào các yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy, bao gồm nguồn dinh dưỡng (nguồn carbon, nguồn nitơ) và các thông số vật lý như nhiệt độ, pH và nồng độ muối. Do đó, việc khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy là cần thiết nhằm xác định các yếu tố phù hợp cho sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng HG5.6.

3.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật, đặc biệt đối với các vi khuẩn ưa nhiệt như *Geobacillus*. Sự thay đổi nhiệt độ có thể ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme, tốc độ sinh trưởng cũng như quá trình tích lũy PHA trong tế bào. Trong nghiên cứu này, chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được nuôi cấy trong môi trường khoáng với nguồn carbon là glucose, nguồn nitơ là peptone, pH 7, lắc 200 rpm trong 72 giờ.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

Kết quả ở Hình 3.7 cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6. Khi nhiệt độ tăng từ 30 lên 50 °C, sinh khối khô (DCW) tăng mạnh từ 0,436 g/L lên 1,762 g/L, đồng thời hàm lượng PHA (g/L) cũng tăng từ 0,081 lên 0,794 g/L. Khi nhiệt độ tiếp tục tăng lên 55 °C, mặc dù sinh khối giảm xuống còn 1,242 g/L, hàm lượng PHA vẫn duy trì ở mức cao (0,685 g/L). Tuy nhiên, ở 60 °C, cả sinh trưởng (0,319 g/L) và lượng PHA (0,113 g/L) đều giảm mạnh, cho thấy ảnh hưởng bất lợi của nhiệt độ cao đến hoạt động sinh lý của tế bào.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

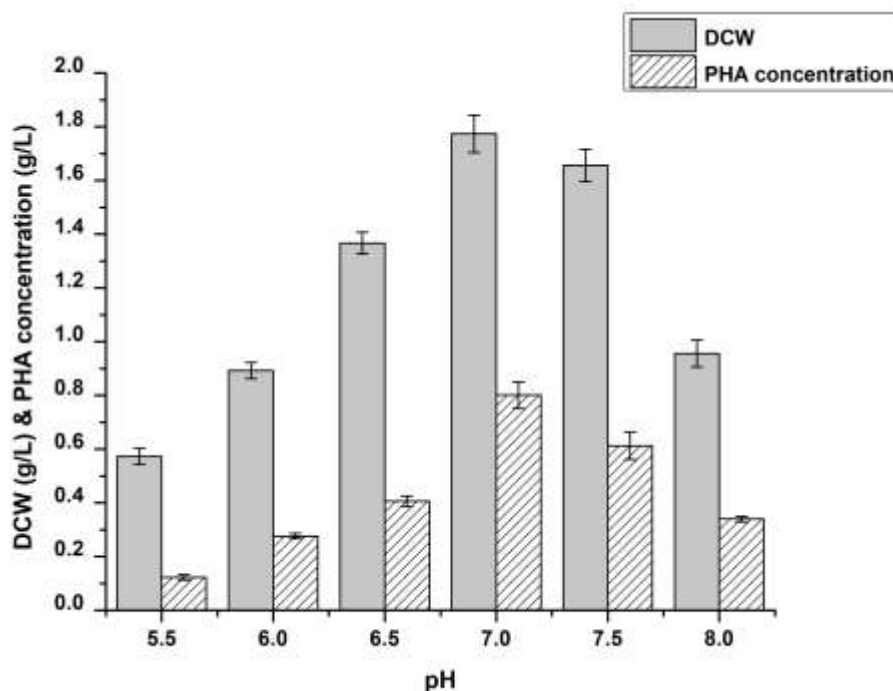
Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng PHA (% DCW)	Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng PHA (% DCW)
30	18,58 ± 1,47	50	45,06 ± 3,23
35	24,24 ± 1,72	55	55,15 ± 2,9
40	30,24 ± 2,09	60	35,42 ± 2,91
45	32,65 ± 2,14		

Xét về hàm lượng PHA (% DCW), giá trị này tăng dần từ 18,58 ± 1,47% (30 °C) lên cực đại 55,15 ± 2,9% (55 °C), sau đó giảm xuống 35,42 ± 2,91% tại 60 °C. Xu hướng này cho thấy ở nhiệt độ cao, mặc dù sinh trưởng có thể bị hạn chế, tế bào lại có xu hướng tích lũy PHA nhiều hơn như một dạng chất dự trữ nội bào. Đây là hiện tượng thường gặp ở vi sinh vật khi chịu điều kiện stress, trong đó dòng carbon được chuyển hướng từ sinh trưởng sang tích lũy polymer. Ở các nhiệt độ thấp (30–35 °C), cả sinh trưởng và tích lũy PHA đều thấp, phản ánh điều kiện chưa phù hợp với đặc tính sinh lý của vi khuẩn ưa nhiệt. Khi nhiệt độ tăng lên 40–50 °C, sinh trưởng và tích lũy PHA đều được cải thiện rõ rệt, phù hợp với khoảng nhiệt độ sinh trưởng tối ưu của các loài thuộc chi *Geobacillus*, thường nằm trong khoảng 45–60 °C [48]. Điều này cho thấy hoạt tính enzyme và quá trình trao đổi chất trong tế bào được thúc đẩy mạnh trong khoảng nhiệt độ này. So sánh với các công bố trước đây, mức tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 (45–55% DCW) nằm trong khoảng giá trị đã được ghi nhận ở các vi khuẩn ưa nhiệt. Cụ thể, một số chủng vi

khuẩn ưa nhiệt có thể tích lũy khoảng 46% PHA [58], trong khi chủng *Aneurinibacillus* sp. H1 có thể đạt tới 55,31% sinh khối khô tại nhiệt độ tối ưu 45 °C [57]. Như vậy, khả năng tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 là tương đương với các chủng đã được công bố. Sự gia tăng hàm lượng PHA ở 55 °C trong khi sinh khối giảm cho thấy sự phân bố lại dòng carbon trong tế bào, khi điều kiện trở nên kém thuận lợi cho sinh trưởng nhưng vẫn kích thích tích lũy chất dự trữ. Hiện tượng này đã được ghi nhận ở các vi khuẩn ưa nhiệt và được giải thích bởi cơ chế thích nghi với stress môi trường [59]. Tuy nhiên, khi nhiệt độ vượt quá ngưỡng thích hợp (60°C), cả sinh trưởng và tích lũy PHA đều suy giảm mạnh do ảnh hưởng tiêu cực đến cấu trúc protein và hoạt tính enzyme. Nhìn chung, kết quả cho thấy khoảng nhiệt độ 50 - 55 °C là phù hợp cho tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6. Trong đó, 50 °C có thể được xem là điều kiện tối ưu cân bằng giữa sinh trưởng và tích lũy PHA, trong khi 55 °C cho hàm lượng PHA cao nhất nhưng đi kèm với sự suy giảm sinh trưởng. Đây là cơ sở quan trọng cho việc lựa chọn điều kiện nuôi cấy trong các nghiên cứu tối ưu hóa tiếp theo.

