CHARACTERISATIONS OF NEWLY ISOLATED HALOPHILIC BACTERIUM *Salinicola* sp. TSLT21 FROM SPRATLY ISLAND AND ITS ABILITY TO BIOSYNTHESIZE POLYHYDROXYALKANOATE (PHA)

Nguyen Thi Tam Thu
Institute of New Technology/Academy of Military Science and Technology

ARTICLE INFO

Received: 01/3/2023
Revised: 13/6/2023
Published: 13/6/2023

KEYWORDS

PHA
Bioplastic
Salinicola
Spratly
Halophilic bacteria

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastic is a type of plastic synthesized by microorganisms in conditions of excess carbon source. There are many microorganisms that can biosynthesize PHA, including halophiles such as *Bacillus*, *Halomonas*... However, microorganisms in the Spratly islands area have not been studied. This study presents some results of isolation and evaluation of PHA biosynthetic ability of strains isolated from Spratly Island. Among 21 strains producing PHA, TSLT21 strain demonstrated the remarkable ability to synthesize PHA up to 30.9% of dry cell biomass and the salt tolerance up to 12 %. The TSLT21 strain grew optimally at 30ºC, pH 7, NaCl concentration 7%. The best carbon and nitrogen sources were glucose and yeast extract 10g/l. The 16S rRNA gene sequence of strain TSLT21 is 99.93% similar to strains of the genus *Salinicola*, so it is named *Salinicola* sp. TSLT21 and registered on GenBank with access number OL757728. The strain *Salinicola* sp. TSLT21 which is a newly studied strain of halophilic bacteria in Spratly Island has the ability to biosynthesize PHA.

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)

Nguyễn Thị Tâm Thư
Viện Công nghệ mới/Viện Khoa học và Công nghệ quân sự

THÔNG TIN BÀI BÁO

Ngày nhận bài: 01/3/2023
Ngày hoàn thiện: 13/6/2023
Ngày đăng: 13/6/2023

TỪ KHÓA

PHA
Nhựa sinh học
Salinicola
Trường Sa
Vi khuẩn chịu mặn

TÓM TẮT

Nhựa sinh học Polyhydroxyalkanoate (PHA) là loại nhựa do vi sinh vật tổng hợp nên trong điều kiện dư thừa nguồn cacbon. Có nhiều vi sinh vật có thể sinh tổng hợp PHA, trong đó có các loài chịu mặn như *Bacillus, Halomonas*... Tuy nhiên, các vi sinh vật thuộc vùng đảo Trường Sa chưa được quan tâm nghiên cứu. Nghiên cứu này trình bày một số kết quả phân lập và đánh giá khả năng sinh tổng hợp PHA của các chủng phân lập từ quần đảo Trường Sa. Trong số 21 chủng có khả năng sinh tổng hợp PHA, chủng vi khuẩn TSLT21 có khả năng tổng hợp PHA tới 30,9% sinh khối tế bào khô và chịu mặn đến 12%. Chủng TSLT21 sinh trưởng tối ưu ở điều kiện 30ºC, pH 7, nồng độ NaCl 7%. Nguồn cacbon và nguồn nitơ tốt nhất là glucose và cao nấm men 10 g/l. Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng TSLT21 tương đồng 99,93% với các chủng thuộc chi *Salinicola* nên được đặt tên là *Salinicola* sp. TSLT21 và được đăng ký trên GenBank với mã số OL757728. Chủng *Salinicola* sp. TSLT21 là chủng mới được nghiên cứu về vi khuẩn chịu mặn ở đảo Trường Sa có khả năng sinh tổng hợp PHA.

