

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN ƯA NHIỆT TỪ SUỐI NƯỚC NÓNG TRƯỜNG XUÂN CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME CHITINASE BỀN NHIỆT

ISOLATION AND SELECTION OF THERMOPHILIC MICROORGANISMS FROM HOT SPRINGS WITH THE ABILITY TO PRODUCE THERMOSTABLE CHITINASE

Phạm Thị Lan, Nguyễn Thị Chính,

Nguyễn Thị Kim Cúc, Nguyễn Thị Như Thường

Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Như Thường; Email: nhuthuongnt@ntu.edu.vn

Ngày nhận bài: 10/09/2025; Ngày phân biện thông qua: 1/12/2025; Ngày duyệt đăng: 25/12/2025

TÓM TẮT

Suối khoáng nóng là một trong những môi trường sống chính của các vi sinh vật ưa nhiệt - nguồn cung cấp nhiều hoạt chất sinh học quan trọng được ứng dụng trong công nghiệp, đặc biệt là các enzyme bền nhiệt. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng sinh enzyme chitinase bền nhiệt từ suối nước nóng Trường Xuân, Ninh Hoà, tỉnh Khánh Hoà. Từ 20 mẫu nước, bùn và đất, đã phân lập được 63 chủng ưa nhiệt, trong số đó 18 chủng có khả năng sinh enzyme chitinase. Chủng TX9 thể hiện hoạt tính enzyme chitinase cao nhất với đường kính vòng phân giải chitin $25,33 \pm 0,58$ mm. Chủng TX9 có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase có hoạt độ cao nhất khi nuôi cấy ở 50°C với tốc độ lắc 180 rpm trong 48 giờ. Enzyme chitinase sinh ra từ chủng này có đặc tính bền nhiệt trong khoảng nhiệt độ từ 50°C - 70°C trong 60 phút. Kết quả nhuộm Gram và thử nghiệm sinh hóa cho thấy chủng TX9 là vi khuẩn hình que, gram dương, catalase dương tính và sinh bào tử. Từ kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng TX9 được xác định thuộc loài *Bacillus licheniformis* với độ tương đồng 99,85%. Từ các kết quả thu được cho thấy chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Bacillus licheniformis* TX9 là chủng tiềm năng sinh enzyme chitinase bền nhiệt theo định hướng ứng dụng sử dụng trong công nghiệp như xử lý môi trường.

Từ khóa: *Bacillus licheniformis*, chitinase, enzyme bền nhiệt, suối nước nóng Trường Xuân

ABSTRACT

Hot mineral springs are the primary habitats of thermophilic microorganisms, and serve as sources of many important biologically active substances used in industry, especially heat-stable enzymes. This study aimed to isolate and screen thermophilic bacterial strains capable of producing thermostable chitinase from Truong Xuan hot spring in Ninh Hoa town, Khanh Hoa province. A total of 63 bacterial isolates were obtained from 20 samples of water, mud, and soil collected from the hot spring area, of which 18 demonstrated chitinase-producing activity. Among them, TX9 exhibited the highest chitinase activity, with a clear zone on a chitin agar plate of 25.33 ± 0.58 mm. TX9 produced the highest activity when incubated at 50°C in a 180 rpm rotary shaker for 48 hours. This crude chitinase retained thermal stability within the temperature range of 50°C to 70°C for 60 minutes. Results of Gram staining and biochemical tests identified TX9 strain as Gram-positive, rod-shaped, catalase-positive, and spore-forming bacterium. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, strain TX9 was identified as *Bacillus licheniformis* with 99.85% sequence similarity. These findings indicate that *Bacillus licheniformis* TX9 is a promising thermophilic bacterium for thermostable chitinase production, with potential industrial applications, especially in environmental treatment.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, chitinase, thermostable enzyme, Truong Xuan hot spring.

I. MỞ ĐẦU

Suối nước nóng là nơi có nhiệt độ nước cao hơn nhiệt độ môi trường xung quanh từ 6 – 8°C, nhiệt độ của suối nước nóng dao động từ 40 – 80°C, do đó có thể chứa nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau, đặc biệt là các nhóm vi sinh vật ưa nhiệt (Stöhr *et al.*, 2001; Pinzón-Martínez *et al.*, 2010). Các nhóm vi sinh vật này thường là vi khuẩn hiếu khí, hình que, gram dương, hình thành bào tử và có mối quan hệ gần gũi với *Geobacillus sp.*, *Anoxybacillus sp.*, *Aeribacillus sp.*, *Brevibacillus thermoruber*, *Paenibacillus sp.*, và *Bacillus licheniformis* (Pinzón-Martínez *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2014). Vi sinh vật ưa nhiệt sinh tổng hợp nhiều hoạt chất sinh học quan trọng đã được ứng dụng trong công nghiệp, đặc biệt là các enzyme bền nhiệt (Turner *et al.*, 2007, Mathai *et al.*, 2015). Các enzyme bền nhiệt từ vi khuẩn ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp và là sản phẩm có giá trị kinh tế cao, chẳng hạn như enzyme amylase, cellulase, chitinase, pectinase, xylanase, protease và lipase (Pandey *et al.*, 2000; Tehei *et al.*, 2005).