3.5.2. Ảnh hưởng của pH ban đầu

Chỉ số pH môi trường nuôi cấy ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật thông qua việc tác động đến cấu trúc và hoạt tính của enzyme cũng như khả năng vận chuyển các chất qua màng tế bào. Sự thay đổi pH có thể làm thay đổi cân bằng nội bào và ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp PHA. Trong nghiên cứu này, chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được nuôi cấy trong môi trường khoáng với nguồn carbon là glucose, nguồn nitơ là peptone, ở nhiệt độ 50 °C, lắc 200 rpm trong 72 giờ, trong khi pH ban đầu được điều chỉnh ở các mức khác nhau. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.8 và Bảng 3.7.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

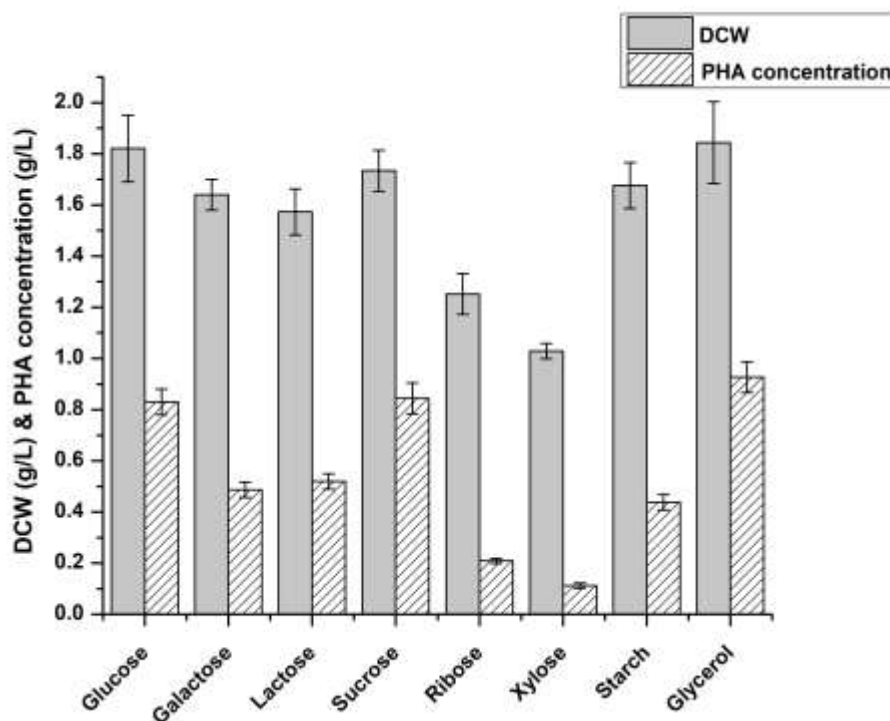
pH	Hàm lượng PHA (% DCW)	pH	Hàm lượng PHA (% DCW)
5,5	21,47 ± 2,02	7	45,15 ± 3,32
6	30,94 ± 1,66	7,5	36,96 ± 3,31
6,5	29,70 ± 1,86	8	28,24 ± 2,02

Kết quả thu nhận được cho thấy pH môi trường có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6. Khi pH tăng từ 5,5 lên 7, sinh khối khô (DCW) tăng từ 0,573 g/L lên giá trị cao nhất 1,774 g/L, đồng thời hàm lượng PHA (g/L) cũng tăng từ 0,123 lên 0,801 g/L. Khi pH tiếp tục tăng lên 7,5 và 8, cả sinh trưởng và lượng PHA đều giảm, với DCW lần lượt là 1,656 và 0,956 g/L, trong khi hàm lượng PHA giảm xuống 0,612 và 0,340 g/L, cho thấy môi trường lệch khỏi pH tối ưu bắt đầu ảnh hưởng bất lợi đến hoạt động sinh lý

của tế bào. Xét về hàm lượng PHA (% DCW), giá trị này tăng từ $21,47 \pm 2,02\%$ (pH 5,5) lên cực đại $45,15 \pm 3,32\%$ tại pH 7, sau đó giảm xuống $36,96 \pm 3,31\%$ (pH 7,5) và $28,24 \pm 2,02\%$ (pH 8). Xu hướng này cho thấy pH trung tính là điều kiện thuận lợi nhất cho cả sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng nghiên cứu. Ở pH thấp, sự tích lũy PHA bị hạn chế, có thể do ảnh hưởng của môi trường acid đến cấu trúc và hoạt tính enzyme cũng như cân bằng nội bào. Ngược lại, ở pH cao, mặc dù tế bào vẫn có khả năng sinh trưởng, hiệu suất tích lũy PHA giảm, phản ánh sự mất cân bằng trong quá trình chuyển hóa carbon. Kết quả này phù hợp với các công bố trước đây, trong đó pH tối ưu cho sinh trưởng và tích lũy PHA của nhiều vi khuẩn ưa nhiệt thường nằm trong khoảng trung tính hoặc hơi kiềm nhẹ. Cụ thể, chủng *Aneurinibacillus* sp. H1 được báo cáo có khả năng tích lũy PHA cao trong khoảng pH gần trung tính [57]. Ngoài ra, các nghiên cứu cũng cho thấy pH là yếu tố quan trọng chi phối hoạt động enzyme và sự phân bố dòng carbon giữa sinh trưởng và tích lũy PHA trong tế bào [59]. Đáng chú ý, khu vực suối nước nóng Quảng Nguyên thuộc vùng địa chất karst đá vôi đặc trưng của Hà Giang, nơi các quá trình hòa tan CaCO_3 thường tạo ra môi trường nước có xu hướng trung tính đến kiềm nhẹ. Điều kiện địa chất này có thể góp phần định hình môi trường sinh thái vi sinh vật. Điều này phần nào phù hợp với kết quả thu được, khi chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 thể hiện khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA tối ưu ở pH gần trung tính.

3.5.3 Ảnh hưởng của nguồn carbon

Nguồn carbon đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHA của vi sinh vật, do vừa là nguồn cung cấp năng lượng vừa là nguyên liệu trực tiếp cho quá trình tổng hợp polymer nội bào. Loại và khả năng sử dụng nguồn carbon có thể ảnh hưởng đáng kể đến sinh khối, hiệu suất tích lũy PHA cũng như cấu trúc polymer được tạo thành. Chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được nuôi cấy trong môi trường khoáng với nguồn nitơ là peptone, ở nhiệt độ $50\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7, lắc 200 rpm trong 72 giờ, trong khi các nguồn carbon khác nhau được sử dụng nhằm đánh giá ảnh hưởng đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến hàm lượng PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

Nguồn carbon	Hàm lượng PHA (% DCW)	Nguồn carbon	Hàm lượng PHA (% DCW)
Glucose	45,57 ± 3,58	Ribose	16,69 ± 1,77
Galactose	29,70 ± 2,27	Xylose	10,88 ± 1,11
Lactose	33,06 ± 2,57	Tinh bột	26,13 ± 2,15
Sucrose	48,67 ± 4,22	Glycerol	50,27 ± 4,30

Kết quả ở Hình 3.9 và Bảng 3.8 cho thấy nguồn carbon có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6. Nhìn chung, các nguồn carbon khác nhau dẫn đến sự khác biệt đáng kể về sinh khối và hiệu suất tích lũy PHA. Trong đó, glycerol cho kết quả cao nhất với hàm lượng PHA đạt $50,27 \pm 4,30\%$ DCW, đồng thời sinh khối cũng đạt giá trị cao (1,844 g/L).

