

# PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN TỪ VỎ TÔM LỘT XÁC CÓ KHẢ NĂNG CẮT MẠCH CHITOSAN

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAL STRAINS FROM MOULTED SHRIMP SHELLS FOR CHITOSAN DEGRADATION

Nguyễn Công Minh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thông<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Hải<sup>1</sup>,  
Phạm Thị Mai<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Hòa<sup>2</sup>, \*, Trang Sĩ Trung<sup>2</sup>

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

2. Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Hòa, (Email: [hoanv@ntu.edu.vn](mailto:hoanv@ntu.edu.vn))

Ngày nhận bài: 16/10/2023; Ngày phân biên thông qua: 13/12/2023; Ngày duyệt đăng: 15/12/2023

### TÓM TẮT

Cắt mạch chitosan bằng tác nhân sinh học đặc biệt là sử dụng vi khuẩn đang ngày càng được quan tâm vì tính an toàn và thân thiện với môi trường. Bài báo này trình bày kết quả phân lập và định danh một số chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chitosan từ vỏ lột xác tôm. Kết quả phân lập thu được 18 chủng vi khuẩn, trong số đó 3 chủng S3.3V; S4.2T; S5.2V có khả năng cắt mạch chitosan mạnh. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA đã xác định S3.3V, S4.2T và S5.2V lần lượt là *Shewanella chilikensis* (tỷ lệ tương đồng 100%), *Sphingobacterium mizutaii* (tỷ lệ tương đồng 99%) và *Macrococcus armenti* (tỷ lệ tương đồng 100%).

**Từ khóa:** Cắt mạch chitosan, chitosan phân tử lượng thấp, vỏ lột xác

### ABSTRACT

The degradation of chitosan using biological agents, especially bacteria, has been increasingly receiving attention because of its safety and environmental friendliness. This paper presents the isolation and identification of some bacterial strains from moulted shrimp shells that could be used to degrade chitosan. There were 18 bacterial strains isolated. Three of them, S3.3V, S4.2T, and S5.2V strains, had the strong chitosan degradation ability. The 16S rRNA gene sequencing method indicated that S3.3V, S4.2T, and S5.2V were *Shewanella chilikensis* (similarity ratio: 100%), *Sphingobacterium mizutaii* (similarity ratio: 99%) and *Macrococcus armenti* (similarity ratio: 100%), respectively.

**Keywords:** Chitosan degradation, low molecular weight chitosan, moulted shrimp shells

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitosan phân tử lượng thấp thường có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa cao, do đó chúng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau [1, 2, 3]. Chitosan phân tử lượng thấp có thể được tạo ra từ quá trình cắt mạch chitosan có phân tử lượng cao hơn với các tác nhân cắt mạch hóa học (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,...), tác nhân vật lý (tia gamma, vi sóng, sóng siêu âm), hoặc tác nhân sinh học (enzyme, vi khuẩn,...) [4, 5]. Các tác nhân hóa-lý có ưu điểm là hiệu quả cao và dễ áp dụng để sản xuất ở quy mô lớn. Tuy nhiên, sản phẩm thu được có tính ổn định về chất lượng chưa cao. Hơn nữa, sản phẩm có thể chứa hóa chất chưa phản ứng hết và nguy cơ cao gây ô nhiễm môi trường do chất thải từ quá trình sản xuất. Trong khi đó, sử

dụng các tác nhân sinh học sẽ an toàn hơn với môi trường và người lao động, đồng thời sản phẩm thường có độ tinh sạch cao.

Các công bố trước đây cho thấy, tác nhân sinh học thường sử dụng trong cắt mạch chitosan là chitosanase, chitinase [6, 7, 8] vi khuẩn [9] hoặc vi nấm [10]. Trong đó, vi khuẩn là tác nhân được sử dụng nhiều cho quá trình cắt mạch chitin/chitosan. Một số chủng vi khuẩn sử dụng cắt mạch chitosan đã được nghiên cứu như *Bacillus sp.* [11], hoặc vi khuẩn thuộc chi *Janthinobacterium* [12]. Tốc độ cắt mạch chitin/chitosan có mối tương quan với sự đa dạng của hệ vi khuẩn [13]. Bên cạnh đó, các yếu tố như nhiệt độ, độ pH hoặc giai đoạn sinh trưởng của vi sinh vật có tác động quan trọng đến quá trình phân huỷ chitin/chitosan [14, 15, 16]. Trong các