Enzyme bền nhiệt từ vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong các ngành công nghiệp do tính ổn định của chúng trong điều kiện môi trường khắc nghiệt, đặc biệt là ở nhiệt độ cao (Singh *et al.*, 2011). Hơn nữa, chúng đã được báo cáo là ổn định hơn với nhiều dung môi, chất tẩy rửa, pH axit và kiềm so với các enzyme có nguồn gốc từ vi sinh vật thông thường (Bhalla *et al.*, 2013, Dettmer *et al.* 2013). Trong đó, chitinase (EC 3.2.2.14) là enzyme thủy phân chitin có nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực, đặc biệt là nông nghiệp, y học, công nghiệp thực phẩm và môi trường cũng như trong xử lý phế liệu thủy sản. Enzyme này xúc tác thủy phân liên kết β 1,4-glucoside giữa các phân tử N-acetyl-D-glucosamine liên tiếp nhau trong chuỗi chitin (Rameshthangam *et al.*, 2018). Chitinase có thể

được tìm thấy từ nhiều nguồn khác nhau như động vật, thực vật và vi sinh vật (vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn) (Hamid *et al.*, 2013). Trong đó, enzyme chitinase từ vi sinh vật có nhiều ưu điểm như thời gian tổng hợp enzyme rất ngắn, sử dụng nguyên liệu rẻ tiền, hoạt tính enzyme cao. Đặc biệt, chitinase từ vi sinh vật chịu nhiệt sẽ có nhiều ưu điểm vượt trội như khả năng bền nhiệt, ổn định ở khoảng pH rộng (Aliabadi *et al.*, 2016). Một số chi vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase bao gồm *Aeromonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, và *Bacillus* (Jabeen và Qazi, 2014).

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng hầu hết các vi sinh vật ưa nhiệt phân lập từ suối nước nóng có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase bền nhiệt thuộc chi *Bacillus*. Yuli và cộng sự (2004) đã phân lập chủng *Bacillus sp.* 13.26 từ suối nước nóng Tompasso ở phía bắc Sulawesi Indonesia, chủng này có hoạt tính sinh chitinase bền nhiệt (60°C). Năm 2005, Toharisman cùng các cộng sự phân lập thành công chủng *Bacillus licheniformis* MB-2 có hoạt tính sinh enzyme chitinase bền nhiệt (70°C) từ suối nước nóng Tompasso, Indonesia. Dai và cộng sự (2011) cũng đã phân lập được chủng *Bacillus sp.* HU1 sinh enzyme chitinase bền nhiệt (60°C) từ suối nước nóng ở Tân Cương, Trung Quốc. Năm 2023, Chrisnasari và cộng sự cũng phân lập được chủng *Bacillus licheniformis* B2 từ suối nước nóng Ijen, Indonesia có khả năng sinh enzyme chitinase bền nhiệt (55°C) với hiệu suất phân giải chitin cao. Ở Việt Nam, Trần Khả Mộng và cộng sự (2022) đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn *Bacillus sp* ưa nhiệt (55°C) từ suối nước nóng Trường Xuân (Ninh Hoà, Khánh Hoà) và suối nước nóng Bình Châu (Xuyên Mộc, Bà Rịa-Vũng Tàu). Mặc dù có ứng dụng quan trọng trong các lĩnh vực khác nhau, enzyme chitinase bền nhiệt có nguồn gốc từ vi sinh vật phân lập từ các suối nước nóng tại Việt Nam vẫn chưa được

ngiên cứu đầy đủ, nhất là nguồn enzyme bền nhiệt từ vi sinh vật ở suối nước nóng Trường Xuân (Khánh Hòa). Do đó mục đích của nghiên cứu này nhằm thực hiện phân lập các chủng vi khuẩn từ suối nước nóng Trường Xuân và sàng lọc, tuyển chọn các chủng vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng sinh enzyme chitinase bền nhiệt có hoạt tính cao, nghiên cứu đặc tính, xác định nhiệt độ thích hợp để nuôi cấy chủng vi khuẩn tiềm năng và độ bền nhiệt của enzyme chitinase thu nhận được.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu nước, bùn, đất được lấy tại suối nước nóng Trường Xuân (12°31'20"N, 108°59'00"E, Ninh Hòa, Khánh Hòa). Các mẫu nước và bùn được thu thập tại 5 vị trí khác nhau. Ở mỗi vị trí, 3 loại mẫu thí nghiệm được thu nhận bao gồm: mẫu nước tầng mặt, mẫu nước tầng giữa và mẫu bùn tầng đáy. 5 mẫu đất được thu thập tại 5 vị trí riêng biệt và được bảo quản trong túi polymer vô trùng. Các mẫu nước và bùn được đựng trong chai thủy tinh chịu nhiệt, vô trùng, ghi nhãn rõ ràng về thông tin tên mẫu, ngày thu mẫu và người lấy mẫu. Tất cả các mẫu sau khi thu được bảo quản trong thùng giữ nhiệt để đưa về phòng thí nghiệm trường Đại học Nha Trang để thực hiện phân tích trong vòng 24h kể từ thời điểm thu mẫu (Guta *et al.*, 2024).

Nhiệt độ nước và giá trị pH được đo tại chỗ trong quá trình lấy mẫu bằng nhiệt kế điện tử và giấy đo pH. Kết quả ghi nhận nhiệt độ suối nước nóng dao động từ 37°C đến 68°C, trong khi giá trị pH nằm trong khoảng 7 - 8,5.

2. Phân lập vi khuẩn ưa nhiệt từ suối khoáng nóng

Phương pháp phân lập vi khuẩn ưa nhiệt được thực hiện dựa theo quy trình mô tả trong nghiên cứu của Guta và cộng sự (2024). Việc sàng lọc vi khuẩn ưa nhiệt được tiến hành thông

qua nuôi cấy ở nhiệt độ cao (50 - 55°C) trên môi trường thạch dinh dưỡng Nutrient agar (NA).

Cụ thể, 25g bùn, đất hoặc 25 ml nước được cho vào 225 mL nước peptone vô trùng, sau đó đồng nhất ở tốc độ 100 rpm/phút trong 10 phút. Hỗn hợp được ủ trong 24 giờ ở 50°C. Sau khi ủ, các mẫu được pha loãng bằng lần lượt bằng nước peptone vô trùng theo hệ số thập phân từ 10^{-1} - 10^{-6} . Từ các độ pha loãng 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , hút 0,1 mL dịch mẫu để cấy trải trên môi trường thạch dinh dưỡng NA, sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 24 - 48 giờ.