Tiếp theo là sucrose ($48,67 \pm 4,22\%$) và glucose ($45,57 \pm 3,58\%$), cho thấy đây là các nguồn carbon thuận lợi cho quá trình sinh tổng hợp PHA của chủng nghiên cứu.

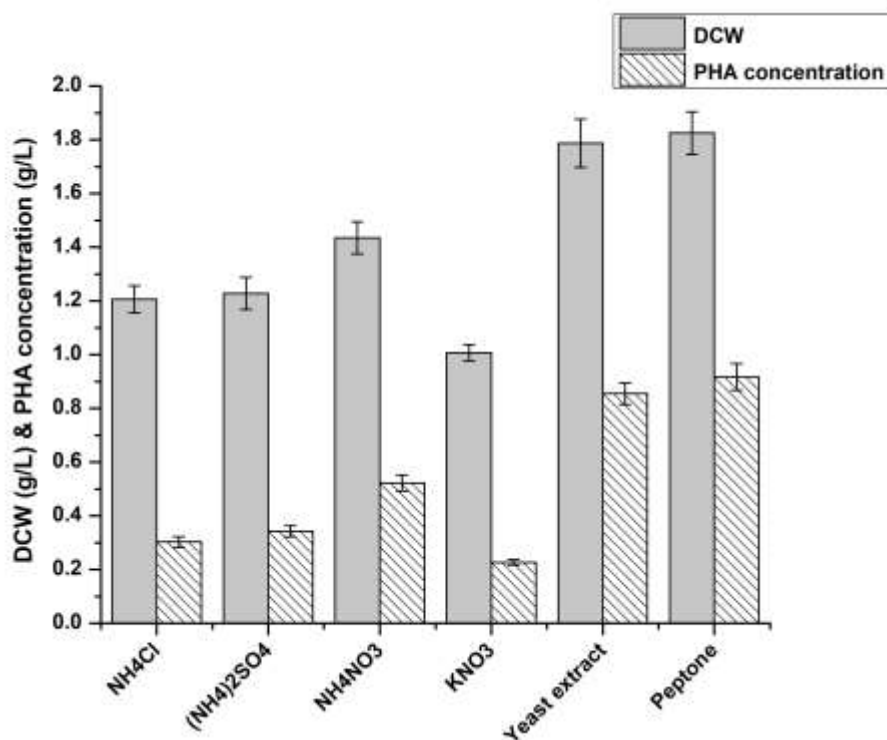
Xét theo bản chất cấu tạo, các nguồn carbon được khảo sát có thể chia thành các nhóm chính gồm: (i) đường đơn C6 (glucose, galactose), (ii) đường đôi (sucrose, lactose), (iii) đường C5 (ribose, xylose), (iv) polysaccharide (tinh bột) và (v) hợp chất không phải đường (glycerol). Kết quả cho thấy các nguồn carbon thuộc nhóm C6 và glycerol cho hiệu suất tích lũy PHA cao hơn rõ rệt so với nhóm C5. Cụ thể, glucose cho hiệu suất tích lũy PHA cao do được chuyển hóa trực tiếp qua con đường đường phân để tạo acetyl-CoA – tiền chất chính cho sinh tổng hợp PHA. Trong khi đó, galactose cho hiệu suất thấp hơn ($29,70 \pm 2,27\%$), có thể do phải chuyển hóa qua con đường Leloir trước khi đi vào glycolysis, làm giảm hiệu quả sử dụng cơ chất. Đối với các đường đôi, sucrose cho hiệu suất tích lũy PHA cao ($48,67\%$), trong khi lactose thấp hơn ($33,06\%$). Điều này cho thấy chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 có khả năng sử dụng sucrose hiệu quả, có thể liên quan đến sự hiện diện của enzyme thủy phân sucrose (invertase/sucrase), trong khi khả năng thủy phân lactose (cần β -galactosidase) có thể hạn chế hơn. Đối với tinh bột, mặc dù là polysaccharide, chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 vẫn có khả năng sử dụng với mức tích lũy PHA trung bình ($26,13 \pm 2,15\%$), cho thấy khả năng tiết enzyme phân giải tinh bột, tuy nhiên hiệu quả không cao bằng các nguồn carbon đơn giản. Đáng chú ý, các nguồn carbon C5 như ribose và xylose cho hiệu suất tích lũy PHA thấp (lần lượt $16,69 \pm 1,77\%$ và $10,88 \pm 1,11\%$). Điều này có thể do các đường pentose đi vào con đường pentose phosphate và cần nhiều bước chuyển hóa trước khi tạo thành acetyl-CoA, làm giảm hiệu quả sinh tổng hợp PHA. Tuy nhiên, chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 vẫn thể hiện khả năng sử dụng các cơ chất này ở mức nhất định, cho thấy tiềm năng khai thác các nguồn nguyên liệu lignocellulose – trong đó xylose là thành phần chính của hemicellulose. Mặc dù hiệu suất còn thấp, kết quả này mở ra khả năng định hướng nghiên cứu theo hướng tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy hoặc cải tiến con đường chuyển hóa nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng các cơ chất giá rẻ và bền vững.

Glycerol là nguồn carbon cho hiệu suất tích lũy PHA cao nhất trong nghiên cứu này, có thể do được chuyển hóa trực tiếp thành glycerol-3-phosphate và sau đó

đi vào glycolysis dưới dạng dihydroxyacetone phosphate (DHAP), từ đó nhanh chóng tạo acetyl-CoA. Điều này phù hợp với cơ chế sinh tổng hợp PHA nội bào, trong đó acetyl-CoA được chuyển hóa qua các enzyme β -ketothiolase (PhaA), acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) và PHA synthase (PhaC) để hình thành polymer [60]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng cho thấy hiệu quả sinh tổng hợp PHA phụ thuộc mạnh vào loại cơ chất và con đường chuyển hóa tương ứng [61]. Nhìn chung, kết quả cho thấy các nguồn carbon dễ chuyển hóa thành acetyl-CoA như glycerol và glucose là phù hợp nhất cho sinh tổng hợp PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6, trong khi các nguồn C5 kém hiệu quả hơn nhưng vẫn có ý nghĩa trong định hướng ứng dụng lâu dài. Những kết quả này cung cấp cơ sở quan trọng cho việc lựa chọn nguồn carbon thích hợp cũng như định hướng khai thác các nguồn nguyên liệu thay thế trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.5.4 Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Nguồn nitơ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh trưởng và quá trình sinh tổng hợp PHA của vi sinh vật, do tham gia trực tiếp vào quá trình tổng hợp protein, enzyme và các thành phần cấu trúc tế bào. Đặc biệt, sự hạn chế nitơ trong môi trường nuôi cấy được xem là một trong những điều kiện kích thích tích lũy PHA, khi tế bào chuyển hướng dòng carbon từ sinh trưởng sang tích lũy polymer nội bào. Trong nghiên cứu này, chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được nuôi cấy trong môi trường khoáng với glycerol là nguồn carbon, ở nhiệt độ 50 °C, pH 7, lắc 200 rpm trong 72 giờ, trong khi các nguồn nitơ khác nhau được sử dụng nhằm đánh giá ảnh hưởng đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA của chủng nghiên cứu.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hàm lượng PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