DOI: https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7468

Email: thu.n3t.cnm@gmail.com

1. Mở đầu

Các vi sinh vật ưa mặn (halophilic microorganisms) bao gồm cả vi khuẩn ưa mặn (halophilic bacteria) và vi khuẩn cổ ưa mặn (halophilic archaea) là nhóm sản xuất PHA tiềm năng được nhiều nhà khoa học quan tâm [1]-[4]. Nhiều chủng vi khuẩn ưa mặn thuộc chi *Halomonas* như *Halomonas* sp. O-1, *H. elongata* DSM 2581, *H. campaniensis* LS21, *H. boliviensis* LC1 cũng đã được công bố có khả năng sinh tổng hợp PHA [2], [4], [5]. Khả năng sinh trưởng trong điều kiện nồng độ muối cao là một lợi thế trong quá trình sản xuất PHA của các vi khuẩn ưa mặn vì môi trường có nồng độ muối cao (trên 10%) có thể giảm thiểu việc ô nhiễm các vi sinh vật ngoại lai mà không cần khử trùng, do đó, giảm chi phí khử trùng môi trường và thiết bị, tiết kiệm năng lượng. Ngoài ra, quy trình thu hồi PHA có thể trở nên dễ dàng hơn nhờ hiện tượng sốc thẩm thấu (có thể dùng nước cất để phá vỡ tế bào) khi xử lý tế bào để thu hồi PHA và có thể giảm đến 40% chi phí thu hồi [6]. Hiện nay, nhựa có nguồn gốc dầu mỏ đang được sử dụng rất rộng rãi trong mọi lĩnh vực của đời sống. Lượng rác thải nhựa khổng lồ được thải ra môi trường hàng ngày thực sự là mối đe dọa tới môi trường cũng như sức khỏe của con người trên khắp hành tinh. Khi rác thải nhựa được đưa vào đại dương sau một thời gian sẽ bị tác động bởi các loại vi khuẩn, tảo nên sẽ mất dần các mùi hóa chất và chuyển sang mùi tự nhiên, thậm chí là giống mùi thức ăn của các sinh vật biển. Do đó, các động vật biển sẽ ăn chúng và chết dần. Các loại túi nilon cũng có thể cắt hoặc mắc vào cơ thể động vật làm cho sinh vật biển bị ngạt hay mắc kẹt đến chết. Theo thống kê, nhựa trôi dạt ngoài biển đã ảnh hưởng đến 267 loài, trong đó có 86% loài rùa biển [7], [8]. Ô nhiễm nhựa có nguồn gốc dầu mỏ đang ngày càng gia tăng nên xu hướng chung là tạo ra nhựa sinh học có khả năng phân hủy sinh học. Nhựa PHA có nguồn gốc sinh học và có khả năng phân hủy sinh học cả trong điều kiện nước biển [9]-[11]. Tuy nhiên, giá thành sản xuất PHA rất cao nên chưa được ứng dụng thực tế. Vì vậy, việc tìm ra các giải pháp nhằm làm giảm giá thành nguyên liệu là một bài toán cần có lời giải. Việc sử dụng các vi sinh vật ưa mặn sinh PHA là một trong các giải pháp đó [6]. Trong nghiên cứu này, các chủng vi sinh vật chịu mặn từ khu vực đảo Trường Sa có khả năng sinh tổng hợp PHA được phân lập, trong đó chủng TSLT21 có khả năng chịu mặn đến 12% được nghiên cứu chi tiết.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Các mẫu đất, chất thải từ khu vực Trường Sa (nơi có độ mặn cao, khoảng 3-3,5%), tọa độ (8°38'46.56"Bắc, 111°55'21.07"Đông). Các mẫu được lấy theo phương pháp của Abraham [3], đựng trong chai thủy tinh vô trùng và bảo quản lạnh đến khi phân tích.

Các hóa chất dùng để phân tích và nuôi cấy vi sinh vật (các chất khoáng như $MgSO_4$, K_2HPO_4, KNO_3…; nguồn cacbon như glucose, lactose, saccarose; nguồn nitơ như cao nấm men, peptone); thuốc nhuộm Nile red, PHA chuẩn có nguồn gốc từ Việt Nam, Trung Quốc, Sigma, đảm bảo độ tinh khiết trên 98%. Các thí nghiệm được thực hiện tại Viện Công nghệ mới, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập vi khuẩn

Từ các mẫu chất thải chăn nuôi, mẫu đất gần khu xử lý chất thải chăn nuôi ngoài đảo Trường Sa, 1 g đất được hòa trong 100 ml nước muối vô trùng, nồng độ 3% (tương đương nồng độ nước biển). Trộn đều và tiến hành pha loãng mẫu theo dãy thập phân đến nồng độ 10^{-4}, 10^{-5}. Tiến hành gạt đĩa trên môi trường thạch dinh dưỡng TS1 có thành phần (g/l) như sau: glucose 20; KH_2PO_4 0,5; $MgSO_4$ 0,5; peptone 5; cao nấm men 5; NaCl 50 (nồng độ NaCl tương đương 5%); KCl 0,5; $CaCl_2$ 0,09; KBr 0,06; H_2O bổ sung đến 1000 ml, môi trường dạng rắn bổ sung thêm 16g agar. Ủ đĩa ở 30^oC trong 48-72 giờ. Chọn lọc các khuẩn lạc riêng rẽ để đánh giá khả năng sinh PHA.

Các khuẩn lạc khác nhau được cấy trên môi trường thạch dinh dưỡng TS1 có bổ sung 0,5 mg/l Nile red. Sau 48 giờ, quan sát các khuẩn lạc dưới ánh sáng UV bước sóng 235 nm. Các khuẩn lạc có màu hồng hoặc cam là các chủng có khả năng sinh tổng hợp PHA [12]. Các khuẩn lạc này được chọn lọc, cấy riêng rẽ vào các ống thạch nghiêng chứa môi trường TS1 cho các thí nghiệm tiếp theo.

Các chủng cũng được đánh giá về khả năng chịu mặn với các nồng độ NaCl 3; 5; 7; 10; 12% để chọn ra chủng có khả năng chịu mặn cao nhất mà vẫn sinh tổng hợp PHA.

2.2.2. Quan sát hình thái tế bào sinh PHA dưới kính hiển vi huỳnh quang

Chủng được nuôi cấy trên môi trường dịch dinh dưỡng TS1. Sau 48 giờ, lấy 1 ml dịch bổ sung 0,1 mg/l Nile red (Sigma) và ủ ở 37^{o}C trong 1 giờ. Ly tâm thu tủa, loại bỏ dịch. Làm tiêu bản trên lam kính và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, Axioplus (Carl Zeiss, Đức) (Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học/Đại học Quốc Gia Hà Nội) ở vật kính 40x, bước sóng kích thích 550 nm và bước sóng phát xạ 570 nm, các hạt polyhydroxyalkanoats (PHA) tích lũy trong tế bào sẽ có màu vàng cam. Đồng thời, quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM Hitachi S-4800) tại Viện Kỹ thuật Nhiệt đới (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam).