Các khuẩn lạc đơn lẻ, có hình thái đặc trưng được lựa chọn từ mỗi đĩa và làm thuần bằng cách ria lặp lại nhiều lần trên môi trường tương ứng cho đến khi thu được chủng thuần. Các chủng này được bảo quản ngắn hạn trên các ống thạch nghiêng, đồng thời lưu giữ lâu dài trong glycerol 20% ở -20°C.

3. Sàng lọc khả năng sinh chitinase của chủng phân lập được

Các chủng vi khuẩn được sàng lọc sơ cấp về khả năng sinh tổng hợp chitinase theo phương pháp cấy điểm của Lê Ngọc Tú và cộng sự (1982). Cụ thể, mỗi chủng vi khuẩn được cấy chấm điểm trên đĩa thạch dinh dưỡng NA có bổ sung 1% chitin (HiMedia, Ấn Độ) và ủ ở 50°C trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, các đĩa được nhuộm bằng dung dịch Lugol 1% để quan sát vòng phân giải chitin. Các chủng vi khuẩn tạo vòng phân giải có đường kính lớn hơn 15 mm được xem là có hoạt tính chitinase cao và được lựa chọn cho bước sàng lọc tiếp theo.

Các chủng được lựa chọn tiếp tục sàng lọc thứ cấp bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch theo mô tả của Chrisnasari và cộng sự (2023). Mỗi chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường Nutrient Broth (NB) có bổ sung 1% chitin (HiMedia, Ấn Độ) ở 50°C trong 48 giờ trên máy lắc với tốc độ 180 rpm/phút. Sau khi nuôi cấy, dịch nuôi cấy được ly tâm với tốc độ

10.000 rpm/phút trong 15 phút, thu phần dịch nổi để xác định hoạt tính phân giải chitin ngoại bào. Một lượng 100 μ L dịch sau ly tâm được cho vào giếng trên đĩa môi trường agar có bổ sung 1% chitin (Himedia, Ấn Độ), sau đó ủ ở 50°C trong 24 giờ. Hoạt tính enzyme chitinase ngoại bào được xác định thông qua vòng phân giải chitin xuất hiện xung quanh giếng thạch. Đọc kết quả như phương pháp sàng lọc sơ cấp.

4. Xác định một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tiềm năng

Các đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tiềm năng được xác định bao gồm: hình thái khuẩn lạc và tế bào, phản ứng nhuộm Gram, khả năng hình thành bào tử, tính di động, cùng với các thử nghiệm sinh hóa cơ bản như khả năng lên men đường, phản ứng MR-VP, khả năng sử dụng citrate, sản xuất indol, hoạt tính oxidase, catalase và hình thành nội bào tử. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp mô tả của Trần Linh Thuộc (2010).

5. Xác định hoạt độ chitinase bằng phương pháp DNS

Hoạt độ chitinase được xác định thông qua lượng đường khử N-acetyl- β -D-glucosamine (NAG) sinh ra trong quá trình thủy phân chitin huyền phù bởi enzyme chitinase (Dai và cộng sự 2011).

Dung dịch chitin huyền phù 1% (w/v) được chuẩn bị theo phương pháp của Dai và cộng sự (2011). Cụ thể, 1 g bột chitin thô được cho từ từ vào 20 mL HCl đậm đặc, khuấy đều và ủ ở 4°C qua đêm. Sau đó, 200 mL ethanol lạnh (-20°C) được thêm vào, hỗn hợp được khuấy nhanh và tiếp tục ủ qua đêm. Mẫu được ly tâm ở 5.000 rpm/phút trong 20 phút, thu lấy phần kết tủa, rửa nhiều lần bằng nước cất đến khi đạt giá trị pH trung tính. Cuối cùng, kết tủa được hòa trong nước cất để đạt thể tích 100 mL, tạo thành dung dịch chitin huyền phù 1%.

Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị bằng cách

trộn 2 mL dịch enzyme thô với 1 mL chitin huyền phù 1%, sau đó được ủ trong bể điều nhiệt (Memmert WNB 45, Đức) ở 50°C trong 60 phút. Phản ứng được dừng lại bằng cách đun sôi mẫu trong 15 phút nhằm bất hoạt enzyme. Sau khi làm nguội, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Whatman số 5 (đường kính 110 mm), thu phần dịch lọc trong để xác định lượng đường khử.

Để đo hoạt tính enzyme, 1 mL dịch lọc được trộn với 2 mL thuốc thử DNS 1%, lắc đều bằng máy vortex (SCI-VS, Mỹ), đun sôi trong 5 phút. Mẫu sau đó được để nguội đến nhiệt độ phòng.

Độ hấp thụ quang học của các mẫu được đo tại bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ UV-Vis (Libra S50, Mỹ). Lượng NAG sinh ra được xác định dựa trên đường chuẩn NAG được xây dựng trong dải nồng độ 0,1–1 μ mol/mL bằng quy trình tương tự. Một đơn vị hoạt tính chitinase (1 U) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol NAG trong 1 phút ở 50°C từ phản ứng thủy phân chitin.

6. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy vi khuẩn đến sinh tổng hợp enzyme chitinase

Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp enzyme chitinase được xác định bằng cách nuôi cấy chủng vi khuẩn tiềm năng trong môi trường có bổ sung 1% chitin ở các mức nhiệt độ 40, 50, 60 và 70°C trong 48 giờ, tốc độ lắc 180rpm/phút. Sau khi ủ, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 10.000 rpm/phút trong 15 phút để loại bỏ cặn, phần dịch nổi thu được là dịch enzyme thô.

Hoạt tính của enzyme ngoại bào được xác định bằng phương pháp đo lượng đường khử sinh ra sau phản ứng thủy phân chitin bằng thuốc thử DNS theo mô tả của Dai và cộng sự. (2011).