Nguồn nitơ	Hàm lượng PHA (% DCW)	Nguồn nitơ	Hàm lượng PHA (% DCW)
NH ₄ Cl	25,12 ± 2,41	KNO ₃	22,54 ± 2,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	27,93 ± 2,46	Cao nấm men	47,84 ± 3,74
NH ₄ NO ₃	36,38 ± 2,73	Peptone	50,25 ± 4,03

Kết quả ở Hình 3.10 và Bảng 3.8 cho thấy nguồn nitơ có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6. Nhìn chung, các nguồn nitơ khác nhau dẫn đến sự khác biệt đáng kể về hiệu suất tích lũy PHA, trong đó nhóm nitơ hữu cơ như peptone (50,25 ± 4,03%) và cao nấm men (47,84 ± 3,74%) cho giá trị cao nhất, đồng thời cũng tương ứng với sinh khối cao. Ngược lại, các nguồn nitơ vô cơ cho hiệu suất thấp hơn, dao động trong khoảng 22–36% DCW.

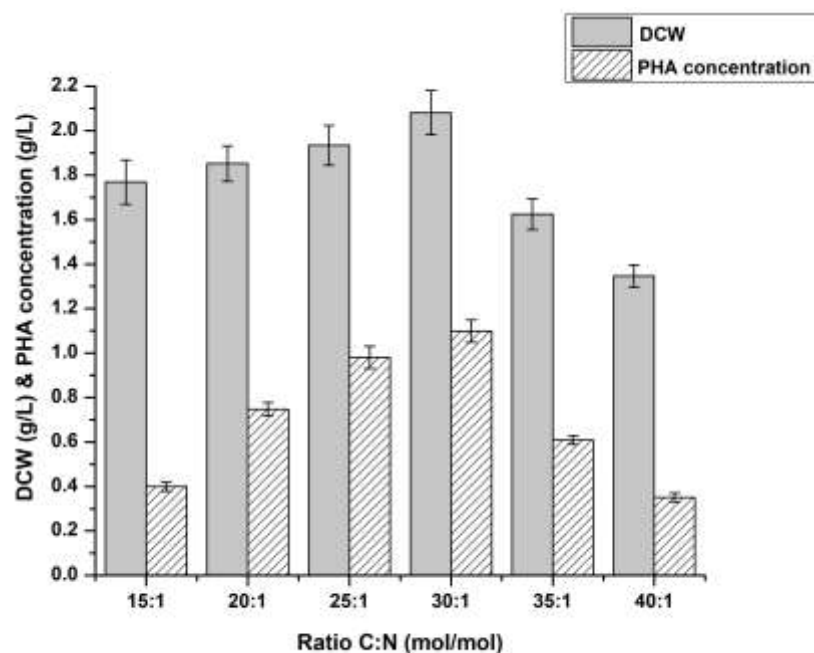
Nhóm nitơ hữu cơ cho hiệu suất tích lũy PHA cao hơn rõ rệt so với nhóm vô cơ. Điều này có thể được giải thích do các nguồn nitơ hữu cơ không chỉ cung cấp nitơ dưới dạng dễ hấp thu mà còn bổ sung amino acid, peptide, vitamin và các yếu tố tăng trưởng, từ đó thúc đẩy sinh trưởng tế bào và ảnh hưởng đến khả năng tích lũy PHA [60,61]. Xu hướng này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên vi khuẩn ưa nhiệt, trong đó các nguồn nitơ hữu cơ thường cho hiệu suất tích lũy PHA cao hơn so với nguồn vô cơ [57].

Đối với nhóm nitơ vô cơ, NH_4NO_3 cho hiệu suất tích lũy PHA cao nhất ($36,38 \pm 2,73\%$), cao hơn so với NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và KNO_3 . Sự khác biệt này có thể liên quan đến dạng tồn tại và cơ chế đồng hóa nitơ trong tế bào. NH_4NO_3 cung cấp đồng thời hai dạng nitơ là NH_4^+ (dạng khử, dễ đồng hóa) và NO_3^- (dạng oxy hóa), giúp tế bào linh hoạt trong quá trình hấp thu và điều hòa trao đổi chất. Quá trình khử NO_3^- về NH_4^+ tiêu tốn năng lượng và có thể tạo ra trạng thái “thiếu nitơ tương đối”, từ đó kích thích quá trình tích lũy PHA. Ngược lại, các muối amoni như NH_4Cl hoặc $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cung cấp nitơ ở dạng dễ sử dụng, có xu hướng thúc đẩy sinh trưởng hơn là tích lũy PHA, dẫn đến hiệu suất PHA thấp hơn. KNO_3 cho hiệu suất tích lũy thấp nhất ($22,54 \pm 2,01\%$), có thể do tế bào phải tiêu tốn nhiều năng lượng để khử NO_3^- trước khi sử dụng, làm giảm hiệu quả chuyển hóa carbon sang PHA. Điều này phản ánh vai trò quan trọng của cân bằng năng lượng nội bào trong quá trình sinh tổng hợp polymer.

Mặc dù theo cơ chế chung, sự hạn chế nitơ là yếu tố kích thích tích lũy PHA, kết quả nghiên cứu cho thấy các nguồn nitơ hữu cơ vẫn cho hiệu suất cao nhất. Điều này cho thấy trong điều kiện thí nghiệm, việc đảm bảo sinh trưởng tốt và cung cấp đầy đủ enzyme cho quá trình chuyển hóa có thể đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao tổng lượng PHA tích lũy. Hiện tượng này cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu về sinh tổng hợp PHA, trong đó hiệu suất tích lũy phụ thuộc vào sự cân bằng giữa nguồn carbon, nitơ và trạng thái sinh lý của tế bào [59,61]. Tóm lại, peptone và cao nấm men là các nguồn nitơ phù hợp nhất cho sinh tổng hợp PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6, trong khi NH_4NO_3 là nguồn nitơ vô cơ hiệu quả nhất.

3.5.5 Ảnh hưởng của tỷ lệ C:N

Tỷ lệ carbon/nitơ (C:N) là một trong những yếu tố quan trọng nhất chi phối quá trình sinh trưởng và tích lũy PHA của vi sinh vật, do phản ánh sự cân bằng giữa nguồn carbon và nitơ trong môi trường nuôi cấy. Trong điều kiện carbon dư và nitơ hạn chế, tế bào có xu hướng chuyển hướng dòng carbon từ sinh trưởng sang tích lũy các hợp chất dự trữ nội bào như PHA. Chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được nuôi cấy trong điều kiện phù hợp với glycerol là nguồn carbon, peptone là nguồn nitơ, ở nhiệt độ 50 °C, pH 7, lắc 200 rpm trong 72 giờ, trong khi tỷ lệ C:N được điều chỉnh ở các mức khác nhau nhằm đánh giá ảnh hưởng đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA của chủng nghiên cứu.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của tỷ lệ C/N đến sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của tỷ lệ C/N đến hàm lượng PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