2.2.3. Tách chiết, thu hồi và định lượng PHA từ chủng vi khuẩn TSLT21

Nuôi cấy chủng vi khuẩn TSLT21 trong bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường dinh dưỡng ở 30^{o}C trong 72 giờ. Lấy 50 ml dịch nuôi ly tâm tốc độ 7000 vòng/phút (trên máy HERMLE Z206A) trong 10 phút để thu sinh khối, sấy khô và cân (trên cân phân tích ME204) để xác định lượng sinh khối khô (m_1).

50 ml còn lại được ly tâm thu sinh khối để tách chiết PHA. Hòa tan lượng sinh khối trong dung dịch NaClO 5%, ủ ở 37^{o}C trong 1 giờ. Thêm 50 ml chloroform và ủ tiếp ở 37^{o}C trong 1 giờ. Ly tâm loại bỏ pha trên. Pha dưới chứa PHA tan trong choloroform được bổ sung thêm lượng tương đương hỗn hợp methanol : H_2O theo tỷ lệ 7:3 để tủa hết PHA. Lắc đều, ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu tủa, bỏ dịch. Làm khô tủa ở 40^{o}C, sau đó cân xác định khối lượng (m_2) và tỷ lệ PHA thu được được tính theo công thức (1) [12]:

$$^0/_0 PHA = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

Độ tinh sạch của PHA được tính toán dựa trên đường chuẩn theo phương pháp crotonic [12] Lấy 5 mg PHA thu được hòa tan vào 10 ml H_2SO_4 đặc, đun sôi 30 phút ở 100^{o}C để chuyển PHA thành crotonic. Xây dựng đường chuẩn bằng cách sử dụng PHA chuẩn (Sigma) và làm tương tự. Làm song song mẫu trắng. So sánh với đường chuẩn để định lượng PHA thu được. Độ tinh sạch của sản phẩm là tỷ lệ % của PHA tính theo đường chuẩn so với tổng số 5 mg PHA thu được.

2.2.4. Đinh danh vi sinh vật bằng giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

Nhân đoạn gen 16S rRNA của chủng TSLT21: Chủng TSLT21 được nuôi cấy trên đĩa thạch để tạo các khuẩn lạc riêng rẽ. Từ 1 khuẩn lạc, sinh khối vi khuẩn được lấy để tách ADN tổng số theo kit Genomic DNA Extraction. ADN tổng số thu được được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X. Đoạn ADN tổng số đủ điều kiện được sử dụng làm khuôn để nhân đoạn gen 16S rRNA sử dụng cặp mỗi 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) và 1492R (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′). DNA tổng số được dùng để làm khuôn nhân đoạn gen 16S rRNA với các thành phần gồm (µl): Taq polymerase 1; DNA tổng số 1; Buffer 2,5; dNTP 2,5; primer (27F/1492R) 1/1; H_2O 16. Phản ứng PCR được thực hiện với điều kiện biến tính ở 94^{o}C trong 2 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ (biến tính ở 95^{o}C trong 1 phút, ủ ở 55^{o}C trong 1 phút, kéo dài ở 72^{o}C trong 1 phút), kéo dài tiếp 72^{o}C trong 10 phút trên máy PCR Mycycle. Các sản phẩm PCR được làm sạch bằng kit làm sạch DNA. Sản phẩm sau khi làm sạch được gửi đi giải trình tự trên thiết bị Illumina. Sử dụng phần mềm Blast để so sánh trình tự trên ngân hàng gen; phần mềm Mega X để xây dựng cây phát sinh chủng loại và đăng ký mã số trên ngân hàng gen NCBI.

2.2.5. Phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi (FTIR)

PHA thu được được phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi trên máy FTIR Spectrum Two (Anh): 1 mg PHA được hòa trong 7 ml chloroform và lấy 1 giọt hỗn hợp phủ lên đĩa FTIR KBr. Phổ IR được đọc từ bước sóng 400-4000 cm^{-1} với khoảng cách 4 cm^{-1} trong áp suất chân không. Nghiên cứu này được thực hiện tại Học viện Kỹ thuật Quân sự.

2.2.6. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn

Trên môi trường dịch TS1, nuôi cấy vi khuẩn ở các dải nhiệt độ khác nhau 20; 25; 30; 35; 40 và 45^oC để lựa chọn nhiệt độ nuôi cấy thích hợp nhất.

Môi trường được điều chỉnh ở các pH khác nhau từ 4; 5; 6; 7; 8; 9 để nuôi cấy ở nhiệt độ tối ưu nhất và tìm ra pH thích hợp nhất.

Thay đổi nguồn cacbon của môi trường dinh dưỡng TS1 với các thành phần cacbon khác nhau như glucose, maltose, lactose, tinh bột, saccarose (nồng độ 10 g/l) ở điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp để lựa chọn nguồn cacbon tối ưu nhất.