hệ sinh thái, vi khuẩn [14, 17] hoặc vi sinh vật, vi nấm trên vỏ của động vật giáp xác [18] được xem là tác nhân của quá trình phân huỷ chitin. Theo Vrba và cộng sự (1994), các enzyme được giải phóng trong quá trình lột xác của động vật giáp xác cũng được xem là nguồn enzyme phân huỷ chitin/chitosan [19]. Tuy nhiên, các số liệu chứng minh quá trình giải phóng enzyme từ hệ vi sinh này vẫn chưa rõ ràng.

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên các chủng vi khuẩn có khả năng cắt mạch chitosan từ vỏ tôm lột xác được phân lập, xác định hình thái và định danh từ đó định hướng sử dụng trong các nghiên cứu cắt mạch chitosan trạng thái rắn ở quy mô phòng thí nghiệm.

## II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Nguyên vật liệu

Mẫu vỏ tôm lột xác được thu nhận 3 đợt từ các ao nuôi tôm đáy bạt thuộc trại Chính Mỹ (xã Ninh Phú, thị xã Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa) ở thời điểm nuôi tôm các tháng 3, 8, 10/2022. Các mẫu vỏ tôm lột xác được thu nhận khi xi-phông từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng và được bảo quản trong các túi thu mẫu ở 4°C, vận chuyển đến phòng thí nghiệm và tiến hành thí nghiệm.

Chitosan sử dụng trong thí nghiệm có dạng bột,  $M_w$  380 – 410 kDa, độ deacetyl 80 - 85%, kích thước 35 mesh size, độ nhớt 430 – 440 mPa.s được sản xuất từ vỏ tôm thẻ chân trắng theo quy trình của Trang Sĩ Trung và cộng sự, 2020 [20]. Chitosan được bảo quản ở 4 ÷ 8°C trong điều kiện chân không. Các hoá chất, môi trường nuôi cấy sử dụng trong nghiên cứu đạt tiêu chuẩn sử dụng cho phân tích.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Phân lập chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải chitosan

Cân 2,5 g mẫu vỏ tôm lột xác cho vào bình chứa 50 mL môi trường lỏng chọn lọc chứa chitosan (0,5%) với thành phần gồm:  $KH_2PO_4$  2g/l;  $(NH_4)_2SO_4$  4,2g/l; Urea 0,2g/l;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0,3g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,3g/l; pepton 1g/l; chitosan 5g/l; Tween 80 2g/l; 2% v/v dịch vi lượng [0,5%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,16%  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ; 0,14%  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,2%  $CoCl_2$ ]; pH 7

và lactic acid với tốc độ 150 vòng/phút trong 72 giờ ở 37°C để tăng sinh các chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải chitosan. Sau nuôi cấy tăng sinh, mẫu này được sử dụng để phân lập vi khuẩn trên môi trường Luria Bertani Agar (LB - Agar: Casein 10g/l; Cao nấm men 5g/l; NaCl 10g/l; Agar 1,5% (w/v)) nhằm lựa chọn các khuẩn lạc có khả năng phát triển mạnh. Các khuẩn lạc đã lựa chọn được cấy ria trên cùng loại môi trường phân lập nhằm từng bước làm thuần các khuẩn lạc vi khuẩn [21, 22].

#### 2.2. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính enzyme phân giải chitosan

Các khuẩn lạc phân lập được từ vỏ tôm lột xác được tuyển chọn thông qua khả năng sinh chitosanase và khả năng cắt mạch chitosan ở trạng thái rắn trong môi trường dịch thể.

+ Thu nhận dịch enzyme thô:

Khuẩn lạc vi khuẩn sau làm thuần được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường lỏng chứa chitosan (mức 2.1) ở 37°C. Sau 72 giờ, dịch nuôi cấy vi khuẩn được lọc và ly tâm 4°C, 5000rpm/15 phút trên thiết bị ly tâm HERMLE Z326K để thu dịch enzyme thô.