Tỷ lệ C:N (mol/mol)	Hàm lượng PHA (% DCW)	Tỷ lệ C:N (mol/mol)	Hàm lượng PHA (% DCW)
15:1	22,56 ± 1,64	30:1	52,82 ± 3,05

20:1	40,44 ± 2,46	35:1	37,48 ± 2,17
25:1	50,72 ± 3,33	40:1	26,06 ± 2,02

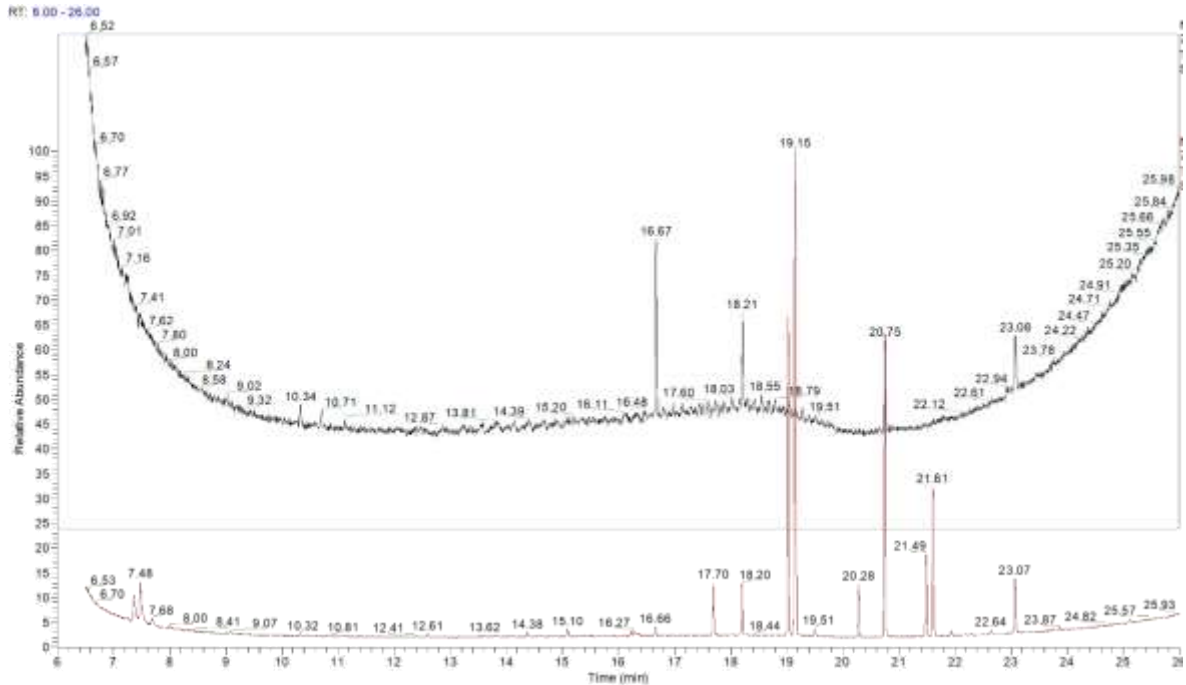
Kết quả ở Hình 3.11 và Bảng 3.9 cho thấy tỷ lệ C:N có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6. Khi tăng tỷ lệ C:N từ 15:1 lên 30:1, hàm lượng PHA tăng mạnh từ 22,56 ± 1,64 % lên giá trị cao nhất 52,82 ± 3,05%, đồng thời sinh khối cũng đạt mức cao (2,081 g/L tại 30:1). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tỷ lệ C:N lên 35:1 và 40:1, hàm lượng PHA giảm đáng kể xuống còn lần lượt 37,48 ± 2,17 % và 26,06 ± 2,02 %, kèm theo sự suy giảm sinh khối. Điều này cho thấy tồn tại một khoảng tỷ lệ C:N tối ưu trong khoảng 25:1–30:1 cho cả sinh trưởng và tích lũy PHA.

Xu hướng này phản ánh vai trò điều hòa của tỷ lệ C:N đối với sự phân bố dòng carbon trong tế bào. Ở tỷ lệ C:N thấp (15:1), nguồn nitơ dồi dào thúc đẩy sinh trưởng tế bào, khiến carbon chủ yếu được sử dụng cho tổng hợp sinh khối, dẫn đến hàm lượng PHA thấp. Khi tăng tỷ lệ C:N, sự hạn chế nitơ dần xuất hiện, tạo điều kiện cho việc chuyển hướng dòng carbon sang con đường tích lũy PHA như một dạng dự trữ nội bào. Cơ chế này đã được ghi nhận rộng rãi trong các nghiên cứu về PHA [62,63]. Ở tỷ lệ C:N cao ($\geq 35:1$), mặc dù điều kiện thiếu nitơ được tăng cường, nhưng sự thiếu hụt này trở nên quá mức, làm hạn chế tổng hợp enzyme và các cấu phần thiết yếu cho sinh trưởng, dẫn đến giảm sinh khối và kéo theo giảm tích lũy PHA. Ngoài ra, nồng độ carbon cao trong điều kiện này có thể gây ức chế trao đổi chất hoặc làm thay đổi hướng phân bố carbon trong tế bào, làm giảm hiệu quả chuyển hóa thành PHA [62]. Nhìn chung, tỷ lệ C:N 30:1 được xác định là điều kiện tối ưu cho sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 trong điều kiện thí nghiệm, phù hợp với xu hướng đã được ghi nhận trong các hệ vi sinh vật sản xuất PHA, nơi tỷ lệ C:N trung bình thường cho hiệu suất tích lũy cao nhất [63].

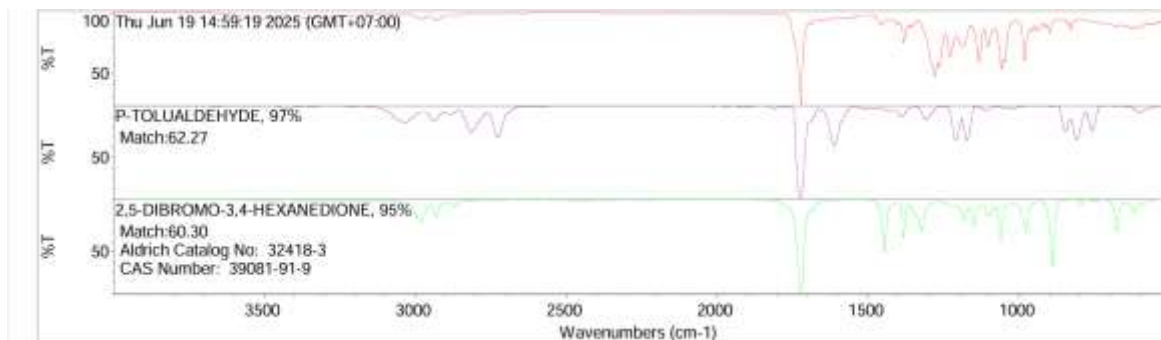
3.6 Phân tích thành phần của PHA thu nhận từ chủng *Geobacillus* sp. HG5.6

Sau khi xác định được các điều kiện nuôi cấy tối ưu, PHA thu nhận từ chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được tiến hành phân tích nhằm xác định thành phần và đặc điểm hóa học của polymer. Mẫu PHA được xử lý bằng quá trình phân giải bằng

methanol để phân tích bằng GC–MS/MS xác định thành phần monomer, đồng thời sử dụng phổ FTIR để nhận diện các nhóm chức đặc trưng của polymer. Kết quả được trình bày trong Hình 3.12 và Hình 3.13.