7. Xác định độ bền nhiệt của enzyme chitinase thu được

Độ bền nhiệt của enzyme chitinase được xác

định theo phương pháp của Li và cộng sự (2007). Chúng vi khuẩn được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ và thời gian thích hợp đã được xác định từ thí nghiệm ở mục 6. Dịch enzyme thô sau đó được ủ ở các mức nhiệt độ 50, 60, 70, 80, 90 và 100°C trong các khoảng thời gian 30, 60 và 90 phút. Sau thời gian ủ, các mẫu enzyme được làm nguội nhanh trên đá nhằm ngăn cản quá trình biến tính tiếp diễn, sau đó được xác định hoạt độ còn lại theo quy trình đo hoạt tính chitinase đã mô tả ở mục 5. Hoạt độ còn lại của enzyme trong từng mẫu được tính theo phần trăm (%) so với mẫu đối chứng (không qua xử lý nhiệt). Kết quả thu được phản ánh mức độ bền nhiệt của enzyme chitinase dưới các điều kiện khảo sát.

$$\text{Hoạt độ còn lại (\%)} = \frac{A}{B} * 100$$

Trong đó:

A: Hoạt độ enzyme mẫu xử lý nhiệt

B: Hoạt độ enzyme mẫu đối chứng (không xử lý nhiệt)

8. Định danh chủng vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

Chủng vi khuẩn tiềm năng được định danh

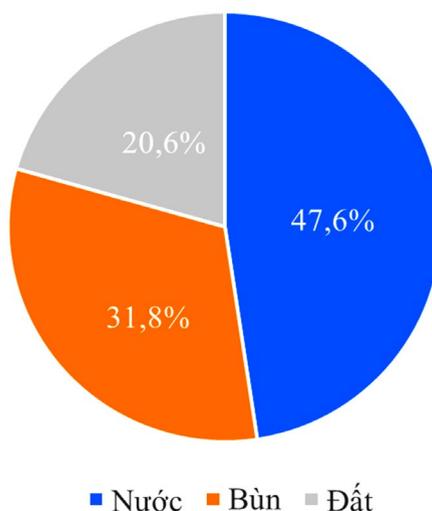
dựa trên kết quả giải trình tự gen 16S rRNA tại Công ty Nam Khoa, Tp Hồ Chí Minh). Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng tiềm năng được sử dụng để tìm kiếm trình tự tương đồng với các chủng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng chương trình BLAST.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập vi khuẩn ưa nhiệt từ suối nước nóng

Từ 20 mẫu nước, bùn, đất thu thập từ suối nước nóng Trường Xuân, tổng cộng 63 chủng vi khuẩn ưa nhiệt đã được phân lập trên môi trường NA. Trong đó, 30 chủng được phân lập từ mẫu nước (47,6%), 20 chủng vi khuẩn từ mẫu bùn (31,8%) và 13 chủng vi khuẩn từ mẫu đất (20,6%). Kết quả phân lập này phản ánh sự phân bố đa dạng của vi khuẩn ưa nhiệt trên các loại mẫu khác nhau (Hình 1).

Các chủng vi khuẩn sau phân lập và làm thuần trên môi trường NA thể hiện sự đa dạng về đặc điểm hình thái khuẩn lạc với nhiều màu sắc như trắng sữa, vàng nâu, xanh và trắng đục; bề mặt khuẩn lạc xù xì hoặc nhẵn, nhầy, có bong nước. Đáng chú ý, chủng TX9 sau 24h nuôi cấy hình thành khuẩn lạc xù xì, nhầy và có các bong nước xung quanh (Hình 2).



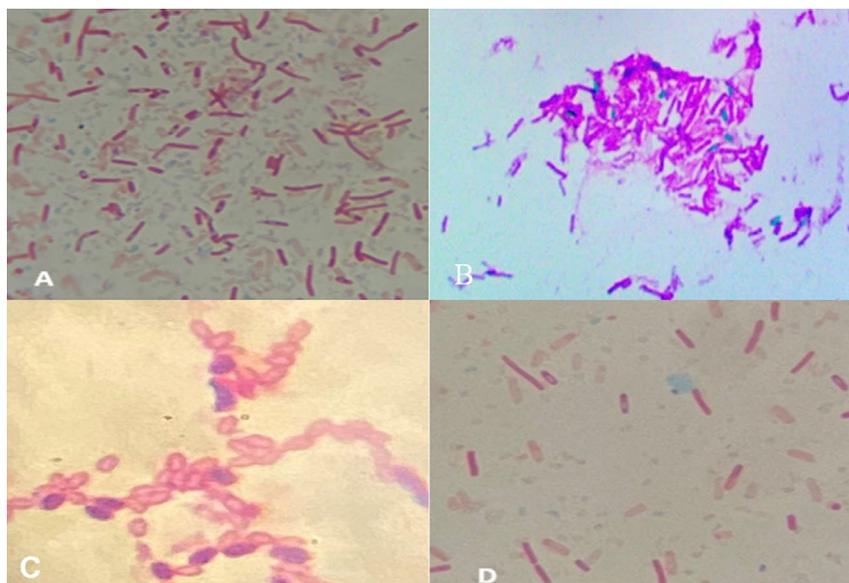
Hình 1. Tỷ lệ vi khuẩn phân lập được từ mẫu nước, bùn, đất của suối nước nóng Trường Xuân



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn ưa nhiệt phân lập từ suối nước nóng trên môi trường NA

Nghiên cứu này phân lập được 40/63 chủng vi khuẩn Gram dương, chiếm 63,5% trong bộ sưu tập chủng. Hầu hết các chủng có dạng hình que, kích thước tế bào trong khoảng 0,1-0,8 μm , trong đó 30 chủng có khả năng hình thành nội bào tử (Hình 3). Những đặc điểm này phản

ánh sự phong phú về đặc điểm hình thái và sinh học của vi khuẩn ưa nhiệt trong môi trường suối nước nóng Trường Xuân, đồng thời cho thấy khả năng thích nghi nổi bật của nhóm vi khuẩn Gram dương sinh bào tử với điều kiện nhiệt độ cao.