+ Phương pháp xác định chủng có hoạt tính enzyme chitosanase

Các đĩa thạch (gồm agar 1,5%, chitosan 0,5%) được chuẩn bị sẵn. Đục giếng có kích thước lỗ 5mm trên đĩa thạch và nhỏ 50µl dịch enzyme thô đã chuẩn bị vào giếng, ủ đĩa trong 3 giờ cho dịch khuếch tán đều xung quanh giếng thạch. Vùng trong suốt xuất hiện xung quanh giếng thạch được xác định là vùng đã xảy ra quá trình thủy phân chitosan. Quan sát và đo kích thước vòng phân giải chitosan xung quanh giếng thạch để đánh giá khả năng sinh enzyme chitosanase của các chủng phân lập [23]. Kích thước vòng phân giải chitosan của các chủng phân lập được tính theo công thức.

$$K = (D-d)$$

Trong đó: K là kích thước vòng phân giải (mm); D là đường kính vòng trong suốt (mm); d là đường kính giếng thạch (mm)

+ Xác định khả năng cắt mạch chitosan của chủng vi khuẩn phân lập

Chủng vi khuẩn có hoạt tính chitosanase đã xác định ở trên là các khuẩn lạc có khả năng

cắt mạch chitosan. Để thử nghiệm khả năng cắt mạch chitosan, 10 mL dịch enzyme thô được bổ sung vào bình chứa 5g chitosan + 85 mL nước cất và tiến hành ủ ở 37°C trong 12 giờ. Sau cắt mạch, phần rắn chitosan được thu hồi sau đó rửa sạch, sấy khô và đo độ nhớt biểu kiến để xác định mức độ suy giảm độ nhớt chitosan sau cắt mạch so với mẫu chitosan ban đầu. Mẫu đối chứng (control) được tiến hành tương tự như mẫu có dịch enzyme nhưng 10 mL dịch enzyme thô được thay bằng 10 mL nước cất. Mức độ suy giảm độ nhớt của mẫu chitosan sau cắt mạch so với chitosan ban đầu được tính theo công thức:

$$A = \frac{V_0 - V_x}{V_0} * 100$$

Trong đó: A là mức độ suy giảm độ nhớt của chitosan cắt mạch bằng dịch enzyme thô (%),  $V_0$  là độ nhớt biểu kiến của chitosan ban đầu (mPa.s),  $V_x$  là độ nhớt biểu kiến của chitosan sau cắt mạch (mPa.s).

### 2.3. Định danh chủng vi khuẩn tuyển chọn

+ Xác định sơ bộ hình thái và test sinh hóa của chủng tuyển chọn

Các khuẩn lạc tuyển chọn được xác định hình thái thông qua phương pháp nhuộm Gram và thực hiện một số test hóa sinh catalase, oxidase, indol, lên men glucose,  $H_2S$ , urea để xác định sơ bộ tính chất của vi khuẩn.

+ Định danh chủng bằng giải trình tự gen 16S rRNA

Khuẩn lạc tuyển chọn được định danh bằng sinh học phân tử thông qua đoạn gen 16S rRNA. Kết quả giải trình tự gen nhận được từ Công ty TNHH DV TM Nam Khoa, sử dụng phần mềm Geneious 2019 và so sánh độ tương đồng của trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National

Center for Biotechnology Information) bằng chương trình BLAST.

### 3. Phương pháp phân tích chitosan

Độ nhớt biểu kiến chitosan được xác định bằng nhớt kế Brookfield [5]. Hàm lượng khoáng, protein của chitosan được xác định theo phương pháp của AOAC (1990) [24]. Độ deacetyl của chitosan được xác định theo phương pháp của Tao và cộng sự (2008) [2]. Khối lượng phân tử chitosan được xác định bằng phương pháp nội suy từ độ nhớt nội [25].