Hình 3.12. Sắc ký đồ GC–MS/MS của PHB chuẩn (Sigma Aldrich) (phía trên) và PHA thu nhận từ chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 sau quá trình methanolysis.



Hình 3.13. Phổ FTIR của PHA thu nhận từ chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

Kết quả phân tích GC–MS/MS (Hình 3.12) cho thấy sắc ký đồ của mẫu PHA thu nhận từ chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 có sự tương đồng cao với sắc ký đồ của PHB chuẩn (Sigma Aldrich). Các peak đặc trưng xuất hiện trong khoảng thời gian lưu tương tự giữa mẫu và chất chuẩn, đặc biệt tập trung trong vùng 16–22 phút, cho thấy sự hiện diện của các methyl ester thu được sau quá trình phân giải bằng

methanol của polymer. Sự trùng khớp về vị trí và phân bố các peak giữa mẫu và PHB chuẩn là bằng chứng quan trọng chứng minh rằng polymer do chủng HG5.6 tổng hợp chủ yếu là poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). Bên cạnh đó, không quan sát thấy sự xuất hiện rõ rệt của các peak đặc trưng cho các monomer khác như 3-hydroxyvalerate (3HV), cho thấy polymer thu nhận có thành phần tương đối đồng nhất, chủ yếu là PHB. Kết quả này phù hợp với điều kiện nuôi cấy sử dụng nguồn carbon glycerol, vốn thường ưu tiên hình thành đơn vị 3HB trong quá trình sinh tổng hợp PHA.

Kết quả phân tích FTIR (Hình 3.13) tiếp tục củng cố nhận định trên. Phổ FTIR của mẫu PHA thể hiện các dải hấp thụ đặc trưng của polyester, trong đó nổi bật là peak mạnh tại khoảng $1720\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$, đặc trưng cho dao động kéo giãn của nhóm carbonyl (C=O) trong liên kết ester. Ngoài ra, các peak trong vùng $1270\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$ và $1050\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với dao động của liên kết C–O–C, cùng với các peak ở vùng $2850\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động của liên kết C–H aliphatic. Những đặc điểm này là dấu hiệu điển hình của polymer thuộc nhóm polyhydroxyalkanoate.

Mặc dù kết quả so sánh với thư viện phổ FTIR cho thấy mức độ tương đồng với một số hợp chất hữu cơ khác, điều này là do hạn chế của phương pháp FTIR trong việc định danh chính xác hợp chất dựa trên thư viện. Tuy nhiên, dựa trên các peak đặc trưng của nhóm chức ester cùng với kết quả GC–MS/MS, có thể khẳng định polymer thu nhận từ chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 là PHA, với thành phần chủ yếu là PHB. Như vậy, sự kết hợp giữa hai phương pháp GC–MS/MS và FTIR đã cung cấp bằng chứng bổ sung lẫn nhau, cho phép xác định tương đối chính xác bản chất hóa học của polymer sinh tổng hợp, đồng thời khẳng định tiềm năng của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 trong việc sản xuất PHB.

KẾT LUẬN

- Từ các mẫu nước và bùn tại suối nước nóng Quảng Nguyên, đã phân lập được tổng cộng 20 chủng vi khuẩn hiếu khí. Các mẫu bùn có số lượng chủng cao hơn mẫu nước, cung cấp nguồn vi sinh vật cho quá trình sàng lọc các chủng có khả năng tích lũy PHA.

- Từ tập hợp các chủng phân lập, bằng các phương pháp sàng lọc kết hợp gồm nhuộm Sudan Black B, nhuộm Nile Blue A và quan sát bằng TEM, đã tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn có khả năng tích lũy PHA là HG2.3, HG5.2 và HG5.6.

- Đã nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của 3 chủng vi khuẩn được tuyển chọn. Kết hợp với phân tích trình tự gen 16S rRNA, các chủng được xác định thuộc hai chi *Aneurinibacillus* (HG2.3) và *Geobacillus* (HG5.2, HG5.6).

- Đã đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy PHA của ba chủng tuyển chọn, trong đó chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 cho hiệu suất cao nhất với sinh khối khô đạt 1,734 g/L, hàm lượng PHA 0,781 g/L và 45,04% DCW, và được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

- Đã xác định được các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6, bao gồm: nhiệt độ 50–55 °C, pH ban đầu 7,0, sử dụng glycerol làm nguồn carbon, peptone làm nguồn nitơ và tỷ lệ C/N khoảng 30:1. Ở điều kiện này, chủng đạt sinh khối khô khoảng 2,08 g/L, hàm lượng PHA khoảng 1,10 g/L và 52,82% DCW.

- PHA thu nhận từ chủng *Geobacillus* sp. HG5.6 được xác định có thành phần chủ yếu là poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) thông qua phân tích GC–MS/MS và FTIR, với các đặc trưng phổ phù hợp với PHB chuẩn.

KIẾN NGHỊ

- Cần tiếp tục tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nhằm nâng cao hiệu suất sinh trưởng và tích lũy PHA của chủng *Geobacillus* sp. HG5.6.

- Nghiên cứu mở rộng nguồn cơ chất, đặc biệt là các cơ chất khác nhau (ví dụ: acid béo, acid hữu cơ hoặc nguồn carbon từ lignocellulose), nhằm đánh giá khả năng hình thành các monomer khác ngoài 3HB (như 3HV, 4HB, HHx), qua đó định hướng tổng hợp các dạng PHA copolymer có tính chất vật liệu đa dạng hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zytner, P., Kumar, D., Elsayed, A., Mohanty, A., Ramarao, B. V., & Misra, M. (2023). A review on polyhydroxyalkanoate (PHA) production through the use of lignocellulosic biomass. *RSC Sustainability*, *1*(9), 2120–2134. <https://doi.org/10.1039/d3su00126a>
2. Paloyan, A., Tadevosyan, M., Ghevondyan, D., Khoyetsyan, L., Karapetyan, M., Margaryan, A., Antranikian, G., & Panosyan, H. (2025). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates: current state and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, *16*, 1542468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1542468>
3. Koller, M. (2018). Biodegradable and Biocompatible polyhydroxyalkanoates (PHA): auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Molecules*, *23*(2), 362. <https://doi.org/10.3390/molecules23020362>
4. Ibrahim, R., Aranjani, J. M., Prasanna, N., Biswas, A., & Gayam, P. K. R. (2025). Production, isolation, optimization, and characterization of microbial PHA from *Bacillus australimaris*. *Scientific Reports*, *15*(1), 8395. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-92146-x>
5. Sathiyarayanan, G., & Esteves, S. (2025). Autotrophic bacterial production of polyhydroxyalkanoates using carbon dioxide as a sustainable carbon source. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *13*, 1545438. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1545438>
6. Higuchi-Takeuchi, M., Morisaki, K., Toyooka, K., & Numata, K. (2016). Synthesis of High-Molecular-Weight polyhydroxyalkanoates by marine photosynthetic purple bacteria. *PLoS ONE*, *11*(8), e0160981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160981>
7. Naseem, A., Rasul, I., Raza, Z. A., Muneer, F., Rehman, A. U., & Nadeem, H. (2024). Bacterial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using various waste carbon sources. *PeerJ*, *12*, e17936. <https://doi.org/10.7717/peerj.17936>
8. Toàn, Đinh V., Harder, S., Bắc, T. V., Tuyên, Đoàn V., Phòng, L. H., Vũ, T. A., & Quang, N. T. H. (2012). KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CẤU TRÚC VỎ TRÁI ĐẤT BẰNG TÀI LIỆU SÓNG KHÚC XẠ CỦA HAI TUYẾN ĐỊA CHẤN DÒ SÂU Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM. *Vietnam Journal of Earth Sciences*, *33*(3), 538–548. <https://doi.org/10.15625/0866-7187/33/3/533>
9. Paduvari, R., & Somashekara, D. M. (2025). Advancements in genetic engineering for enhanced Polyhydroxyalkanoates (PHA) production: a comprehensive review of metabolic pathway manipulation and gene deletion strategies. *Bioengineered*, *16*(1), 2458363. <https://doi.org/10.1080/21655979.2025.2458363>