Hình 3. Hình dạng bào tử một số chủng phân lập dưới kính hiển vi quang học (độ phóng đại 100x). A, B, C, D lần lượt là bào tử chủng TX9, TX21, TX304 và TX302

2. Sàng lọc vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng sinh tổng hợp chitinase

Tổng cộng 63 chủng vi khuẩn ưa nhiệt được phân lập từ các mẫu thu tại suối nước nóng Trường Xuân đã được sàng lọc sơ bộ khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase bằng phương pháp cấy điểm. Kết quả cho thấy 18 chủng (chiếm 29%) thể hiện khả năng sinh enzyme chitinase với vùng phân giải chitin quan sát được trên môi trường NA có bổ sung 1% chitin.

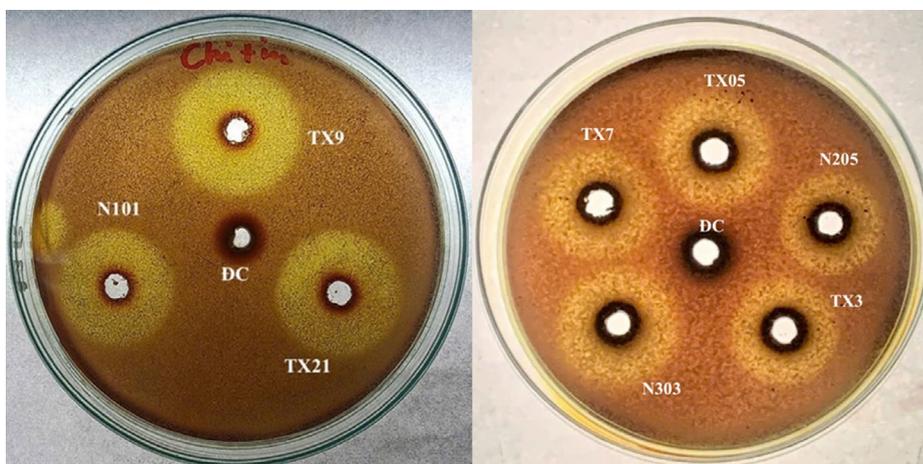
Các chủng có hoạt tính dương tính tiếp tục

được đánh giá hoạt tính enzyme chitinase bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Theo mô tả trong Bảng 1, có 4 chủng vi khuẩn gồm TX3, TX9, TX21 và N101 có khả năng sinh enzyme chitinase với vùng phân giải chitin có đường kính lớn hơn 20 mm, cụ thể là $20,33 \pm 0,58$ mm; $25,33 \pm 0,58$ mm; $21,50 \pm 0,87$ mm và $20,50 \pm 0,50$ mm. Trong đó, chủng TX9 thể hiện hoạt tính chitinase mạnh nhất (Hình 4). Do đó, chủng TX9 được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1. Kết quả sàng lọc khả năng sinh enzyme chitinase của vi khuẩn từ suối nước nóng bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch

STT	Kí hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d, mm)	STT	Kí hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d, mm)	STT	Kí hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d, mm)
1	TX3	$20,33 \pm 0,58$	7	TX05	$19,33 \pm 0,58$	13	N305	$19,17 \pm 0,76$
2	TX7	$17,17 \pm 0,29$	8	N101	$20,50 \pm 0,50$	14	N03	$18,50 \pm 0,50$
3	TX301	$16,50 \pm 0,50$	9	N103	$15,17 \pm 0,29$	15	N01	$18,33 \pm 0,58$
4	TX304	$18,17 \pm 0,76$	10	N303	$17,50 \pm 0,50$	16	N109	$15,83 \pm 0,76$
5	TX9	$25,33 \pm 0,58$	11	N306	$16,50 \pm 0,50$	17	N31	$15,33 \pm 0,58$
6	TX21	$21,50 \pm 0,87$	12	N205	$15,67 \pm 0,58$	18	N107	$15,17 \pm 0,76$

Chú thích : D-d > 25mm (rất mạnh); D-d = 20-25mm (mạnh); D-d = 10-20mm (trung bình); D-d < 10mm (yếu) (Hanh et al., 2020)



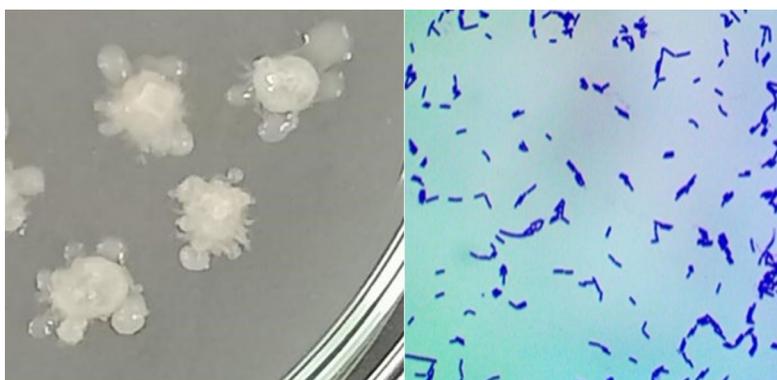
Hình 4. Kết quả sàng lọc một số chủng vi khuẩn sinh enzyme chitinase bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch

3. Đặc điểm sinh học của chủng TX9

Chủng TX9 được xác định có khuẩn lạc màu trắng đục, bề mặt xù xì, xung quanh có bong nước nhỏ. Khi quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính dầu 100x, tế bào TX9 là trực khuẩn Gram dương, có hình que, bắt màu tím (Hình 5).