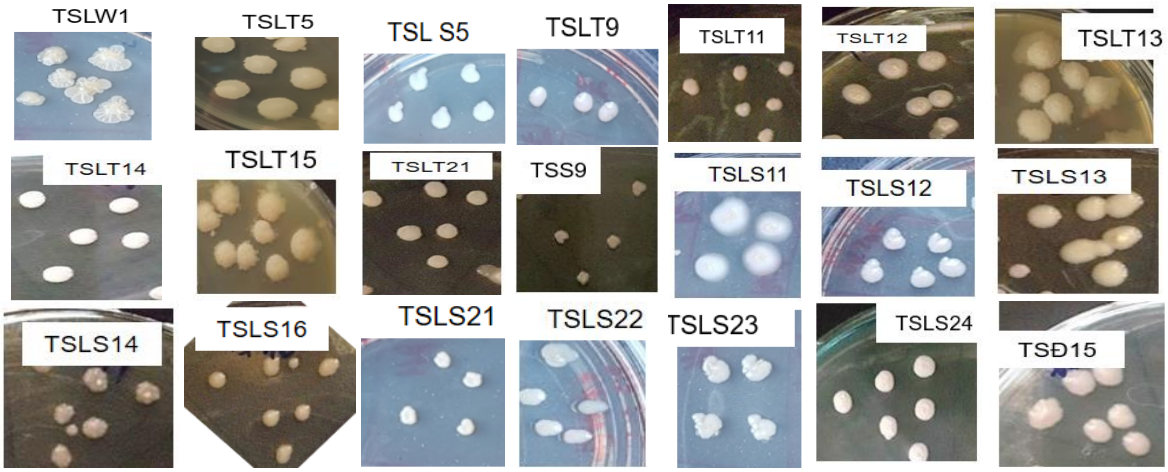
Thay đổi nguồn nitơ từ pepton, cao nấm men của môi trường cơ bản với các nguồn nitơ riêng lẻ như cao nấm men, peptone, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, $(NH_4)_2CO$, NH_4NO_3 (nồng độ 10 g/l) với các điều kiện tối ưu ở trên để đánh giá nguồn nitơ thích hợp nhất.

Đánh giá khả năng sinh trưởng qua việc đo độ hấp thu ở bước sóng 620 nm (OD_{620}) để lựa chọn các điều kiện thích hợp.

3. Kết quả

3.1. Phân lập, sàng lọc chủng có khả năng sinh tổng hợp PHA

Từ các mẫu chất thải, mẫu đất gần khu xử lý chất thải chăn nuôi trên đảo Trường Sa, 21 chủng vi sinh vật đã được phân lập với các hình thái khuẩn lạc, khả năng sinh tổng hợp PHA là khác nhau, trong đó có 2 chủng nấm men (TSLS24 và TSLĐ15), 19 chủng vi khuẩn (các chủng còn lại). Hình thái của các chủng vi sinh vật khác nhau trên môi trường thạch dinh dưỡng TS1 được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. *Hình thái khuẩn lạc của các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp PHA*

Đánh giá định tính khả năng sinh tổng hợp PHA bằng việc quan sát việc tạo màu dưới ánh sáng UV 235 nm khi nhuộm bằng Nile red (mức độ phát sáng dưới đèn UV thể hiện mức độ sinh tổng hợp PHA [12]), kết quả được trình bày ở bảng 1. Kết quả trình bày tại bảng 1 cho thấy, cả 21 chủng phân lập được đều có khả năng sinh tổng hợp PHA với các mức độ khác nhau, trong đó các chủng sinh tổng hợp PHA mạnh hơn là TSLT11, TSLT12, TSLT14, TSLT21, TSLS9, TSLS11, TSLS16, TSLS23 và TSLS24.

Bảng 1. *Khả năng sinh PHA và chịu mặn của các chủng phân lập từ đảo Trường Sa*

TT	Ký hiệu chủng	Phân loại sơ bộ	Khả năng sinh PHA	Nguồn phân lập	Khả năng chịu mặn (%)				
					3	5	7	10	12
1.	TSLW1	Vi khuẩn	++	Nước biển	+++	++	++	-	-
2.	TST5		++		+++	+++	++	+	-
3.	TSLS5		+		+++	++	++	-	-
4.	TSLT9		++		+++	++	+	-	-
5.	TSLT10		++		+++	++	+	-	-
6.	TSLT11		+++		+++	++	++	-	-
7.	TSLT12		+++		+++	++	+	-	-
8.	TSLT13		++		+++	++	+	-	-
9.	TSLT14		+++		+++	+++	+++	+	-
10.	TSLT15		++		+++	++	+	-	-
11.	**TSLT21**		**+++**		**+++**	**+++**	**+++**	**++**	**++**
12.	TSLT22		+		+++	++	+	-	-
13.	TSS9		+++		+++	+++	++		-
14.	TSLS11		+++		+++	++	++	-	-
15.	TSLS12		++		+++	++	+	-	-
16.	TSLS13		++	Đất gần khu xử lý chất thải chăn nuôi	+++	++	+	-	-
17.	TSLS14		++		+++	++	+	-	-
18.	TSLS16		+++		+++	++	+	-	-
19.	TSLS21		+		+++	++	++	-	-
20.	TSLS23		+++		+++	+++	+++	++	-
21.	TSLS24		+++		+++	+++	+++	++	-
22.	TSLĐ15	Nấm men	++	Đất khu trồng cây lâu năm	+++	++	++	-	-