10. Afreen, R., Tyagi, S., Singh, G. P., & Singh, M. (2021). Challenges and Perspectives of Polyhydroxyalkanoate Production from Microalgae/Cyanobacteria and Bacteria as Microbial Factories: An Assessment of Hybrid Biological system. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 624885. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.624885>
11. Guzik, M., Witko, T., Steinbüchel, A., Wojnarowska, M., Sołtysik, M., & Wawak, S. (2020). What has been trending in the research of polyhydroxyalkanoates? A systematic review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 959. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00959>
12. Lalonde, J. N., Pilania, G., & Marrone, B. L. (2024). Materials designed to degrade: structure, properties, processing, and performance relationships in polyhydroxyalkanoate biopolymers. *Polymer Chemistry*, 16(3), 235–265. <https://doi.org/10.1039/d4py00623b>
13. Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *eXPRESS Polymer Letters*, 8(11), 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
14. Vigneswari, S., Noor, M. S. M., Amelia, T. S. M., Balakrishnan, K., Adnan, A., Bhubalan, K., Amirul, A. A., & Ramakrishna, S. (2021). Recent Advances in the Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates from Lignocellulosic Feedstocks. *Life*, 11(8), 807. <https://doi.org/10.3390/life11080807>
15. Behera, S., Priyadarshane, M., Vandana, & Das, S. (2022). Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications. *Chemosphere*, 294, 133723. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133723>
16. Hahn, T., Alzate, M. O., Leonhardt, S., Tamang, P., & Zibek, S. (2024). Current trends in medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: Microbial production, purification, and characterization. *Engineering in Life Sciences*, 24(6), 2300211. <https://doi.org/10.1002/elsc.202300211>
17. Phong, T. H., Thanh Nga, B. T., Thanh, P. D., & Thuợc, Đoàn V. (2015). Nghiên cứu sinh tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) của chủng vi khuẩn MT33 phân lập từ nước thải. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 53(4), 407. <https://doi.org/10.15625/0866-708X/53/4/5002>
18. Zhila, N. O., Sapozhnikova, K. Y., Kiselev, E. G., Nemtsev, I. V., Lukyanenko, A. V., Shishatskaya, E. I., & Volova, T. G. (2022). Biosynthesis and Properties of a P(3HB-co-3HV-co-4HV) Produced by *Cupriavidus necator* B-10646. *Polymers*, 14(19), 4226. <https://doi.org/10.3390/polym14194226>
19. Liu, Q., Zhang, H., Deng, B., & Zhao, X. (2014). Poly(3-hydroxybutyrate)

and poly(3-hydroxybutyrate-CO-3-hydroxyvalerate): structure, property, and fiber. *International Journal of Polymer Science*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/374368>

20. Mandragutti, T., Jarso, T. S., Godi, S., Begum, S. S., & K, B. (2024). Physicochemical characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by the rare halophile *Brachybacterium paraconglomeratum* MTCC 13074. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02324-1>

21. An, J., Ha, B., & Lee, S. K. (2023). Production of polyhydroxyalkanoates by the thermophile *Cupriavidus cauae* PHS1. *Bioresource Technology*, 371, 128627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128627>

22. Możejko-Ciesielska, J., Ray, S., & Sankhyan, S. (2023). Recent challenges and trends of polyhydroxyalkanoate production by extremophilic bacteria using renewable feedstocks. *Polymers*, 15(22), 4385. <https://doi.org/10.3390/polym15224385>

23. Pernicova, I., Novackova, I., Sedlacek, P., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalcik, A., Koller, M., Nebesarova, J., Krzyzanek, V., Hrubanova, K., Masilko, J., Slaninova, E., & Obruca, S. (2020). Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers*, 12(6), 1235. <https://doi.org/10.3390/polym12061235>

24. Xiao, Z., Zhang, Y., Xi, L., Huo, F., Zhao, J., & Li, J. (2015). Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology*, 55(9), 1125–1133. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400843>

25. Rodge, S. P., Shende, K. S., & Patil, N. P. (2023). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and optimisation of thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain K4E3_SPR_NPP. *Extremophiles*, 27(2), 13. <https://doi.org/10.1007/s00792-023-01300-8>

26. Musilova, J., Kourilova, X., Hermankova, K., Bezdicek, M., Ieremenko, A., Dvorak, P., Obruca, S., & Sedlar, K. (2023). Genomic and phenotypic comparison of polyhydroxyalkanoates producing strains of genus *Caldimonas* / *Schlegelella*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 5372–5381. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.10.051>

27. Riaz, S., Rhee, K. Y., & Park, S. J. (2021). Polyhydroxyalkanoates (PHAs): biopolymers for biofuel and biorefineries. *Polymers*, 13(2), 253. <https://doi.org/10.3390/polym13020253>

28. Vicente, D., Proença, D. N., & Morais, P. V. (2023). The role of Bacterial polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable future: A review on the biological

diversity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(4), 2959. <https://doi.org/10.3390/ijerph20042959>

29. Chek, M. F., Kim, S., Mori, T., Arsad, H., Samian, M. R., Sudesh, K., & Hakoshima, T. (2017). Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports*, 7(1), 5312. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05509-4>

30. Huỳnh Văn Hiếu*, Trần Hoàng Dũng, Lê Tuấn Lộc, Chung Anh Dũng, & Phạm Công Hoạt. (2016). Ảnh hưởng của rỉ đường lên sự tăng trưởng và tích lũy PHB của một số chủng vi khuẩn phân lập tại TP Hồ Chí Minh. *Bản B của Tạp Chí Khoa học Và Công nghệ Việt Nam*, 58(9). https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/article/view/426

31. Chen, G., Jiang, X., & Guo, Y. (2016). Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA). *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(4), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.09.006>

32. Tao, X., Liu, S., Lv, L., Sun, L., Zhang, G., Liang, J., & Zou, W. (2025). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production from volatile fatty acids derived from food waste fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1693596. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1693596>