Kết quả thử nghiệm sinh hóa cho thấy chủng TX9 có khả năng sử dụng citrate làm nguồn cacbon thể hiện qua sự chuyển màu của môi trường từ màu xanh lục sang xanh dương do giá trị pH tăng. Chủng này có khả năng sử dụng glucose, mannitol và citrate làm nguồn

cacbon, âm tính với lactose. Ngoài ra, chủng có khả năng di động, thể hiện qua hiện tượng sinh khối vi khuẩn mọc lan ra khỏi đường cấy và làm đục màu môi trường. Kết quả cũng cho thấy chủng TX9 âm tính với thử nghiệm Methyl Red, không xuất hiện sự thay đổi màu sau khi thêm thuốc thử. Chủng TX9 cho kết quả dương tính đối với thử nghiệm Voges Proskeuer và âm tính với phản ứng sinh indol. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử có thể thấy, sau 5 đến 7 ngày nuôi cấy, tế bào chủng TX9 có khả năng hình thành nội bào tử.



Hình 5. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào sinh dưỡng của chủng TX9 (100x)

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh hóa của chủng TX9

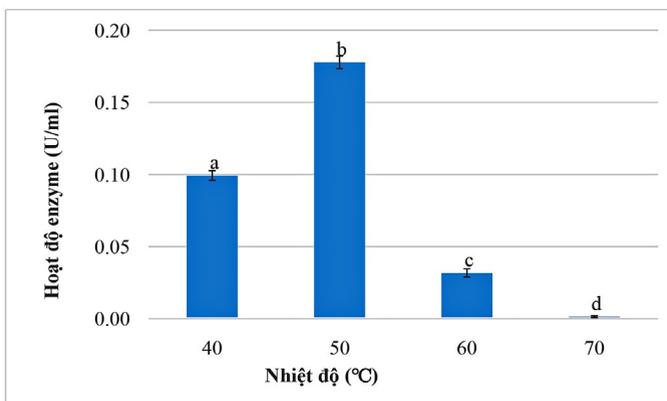
Thử nghiệm		Chủng TX9
Lên men đường	Glucose	+
	Lactose	-
	Mannitol	+
Biến dưỡng citrate		+
Khả năng di động		+
Thử nghiệm MR		-
Thử nghiệm VP		+
Phản ứng sinh indol		-
Khả năng hình thành bào tử		+
Oxydase		+
Catalase		+

Chú thích: +: dương tính; -: âm tính

4. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy vi khuẩn đến sinh tổng hợp enzyme chitinase

Kết quả ở Hình 6 cho thấy nhiệt độ nuôi cấy vi khuẩn có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt độ enzyme chitinase thu được. Chủng TX9 có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase có hoạt độ cao nhất ở 50°C là $0,178 \pm 0,004$ U/ml. Khi nhiệt độ tăng lên 60°C thì hoạt độ enzyme giảm đáng kể đến 4 lần và chủng vi khuẩn TX9 không còn khả năng sinh enzyme khi nuôi cấy ở 70°C. Kết quả này tương đồng với công bố của Chrisnasari *et al.* (2016) khi nghiên cứu nhiệt độ thích hợp cho lên men sinh tổng hợp chitinase của chủng *Paenibacillus* sp. D3 phân lập từ suối nước nóng với nhiệt độ nuôi cấy tốt nhất

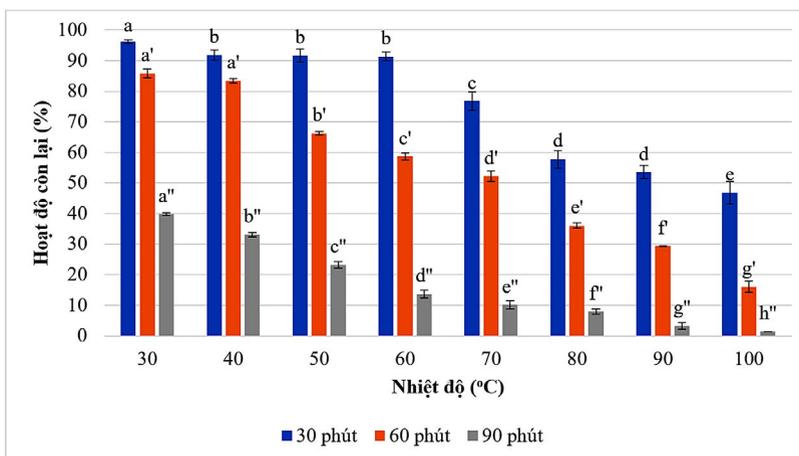
là 48°C. Năm 2023, nghiên cứu của Chrisnasari và cộng sự cũng chỉ ra rằng chủng *Bacillus licheniformis* B2 phân lập từ suối nước nóng Ljen (Indonesia) có hoạt tính chitinase cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường *Thermus* chứa chitin huyền phủ ở 50°C. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại cho kết quả về nhiệt độ nuôi cấy thích hợp cao hơn so với nghiên cứu này như chủng *Bacillus* K29-14 sinh enzyme chitinase có hoạt độ cao nhất khi nuôi cấy ở nhiệt độ là 55°C (Sri *et al.*, 2004), chủng *Bacillus* sp.13.26 là 60°C (Yuli *et al.*, 2004); đặc biệt có chủng *B. licheniformis* (Mohammad *et al.*, 2017) sinh enzyme tốt nhất ở 70°C.



Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Các ký tự a, b, c, d trên mỗi cột cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhiệt độ ($p < 0,05$).