Chú thích: +: màu hồng/cam nhạt thể hiện mức độ tổng hợp PHA yếu
++: màu hồng/cam vừa thể hiện mức độ tổng hợp PHA trung bình
+++: màu hồng/cam đậm thể hiện mức độ tổng hợp PHA mạnh

Với mục đích chọn lọc các chủng có khả năng sinh tổng hợp PHA và có khả năng chịu mặn cao, các chủng cũng được đánh giá khả năng chịu mặn ở các nồng độ NaCl khác nhau (3; 5; 7; 10; 12%). Qua sàng lọc lựa chọn các chủng có khả năng chịu mặn và tổng hợp PHA, có một số chủng có khả năng chịu mặn đến 5% hoặc 7%, có 5 chủng có khả năng chịu mặn đến 10% và có duy nhất chủng TSLT21 có khả năng chịu mặn lên tới 12% (Bảng 1). Hiện nay, có rất nhiều nghiên cứu về các vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHA nhưng các chủng vi khuẩn chịu mặn phân lập từ đảo Trường Sa rất ít, đặc biệt chưa có chủng nào chịu mặn được tới 12%. Do đó, chủng vi khuẩn TSLT21 phân lập từ chất thải chăn nuôi ở đảo Trường Sa được lựa chọn nghiên cứu tiếp.

3.2. Đặc điểm hình thái tế bào và khả năng sinh tổng hợp PHA của chủng vi khuẩn TSLT21

a b c

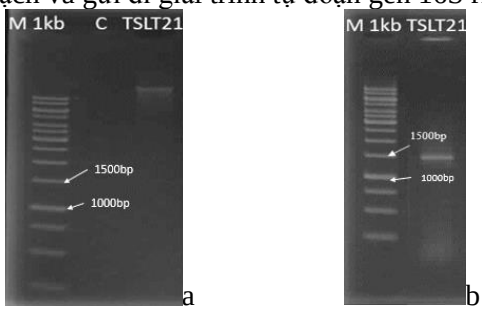
Hình 2. *Hình ảnh tế bào chủng TSLT21 quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) (a), nhuộm Gram (b) và kính hiển vi huỳnh quang (c)*

Quan sát hình thái tế bào chủng vi khuẩn TSLT21 cho thấy, tế bào có dạng hình que, Gram âm, không sinh bào tử. Kích thước từ 0,79-0,86 x 1,3-1,7 µm (hình 2). Khả năng sinh tổng hợp

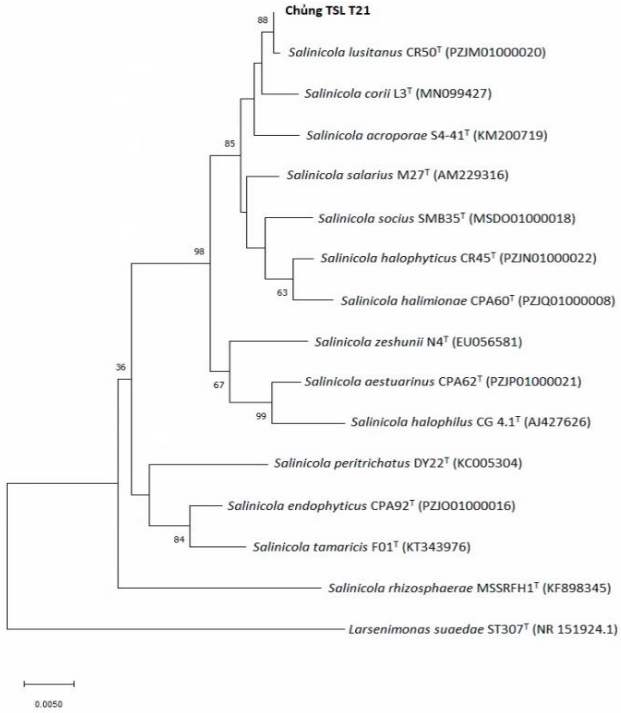
PHA (tế bào bắt sáng và phát quang màu vàng cam) cũng được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang khi nhuộm tế bào bằng Nile red.

3.3. Định danh chủng vi khuẩn TSLT21

Sau khi tách DNA tổng số và nhân đoạn gen 16S rRNA, sản phẩm PCR của chủng TSLT21 cho thấy có 1 băng với kích thước khoảng 1500 bp phù hợp với đoạn gen 16S rRNA (hình 3). Sản phẩm này được làm sạch và gửi đi giải trình tự đoạn gen 16S rRNA.