### 4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu báo cáo là kết quả trung bình của 3 lần phân tích và được xử lý sai số thống kê bằng phần mềm SPSS. Các đồ thị được vẽ bằng phần mềm OriginPro 8.0.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Kết quả phân lập chủng vi khuẩn có hoạt tính cắt mạch chitosan

Hệ vi khuẩn bám trên vỏ tôm trong ao đáy bạt phụ thuộc chủ yếu vào nguồn nước ao nuôi, thức ăn và chế phẩm vi sinh sử dụng cho ao nuôi. Vì vậy, mẫu thí nghiệm phân lập vi khuẩn được thu nhận 3 đợt theo các vụ nuôi tôm trong năm để có thể thu được hệ vi khuẩn đa dạng trong môi trường nuôi.

Trong môi trường nuôi cấy lỏng chọn lọc chứa chitosan, các vi khuẩn có khả năng cắt mạch chitosan được ưu tiên phát triển. Khi phân lập trên môi trường LB - Agar, các khuẩn lạc có hình thái khác nhau được làm thuần. Kết quả thí nghiệm đã phân lập và làm thuần được 18 khuẩn lạc vi khuẩn từ dịch nuôi cấy lỏng chọn lọc của 3 đợt thu mẫu (đợt 1 thu được 5 khuẩn lạc, đợt 2 thu được 4 khuẩn lạc, đợt 3 thu được 9 khuẩn lạc). Đặc điểm các vi khuẩn phân lập được thể hiện ở Bảng 1.

**Bảng 1. Đặc điểm các khuẩn lạc vi khuẩn phân lập từ 3 mẫu vỏ tôm lột xác**

STT	Mã hóa khuẩn lạc	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc sau 72h nuôi cấy	Hình thái tế bào	Nhuộm Gram
1	S3.1V	Khuẩn lạc tròn, >5 mm, bìa nguyên, màu vàng nhạt	Hình que ngắn, dạng đơn	G <sup>-</sup>
2	S3.1T	Khuẩn lạc tròn, <1 mm bìa nguyên, màu trắng sữa	Hình que ngắn, có bào tử	G <sup>+</sup>
3	S3.2V	Khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, màu nâu nhạt, trong suốt	Hình que dài, mảnh	G <sup>-</sup>

STT	Mã hóa khuẩn lạc	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc sau 72h nuôi cấy	Hình thái tế bào	Nhuộm Gram
4	S3.2T	Khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, màu trắng đục	Hình que ngắn, dạng đơn/đôi	G <sup>-</sup>
5	S3.3V	Khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, màu nâu	Hình que ngắn, dạng đơn	G <sup>-</sup>
6	S4.1V	Khuẩn lạc tròn, <1mm, bìa nguyên, màu vàng nhạt	Hình que ngắn, dạng đơn	G <sup>-</sup>
7	S4.1T	Khuẩn lạc tròn, < 1mm, bìa nguyên, màu trắng đục	Hình cầu nhỏ, dạng đôi	G <sup>+</sup>
8	S4.2T	Khuẩn lạc tròn, > 5mm bìa nguyên, màu vàng	Hình que ngắn, to, 2 đầu tròn, dạng đơn hoặc đôi	G <sup>-</sup>
9	S4.2V	Khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, màu vàng nhạt	Hình que ngắn, dạng đơn	G <sup>-</sup>
10	S5.1V	Khuẩn lạc tròn, < 1mm bìa nguyên.	Hình que ngắn, dạng đơn/đôi	G <sup>-</sup>
11	S5.1T	Khuẩn lạc tròn, < 1mm, bìa nguyên, màu trắng sữa	Hình que ngắn, dạng đơn	G <sup>-</sup>
12	S5.2V	Khuẩn lạc tròn, < 1mm, bìa nguyên, màu vàng	Hình cầu, dạng đơn hoặc đôi	G <sup>+</sup>
13	S5.2T	Khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, màu trắng đục	Hình cầu nhỏ, dạng đơn	G <sup>+</sup>
14	S5.3V	Khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, màu nâu	Hình que ngắn, dạng đơn	G <sup>-</sup>
15	S5.3T	Khuẩn lạc tròn, < 1mm, bìa nguyên, trắng đục	Hình que ngắn, dạng đơn	G <sup>-</sup>
16	S5.4T	Khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, màu trắng đục	Hình que dài, mảnh dạng đơn	G <sup>-</sup>
17	S5.4V	Khuẩn lạc tròn, >5mm, bìa nguyên, màu nâu	Hình que dài, dạng đơn	G <sup>-</sup>
18	S5.5T	Khuẩn lạc tròn, bìa hơi lồi, màu trắng đục	Hình que ngắn, dạng đơn/đôi	G <sup>+</sup>