33. Thur, N. T. T. (2023). NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA CHỦNG VI KHUẨN CHỊU MẶN SALINICOLA SP. TSLT21 PHÂN LẬP TỪ TRƯỜNG SA CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP POLYHYDROXYALKANOATE (PHA). *TNU Journal of Science and Technology*, 228(09), 292–300. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7468>

34. Bhubalan, K., Rathi, D., Abe, H., Iwata, T., & Sudesh, K. (2010). Improved synthesis of P(3HB-co-3HV-co-3HHx) terpolymers by mutant *Cupriavidus necator* using the PHA synthase gene of *Chromobacterium* sp. USM2 with high affinity towards 3HV. *Polymer Degradation and Stability*, 95(8), 1436–1442. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.12.018>

35. Zheng, X., Chacón, M., Allers, T., Dixon, N., & Winterburn, J. (2024). Enhanced 4-hydroxybutyrate incorporation into the PHA terpolymer of *Haloferax mediterranei* by heterologous expression of 4-hydroxybutyrate-CoA transferases/synthetases. *Biochemical Engineering Journal*, 212, 109498. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109498>

36. Pradhan, S., Khan, M. T., & Moholkar, V. S. (2024). Polyhydroxyalkanoates (PHAS): Mechanistic Insights and contributions to sustainable practices. *Encyclopedia*, 4(4), 1933–1947. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia4040126>

37. Lan, P. T., ChíNh, N. T., CúC, N. T. K., & Như, T. N. T. (2025). Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn ưa nhiệt từ suối nước nóng truong xuân có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase bên nhiệt. *Tạp Chí Khoa Học - Công Nghệ Thủy Sản Trường Đại Học Nha Trang*, 04, 064–076. <https://doi.org/10.53818/jfst.04.2025.602>

38. Thê Trang, N., Thị Đà, N., & Đình Mãn, T. (2017). NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ƯA NHIỆT SINH α -AMYLaza BÈN NHIỆT PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 50(2), 219. <https://doi.org/10.15625/0866-708X/50/2/9489>

39. Hartman TL., 1940, The use of Sudan black B as a bacterial fat stain, *Stain, Technol*, 15, pp. 23-28

40. Spiekermann, P., Rehm, B. H. A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., & Steinbüchel, A. (1999). A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*, 171(2), 73–80. <https://doi.org/10.1007/s002030050681>

41. Law, J. H., & Slepecky, R. A. (1961). ASSAY OF POLY-B-HYDROXYBUTYRIC ACID. *Journal of Bacteriology*, 82(1), 33–36. <https://doi.org/10.1128/jb.82.1.33-36.1961>

42. Duvigneau, S., Kettner, A., Carius, L., Griehl, C., Findeisen, R., & Kienle, A. (2021). Fast, inexpensive, and reliable HPLC method to determine monomer fractions in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), 4743–4749. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11265-3>

43. Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461–2470. <https://doi.org/10.1128/aem.02272-07>

44. Boublia, A., Lemaoui, T., AlYammahi, J., Darwish, A. S., Ahmad, A., Alam, M., Banat, F., Benguerba, Y., & AlNashef, I. M. (2022). Multitask neural network for mapping the glass transition and melting temperature space of homo- and Co-Polyhydroxyalkanoates using Σ Profiles molecular inputs. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 11(1), 208–227. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c05225>

45. McAdam, B., Fournet, M. B., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers*, 12(12), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>

46. Vigneswari, S., Chai, J. M., Shantini, K., Bhubalan, K., & Amirul, A. A. (2019). Designing novel interfaces via surface functionalization of Short-Chain-Length polyhydroxyalkanoates. *Advances in Polymer Technology*, 2019, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/3831251>

47. Belkova, N. L., Tazaki, K., Zakharova, J. R., & Parfenova, V. V. (2007). Activity of bacteria in water of hot springs from Southern and Central Kamchatskaya geothermal provinces, Kamchatka Peninsula, Russia. *Microbiological Research*, 162(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.01.006>

48. Zeikus, J. G. (1979). Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 1(4), 243–252. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(79\)90043-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(79)90043-7)
49. Inskeep, W. P., Jay, Z. J., Tringe, S. G., Herrgård, M. J., & Rusch, D. B. (2013). The YNP metagenome project: Environmental parameters responsible for microbial distribution in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 4, 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00067>
50. Juan, M. L., Gonzalez, L. W., & Walker, G. C. (1998). A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4600–4602. <https://doi.org/10.1128/aem.64.11.4600-4602.1998>
51. Kitamura, S., & Doi, Y. (1994). Staining method of poly(3-hydroxyalkanoic acids)-producing bacteria by Nile blue. *Biotechnology Techniques*, 8(5), 345–350.
52. Spiekermann, P., Rehm, B. H. A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., & Steinbüchel, A. (1999). A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3607–3613.
53. Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21–53.
54. Bano, S., Aslam, A. A., Khan, A., Shabbir, A., Qayyum, F., Wahab, N., Jabar, A., Islam, I. U., & Ng, S. L. (2024). A mini-review on polyhydroxyalkanoates: Synthesis, extraction, characterization, and applications. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.07.033>
55. Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433–446. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-433>
56. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., & Komagata, K. (1996). Proposal for two new genera, *Aneurinibacillus* gen. nov. and *Brevibacillus* gen. nov. *International*

Journal of Systematic Bacteriology, 46(4), 939–946.
<https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-939>

57. Pernicová, I., Nováčková, I., Sedláček, P., Kourilová, X., Kalina, M., Kovalčík, A., Koller, M., Nebešářová, J., Krzyžánek, V., Hrubanová, K., Mašílko, J., Slaninová, E., & Obroučová, S. (2020). *Introducing the newly isolated bacterium Aneurinibacillus sp. HI as an auspicious thermophilic producer of various polyhydroxyalkanoates (PHA) copolymers—1. Isolation and characterization of the bacterium*. *Polymers*, 12(6), 1235. <https://doi.org/10.3390/polym12061235>

58. Shaikh, S. A., & Pathade, G. R. (2023). *Isolation and screening of thermophiles producing polyhydroxyalkanoates (PHAs)*. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences, Special Issue*, 171–174

59. Obruca, S., Dvořák, P., Sedláček, P., Koller, M., Sedlár, K., Pernicová, I., & Šafránek, D. (2022). *Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: Towards sustainable production of microbial bioplastics*. *Biotechnology Advances*, 58, 107906. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107906>

60. Chen, G.-Q., & Jiang, X.-R. (2018). Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(10), 790–805. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.005>

61. Dalton, B., Bhagabati, P., De Micco, J., Padamati, R. B., & O'Connor, K. (2022). A review on biological synthesis of polyhydroxyalkanoates and their applications. *Catalysts*, 12(3), 319. <https://doi.org/10.3390/catal12030319>

62. Dionisi, D., Carucci, G., Papini, M. P., Riccardi, C., Majone, M., & Carrasco, F. (2005). Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Research*, 39(10), 2076–2084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.02.043>

63. Koller, M., Sandholzer, D., Salerno, A., Braunegg, G., & Narodoslawsky, M. (2010). Biopolymer from industrial residues: Life cycle assessment of polyhydroxyalkanoate (PHA) production from whey. *Water Science and Technology*, 62(4), 778–786. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.358>