Hình 3. *Ảnh điện di DNA tổng số (a) và sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA (b) của chủng TSLT21*



Hình 4. *Cây phát sinh chủng loại của chủng TSLT21 và các chủng có quan hệ gần gũi, sử dụng phần mềm MEGA X với phương pháp phân tích Neighbor- Joining. Giá trị bootstrap (%) dựa trên 1.000 lần lặp*

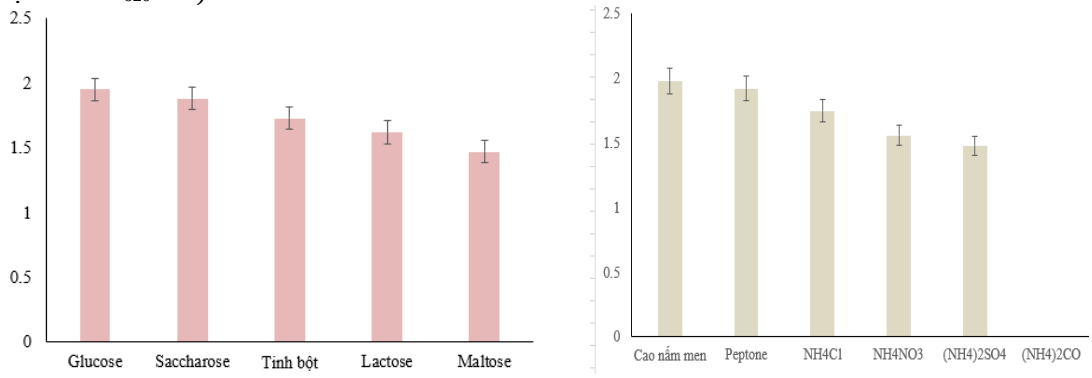
Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng TSLT21 được so sánh bằng phần mềm Blast trong NCBI với các đoạn trình tự khác trên GenBank cho thấy tương đồng cao nhất (99,93%) so với chủng chuẩn *Salinicola lusitanus* CR50^T (PZJM01000020) và tương đồng với hầu hết các chủng thuộc chi *Salinicola*. Do vậy, chủng này được xếp vào chi *Salinicola* và được đặt tên là *Salinicola* sp. TSLT21. Trình tự đoạn gen 16S rRNA cũng được đăng ký trên Genbank với mã số OL757728. Mối quan hệ giữa chủng TSLT21 và các chủng liên quan được thể hiện trên hình 4.

3.4. Các đặc điểm sinh học của chủng Salinicola sp. TSLT21

3.4.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ

Nuôi cấy vi khuẩn *Salinicola* sp. TSLT21 trên môi trường TS1 có bổ sung các nguồn đường khác nhau như glucose, saccarose, lactose, tinh bột, malnitose với cùng nồng độ 10 g/l. Nuôi cấy lắc trong thời gian 72 giờ ở 35ºC, pH7. Đánh giá sinh trưởng của vi khuẩn qua việc đo OD_{620} nm. Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn *Salinicola* sp. TSLT21 có khả năng sinh trưởng trên tất cả các nguồn cacbon khảo sát và tốt nhất với glucose, phát triển tương tự nhau với các nguồn cacbon là lactose và saccarose (hình 5).

Khi nuôi cấy trên các nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ khác nhau như pepton, cao nấm men, NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ và urea $(NH_4)_2CO$ với cùng nồng độ 10 g/l. Nuôi cấy lắc trong thời gian 72 giờ ở 35ºC, pH7. Kết quả trên hình 5 cho thấy chủng vi khuẩn *Salinicola* sp. TSLT21 hoàn toàn không phát triển trên nguồn nitơ là urea và phát triển được trên các nguồn nitơ đã khảo sát khác nhưng nguồn nitơ hữu cơ thích hợp hơn. Nguồn nitơ phù hợp nhất cho sinh trưởng của chủng vi khuẩn *Salinicola* sp. TSLT21 là cao nấm men (Đánh giá sinh trưởng của vi khuẩn qua việc đo OD_{620} nm).



Hình 5. *Khả năng sinh trưởng của chủng Salinicola sp. TSLT21 trên các nguồn cacbon (a) và nguồn nitơ (b)*

3.4.2. Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và nồng độ NaCl đến sinh trưởng của chủng TSLT21

Kết quả trình bày trên bảng 2 cho thấy chủng *Salanicola* sp. TSLT21 có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ từ 20-40ºC, sinh trưởng tối ưu ở 30ºC. Chủng này có thể sinh trưởng với dải pH rộng từ 4-9 và sinh trưởng tối ưu ở pH 7. Chủng TSLT21 cũng sinh trưởng tốt ở nồng độ NaCl từ 2-12% nhưng sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ NaCl 7%. Đây là chủng có khả năng chịu NaCl đến 12% mà có khả năng sinh tổng hợp PHA.

Bảng 2. *Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl đến sinh trưởng của chủng TSLT21*

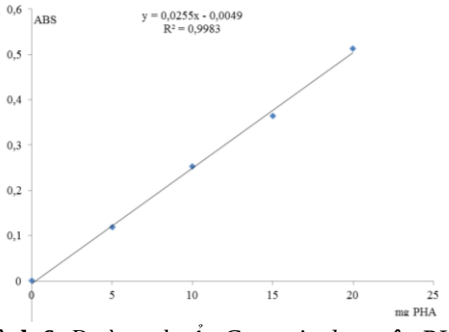
Nhiệt độ (ºC)	OD_{620}	pH	OD_{620}	Nồng độ NaCl (%)	OD_{620}
20	1,423 ± 0,05	4	1,235± 0,05	2	1,328± 0,05
25	1,531± 0,05	5	1,566± 0,05	3	1,414± 0,05
30	**1,884**± 0,05	6	1,742± 0,05	5	1,423± 0,05
35	1,723± 0,05	**7**	**1,821**± 0,05	**7**	**1,654**± 0,05
40	1,218± 0,05	8	1,622± 0,05	10	1,578± 0,05
45	0,422± 0,05	9	1,455± 0,05	12	1,443± 0,05