Hình 6. Hoạt độ của enzyme chitinase khi nuôi cấy chủng TX9 ở các nhiệt độ khác nhau

5. Độ bền nhiệt của enzyme chitinase thu được



Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Các ký tự khác nhau trên mỗi cột cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hình 7. Khả năng bền nhiệt của enzyme chitinase thu được từ chủng TX9

Kết quả ở Hình 7 cho thấy hoạt độ enzyme chitinase của chủng TX9 được duy trì ở khoảng nhiệt độ khá cao (50 ÷ 70°C) trong 60 phút. Tại các nhiệt độ khảo sát, enzyme chitinase bền nhất ở 50°C; hoạt độ chitinase còn 91,65% sau 30 phút và 66,23% sau 60 phút. Hoạt động được duy trì trên 50% sau khi xử lý ở 70°C trong 60 phút và 90°C trong 30 phút. Chitinase do chủng TX9 sinh ra có độ bền nhiệt cao hơn so với một số nghiên cứu khác, như nghiên cứu của Chrisnasari và cộng sự năm 2023 cho thấy hoạt tính của chitinase do chủng *B. licheniformis* B2 phân lập từ suối nước nóng Ijen (Indonesia) chỉ duy trì trên 50% sau khi xử lý ở 70°C trong 30 phút; hoặc nghiên cứu của Cheba và cộng sự (2016) cũng cho thấy hoạt tính chitinase của chủng *Bacillus* sp. R2 duy trì trên 50% sau 30 phút ở 50°C.

Nhìn chung, hầu hết các chitinase bền nhiệt ở khoảng nhiệt độ 50 ÷ 60°C và giảm hoạt tính đáng kể ở nhiệt độ cao hơn và thời gian ủ kéo dài. Đặc tính ổn định nhiệt cao của enzyme chitinase bền nhiệt có ưu thế lớn trong việc xử lý các phế liệu trong quá trình chế biến thủy sản ở điều kiện nhiệt độ cao.

5. Định danh chủng vi khuẩn tiềm năng

Đoạn trình tự 16S rRNA (687 bp) của chủng TX9 thu được sau khi giải trình tự được sử dụng để so sánh trình tự tương đồng với các chủng trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen (NCBI), kết quả được thể hiện ở Bảng 4. Chủng HBUAS74269 có nguồn gốc từ Trung Quốc, chủng KW55P có nguồn gốc từ suối khoáng nóng ở Malaysia, và chủng VKSKT3 có nguồn gốc từ Việt nam được chọn để so sánh kết quả tương đồng với chủng TX9.

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự tương đồng đoạn gen 16S rRNA của chủng TX9

Chủng khảo sát	Loài tương đồng	Chủng, nguồn gốc	Tỷ lệ tương đồng	Mã số của trình tự tham chiếu
TX9	<i>Bacillus licheniformis</i>	HBUAS74269, Trung Quốc	99,85%	PQ326731.1
	<i>Bacillus licheniformis</i>	KW55P, suối khoáng nóng ở Malaysia	99,85%	MH424451.1
	<i>Bacillus licheniformis</i>	VKSKT3, Việt Nam	99,85%	MT279499.1

Kết quả phân tích cho thấy đoạn trình tự gen 16S rRNA của chủng TX9 có độ tương đồng cao nhất (99,85%) với các chủng thuộc loài *Bacillus licheniformis* (Bảng 3). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu phân lập vi khuẩn ưa nhiệt từ suối khoáng nóng của nhóm Mohammad (2017) và nhóm Guta (2024). Các nghiên cứu này đều cho thấy *Bacillus* là chi vi khuẩn phổ biến nhất được phân lập từ các suối nước nóng, trong đó loài *Bacillus licheniformis* là một trong những loài chiếm ưu thế. *B. licheniformis* được biết đến là một loài vi khuẩn hình thành bào tử phân bố rộng rãi như một vi sinh vật hoại sinh trong môi trường (Mohammad *et al.*, 2017;

Guta *et al.*, 2024). Ngoài chitinase, chủng *B. licheniformis* còn có khả năng sinh tổng hợp nhiều enzyme ngoại bào bền nhiệt như: amylase, protease, cellulase và gelatinase, có tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp, nông nghiệp và môi trường (Mohammad *et al.*, 2017).

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 63 chủng vi khuẩn ưa nhiệt từ suối nước nóng, trong đó có 29% chủng có khả năng sinh tổng hợp chitinase. Chủng TX9 là chủng ưa nhiệt có khả năng sinh enzyme chitinase mạnh nhất có hoạt tính cao nhất với kích thước vòng phân giải chitin lên đến 25,33 ± 0,58 mm. Chủng

TX9 sinh enzyme chitinase có hoạt tính cao nhất khi nuôi cấy ở nhiệt độ 50°C với tốc độ lắc 180 rpm/phút và enzyme chitinase có khả năng bền nhiệt từ 50°C-70°C trong 60 phút. Dựa trên những kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh lý sinh hóa, kết quả phân tích trình tự gen16S rRNA, chủng TX9 được xác định thuộc loài *Bacillus licheniformis* với độ tương đồng 99,85%. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng vi khuẩn ưa

nhệt *Bacillus licheniformis* TX9 là chủng tiềm năng để sản xuất enzyme chitinase bền nhiệt để ứng dụng xử lý phế liệu thủy sản, nông nghiệp và trong các lĩnh vực công nghiệp khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài nghiên cứu khoa học Trường Đại học Nha Trang (mã số: TR2024-13-08). Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ quý báu đó!

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Phạm Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa (2006), *Công nghệ Sinh học: Enzyme và ứng dụng (Tập 3)*, NXB Giáo dục Hà Nội.
2. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trân Châu, và Nguyễn Lâm Dũng (1982), *Enzyme vi sinh vật (Tập 1, Tập 2)*, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
3. Trần Linh Thuộc (2010), *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước thực phẩm và mỹ phẩm*, NXB giáo dục Hà Nội.