3.5. Đánh giá định lượng khả năng sinh PHA của chủng Salinicola sp. TSLT21

Chủng vi khuẩn ưa mặn *Salinicola* sp. TSLT21 được nuôi trong môi trường tối ưu (glucose 10 g/l, cao nấm men 10 g/l, NaCl 7%, ở 30ºC, pH 7) trong bình tam giác thể tích 250 ml, lắc trong 96 giờ. Lấy dịch nuôi ly tâm thu sinh khối và tách chiết thu hồi PHA theo quy trình. Độ tinh sạch của PHA được so sánh và tính toán dựa trên đường chuẩn crotonic với PHA chuẩn (hình 6). Kết quả về khả năng tổng hợp PHA và độ sạch của PHA được trình bày trên bảng 3.

Bảng 3. *Lượng sinh khối và PHA tạo thành từ chủng Salinicola sp. TSLT21*

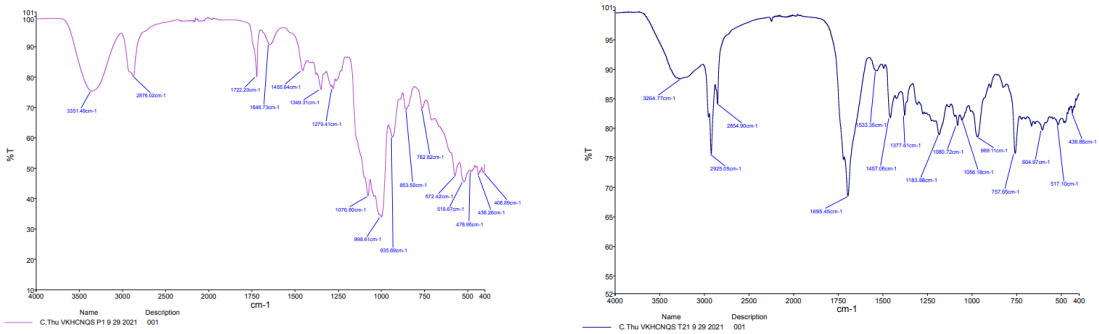
Sinh khối khô (g/l)	PHA (g/L)	%PHA	Độ sạch (%)
2,577 ± 0,125	0,796 ± 0,015	30,93 ± 1,15	90,8 ± 2,2



Hình 6. *Đường chuẩn Crotonic dựa trên PHA chuẩn để xác định độ tinh sạch của PHA*

Sau 96 giờ nuôi cấy, chủng *Salinicola* sp. TSLT21 sinh trưởng mạnh và thu được 2,57 g/l sinh khối, tỷ lệ PHA tạo thành khoảng 30% so với sinh khối tế bào khô với độ tinh sạch là 90,8%. Tỷ lệ PHA tạo ra chưa cao so với nhiều chủng vi khuẩn chịu mặn khác có tỷ lệ PHA tạo thành trên 50% [2], [4], [13], nhưng đây là 1 chủng ưa mặn mới phân lập được mà có khả năng sinh tổng hợp PHA với khả năng chịu nồng độ muối cao. Đặc biệt, các nghiên cứu về vi sinh vật ở Trường Sa không nhiều. Kết quả này góp phần bổ sung thêm sự đa dạng về các vi sinh vật, đặc biệt là vi sinh vật ưa mặn có khả năng tổng hợp PHA từ Trường Sa.

3.6. Đặc điểm phổ IR của PHA do chủng Salinicola sp. TSLT21 sinh ra



Hình 7. *Phổ FTIR của PHA chuẩn (trái) và PHA do chủng Salinicola sp. TSLT21 sinh ra (phải)*

Kết quả trên hình 7 cho thấy, phổ FTIR của PHA do chủng *Salinicola* sp. TSLT21 sinh ra khá tương đồng với PHA chuẩn với các cấu trúc tại các đỉnh peak như sau: Peak phổ tại 3264 cm^{-1} tương ứng với nhóm cacbonyl este (C=O) và tương tự như peak của PHA do chủng Bacillus cereus NDRMN sinh ra [13]; đỉnh peak 1533 cm^{-1} tương ứng nhóm C-H, peak 1457 tương ứng nhóm -CH_3, các peak từ 517-1183 cm^{-1} liên quan đến liên kết C-O của nhóm ester [13]. Một số peak tại 2925 cm^{-1}, từ 1377,6-1457,05 cũng đặc trưng cho nhóm C-H của chuỗi polymer. Độ hấp thụ ở khoảng 1400-1500 cũng tương ứng với nhóm -CH_2- kéo dài của chuỗi và sự có mặt của vòng thơm trong chuỗi, nhóm C-O có mặt trong chuỗi còn thể hiện ở độ hấp thụ dao động từ 1026-1273 cm^{-1} [6]. So với PHA chuẩn (Sigma) có các cấu trúc tương tự với các peak tại 3441 cm^{-1} (nhóm -OH), 2934-2977 cm^{-1}; 1379-1453 cm^{-1} (nhóm CH kéo dài), 1026-1278 cm^{-1} (nhóm C-O). Kết quả này chứng tỏ PHA do chủng *Salinicola* sp. TSLT21 tạo thành tương đồng về mặt cấu trúc với PHA chuẩn (sigma). Phổ FTIR của PHA này cũng tương tự phổ FTIR của PHA do chủng *Halomonas elongate* 2FF sinh ra [14].

4. Kết luận

Chủng vi khuẩn chịu mặn *Salinicolas* sp. TSLT21 phân lập từ đảo Trường Sa có điều kiện sinh trưởng tối ưu ở 30°C, pH 7, nồng độ NaCl 7% với nguồn glucose và cao nấm men 10 g/l.

Chủng này cũng có khả năng chịu mặn tới 12%. Ở điều kiện tối ưu, chủng TSLT21 sinh tổng hợp PHA tới 30,9% so với sinh khối tế bào khô với độ tinh sạch 90,8%. PHA do chủng TSLT21 tổng hợp tương đồng về mặt cấu trúc với PHA chuẩn. Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng *Salinicolas* sp. TSLT21 được đăng ký trên GenBank với mã số OL577728.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

[1] J. Han, J. Hou, H. L. Liu, S. F. Cai, B. Feng, J. Zhou, and H. Xiang, "Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 23, pp. 7811-7819, 2010.

[2] M. Ilhama, S. Nakanomori, T. Kihara, A. Hokamura, H. Matsusaki, T. Tsuge, and K. Mizuno, "Characterization of polyhydroxyalkanoate synthases from *Halomonas* sp. O-1 and Halomonas elongata DSM2581: Site-directed mutagenesis and recombinant expression," *Polymer De*, vol. 109, pp. 416-423, 2014.

[3] B. S. Abraham, D. Caglayan, and N. V. Carrillo, "Shotgun metagenomic analysis of microbial communities from the Loxahatchee nature preserve in the Florida Everglades," *Environmental Microbiome*, vol. 15, no. 2, pp. 19-86, 2020, doi: 10.1186/s12934-020-01342-z.

[4] J. Quillaguamán, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson, M. T. Alvarez, and O. Delgado, "*Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile bacterium isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake," *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*, 54, 721-725, 2004.

[5] Y. X. Zhao, Z. M. Rao, Y. F. Xue, P. Gong, Y. Z. Ji, and Y. H. Ma, "Poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) production by Haloarchaeon *Halogranum amyloticum*," *Applied Microbial and Cell Physiology*, vol. 99, no. 18, pp. 7639-7649, 2015.

[6] M. Koller, "Production of Hydroxylankanoate (PHA) biopolyesters by extremophiles?," *MOJ Poly Sci*, vol. I, no. 2, pp. 69-85, 2017.

[7] S. E. Nelms, E. M. Duncan, A. C. Broderick, T. S. Galloway, M. H. Godfrey, M. Hamann, P. K. Lindeque, and B. J. Godley, " Plastic and marine turtles: a review and call for research," *ICES J Mar Sci*, vol. 73, pp. 165-181, 2016.

[8] L. Parker, *Nearly Every Seabird on Earth Is Eating Plastic*, National Geographic, 2015.

[9] K. Numata, H. Abe, and T. Iwata, "Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) Materials," *Materials*, vol. 2, pp. 1104-1126, 2009, doi: 10.3390/ma2031104.

[10] L. S. Dilkes-Hoffman, P. A. Lant, B. Laycocl, and S. Pratt, "The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study," *Marine Pollution Bulletin*, vol. 142, pp. 15-24, 2019.

[11] T. G. Volova, A. N. Boyandin, A. D. Vasiliev, V. A. Karpov, S. V. Prudnikova, O. V. Mishukova, U. A. Boyarskikh, M. L. Filipenko, V. P. Rudnev, B. X. Bui, V. D. Vu, and Gitelson II, "Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, pp. 2350-2359, 2010.

[12] D. Ratnaningrum, V. Saraswaty, S. Priatni, P. Lisdiyanti, A. Purnomo, and S. Pudjiraharti, "Screening of polyhydroxyalkanoates (PHA)-producing bacteria from soil bacteria strains," *Earth and Environmental Science*, vol. 277, pp.1-10, 2019.

[13] M. Narayanan, S. Kandasamy, S. Kumarasamy, K. Gnanavel, M. Ranganathan, and G. Kandasamy, "Screening of polyhydroxybutyrate producing indigenous bacteria from polluted lake soil," *Heliyon*, vol. 6, 2020, Art. no. e05381.

[14] A. Cristea, A. Baricz, N. Leopold, C. G. Floare, G. Borodi, I. Kacso, S. Tripon, P. A. Bulzu, A. S. Andrei, O. Cadar, E. A. Levei, and H. L. Banciu, "Polyhydroxybutyrate production by an extremely halotorant *Halomonas elongata* strain isolated from the hypersaline meromitic Fara Fund Lake (Transylvanian Basin, Romania)," *Journal of Applied Microbiology*, vol.418, pp. 1-15, 2018.