Tài liệu tiếng Anh

4. Abu Bakar, A., Mohd Rasol, R., Yahaya, N., Noor, N. M., and bin Mohd Ali, M. K. F. (2015), "Turbidity method to measure the growth of anaerobic bacteria related to microbiologically influenced corrosion", *Solid state phenomena*, 227, pp. 298-301.
5. Aliabadi, N., Aminzadeh, S., Karkhane, A. A., and Haghbeen, K. (2016), "Thermostable chitinase from *Cohnella* sp. A01: isolation and product optimization", *Brazilian journal of microbiology*, 47(4), pp. 931-940.
6. Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M., and Sani, R. K. (2013), "Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes", *Bioresource technology*, 128, pp. 751-759.
7. Cheba, B.A., Zaghloul, T.I., EL-Mahdy, A.R. and EL-Massry, M.H. (2016), "Effect of pH and temperature on *Bacillus* sp. R2 chitinase activity and stability", *Procedia Technology*, 22, pp. 471-477.
8. Chrisnasari, R., Sutanto, L.P., Paulina, D., Wahjudi, A. and Pantjajani, T. (2023), "Thermostable Chitinase Producing Bacterium from Ijen Hot Spring–Indonesia: Isolation, Identification, and Characterization", *In E3S Web of Conferences, Volume 374, The 3rd International Conference on Natural Resources and Life Sciences (NRLS) 2020*, Vol. 374, No. 00032. EDP Sciences.
9. Dai, D.H., Hu, W.L., Huang, G.R. and Li, W. (2011), "Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1", *African Journal of biotechnology*, 10(13), pp. 2476-2485.
10. De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., Parte, A. C. and Whitman, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Three - The Firmicutes*. Springer.
11. Guta, M., Abebe, G., Bacha, K., Cools, P. (2024), "Screening and characterization of thermostable

- enzyme-producing bacteria from selected hot springs of Ethiopia”, *Microbiol Spectrum*, 12(3), e03710-23.
12. Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., and Javed, S. (2013), “Chitinases: an update”, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(1), pp. 21-29.
 13. Hanh, T.; Dao, T.; An, L.; Thuong, L. (2020), “Isolation and selection of chitinase-producing bacteria with antifungal activity against fusarium oxysporum from liliunrhizosphere soil”, *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, 18 (11), pp. 965-975.
 14. Jabeen, F., and Qazi, J. I. (2014), “Isolation of chitinase yielding *Bacillus cereus* JF68 from soil employing an edible crab shell chitin”, *Journal of scientific and industrial research*, 73, pp. 771-776.
 15. John G. H., Peter H.S. and Nobel R.K. (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth edition. Lippincott Williams and Wilkins, United States, pp. 9-754.
 16. Li, A.N., Ding, A.Y., Chen, J., Liu, S.A., Zhang, M. and Li, D.-C. (2007), “Purification and characterization of two thermostable proteases from the thermophilic fungus chaetomium thermophilum”, *Journal of microbiology and biotechnology*, 17, pp. 624–631
 17. Mathai, P. P., Zitomer, D. H., and Maki, J. S. (2015), “Quantitative detection of syntrophic fatty acid-degrading bacterial communities in methanogenic environments”, *Microbiology*, 161(6), pp. 1189-1197.
 18. Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., and Kennes, C. (2017), “Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes”, *International journal of microbiology*, 2017(1), 6943952.
 19. Mong, T. K., Le Thi Thanh Van, N. V., and Phong, N. H. T. (2022), “Isolation and molecular identification of obligate thermophiles from hot springs in Ba Ria–Vung Tau and Khanh Hoa provinces, Vietnam”, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20(2), pp. 379-386.
 20. Oziengbe, E.O., and Onilude, A.A. (2012), “Production of a thermostable α -amylase and its assay using *Bacillus licheniformis* isolated from excavated land sites in Ibadan, Nigeria”, *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 5(1), pp. 132–138.
 21. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., and Mohan, R. (2000), “Advances in microbial amylases”, *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 135-152.
 22. Pinzón-Martínez DL, Rodríguez-Gómez C, Miñana-Galbis D, Carrillo-Chávez JA, Valerio-Alfaro G, Oliart-Ros R (2010), “Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications”, *Environment Technology*, 31(8-9), 957-966.
 23. Rameshthangam, P., Solairaj, D., Arunachalam, G., and Ramasamy, P. (2018), “Chitin and Chitinases: biomedical and environmental applications of chitin and its derivatives”, *Journal of Enzymes*, 1(1), 20-43.
 24. Reysenbach, A.L., Voytek, M. and Mancinelli, R. (2001), *Thermophiles: Biodiversity, Ecology, and Evolution: Biodiversity, Ecology, and Evolution*, Springer Science and Business Media.
 25. Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N., and Sharma, P. (2011), “Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme”, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10, pp. 309-326.
 26. Stratton, C., (2008). *Manual of Clinical Microbiology*, Edited by Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, and Michael A. Pfaller Washington, DC: ASM Press, 2007 2488 pp., illustrated. \$209.95 (hardcover). *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), p.153.
 27. Tehei, M., and Zaccai, G. (2005), “Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in complex systems”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1724(3), 404-410.

28. Toharisman, A., Suhartono, M.T., Spindler-Barth, M., Hwang, J.K. and Pyun, Y.R. (2005), “Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), pp. 733-738.
29. Turner, P., Mamo, G., and Karlsson, E. N. (2007), “Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining”, *Microbial cell factories*, 6, pp. 1-23.
30. Verma A., Gupta M., Shriko, P. (2014), “Isolation and characterization of thermophilic bacteria in natural hot water springs of Himachal Pradesh (India) “, *The Bioscan* ,9(3), pp. 947-952.
31. Yuli, P.E., Suhartono, M.T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K. and Pyun, Y.R. (2004), “Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the indonesian *Bacillus* sp. 13.26”, *Enzyme and microbial technology*, 35(2-3), pp. 147-153.