Như vậy, trên mẫu vỏ tôm thu nhận trong vụ nuôi tôm tháng 10 phân lập được nhiều khuẩn lạc vi khuẩn hơn so với vụ nuôi tháng 3 và tháng 8. Chứng tỏ, hệ vi sinh vật trong ao nuôi tôm tháng 10 phong phú hơn so với các tháng khác trong năm. Qua 3 đợt mẫu thu nhận được 13/18 khuẩn lạc vi khuẩn thuộc nhóm Gram (-), đa số tế bào dạng hình que, có dạng khuẩn lạc tròn, tron bóng điều này cho thấy sự đa dạng của các vi khuẩn trong mẫu ban đầu, đồng thời là nguồn phong phú để thực hiện các thử nghiệm tiếp theo.

## 2. Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính enzyme cắt mạch chitosan

### 2.1. Sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chitosan

18 chủng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi

cấy trong môi trường lỏng với cơ chất cảm ứng chitosan để sinh ra enzyme chitosanase (nếu có). Trong thí nghiệm, dịch ly tâm chứa enzyme thô sẽ khuếch tán ra xung quanh giếng thạch, thủy phân chitosan trong đĩa thạch tạo vòng phân giải (vòng trong suốt). Thí nghiệm đo kích thước vòng phân giải sẽ đánh giá được hoạt tính chitosanase của các chủng thử nghiệm. Kích thước vòng phân giải chitosan của dịch nuôi cấy các chủng phân lập thể hiện trên Bảng 2.

Kết quả cho thấy, đường kính vòng phân giải chitosan của 18 chủng vi khuẩn dao động từ 4,1 – 28,5 mm trong đó đường kính vòng phân giải của các chủng S3.3V, S4.2T, S5.2V có kích thước lần lượt là 22,9; 28,5 và 24,4 mm. Đường kính vòng phân giải của chủng

**Bảng 2. Kích thước vòng phân giải chitosan của các chủng lạc phân lập**

Ký hiệu chủng	Kích thước vòng phân giải (D -d) mm	Ký hiệu chủng	Kích thước vòng phân giải (D -d) mm	Ký hiệu chủng	Kích thước vòng phân giải (D -d) mm
S3.1V	6,4 ± 4,5	S4.1 T	6,7 ± 2,2	S5.2T	14,4 ± 3,7
S3.1T	8,5 ± 03	S4.2 V	5,8 ± 3,1	S5.3V	11,5 ± 1,6
S3.2V	5,3 ± 4.1	<b>S4.2T</b>	<b>28,5 ± 5,3</b>	S5.3T	13,7 ± 0,7
S3.2T	4,1 ± 3,5	S5.1V	7,5 ± 2,5	S5.4T	12,4 ± 2,5
<b>S3.3V</b>	<b>22,9 ± 3,1</b>	S5.1 T	8,3 ± 3,6	S5.4V	12,5 ± 2,6
S4.1V	8,4 ± 3,2	<b>S5.2 V</b>	<b>24,4 ± 6,2</b>	S5.5T	12,4 ± 4,1

S3.2T có kích thước nhỏ nhất là 4,1 mm. Các chủng có kích thước vòng phân giải >20 mm được đánh giá là chủng có khả năng phân giải chitosan mạnh. Theo Lê Thị Mai và cộng sự 2020, chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập từ mẫu đất thu nhận được, vòng phân giải cũng có kích thước từ 11 đến 20 mm [26].

Như vậy S3.3V, S4.2T và S5.2V là các chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải chitosan mạnh nhất trong số 18 chủng phân lập, do vậy các chủng này được kỳ vọng có khả năng thủy phân chitosan tốt nhất nên được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

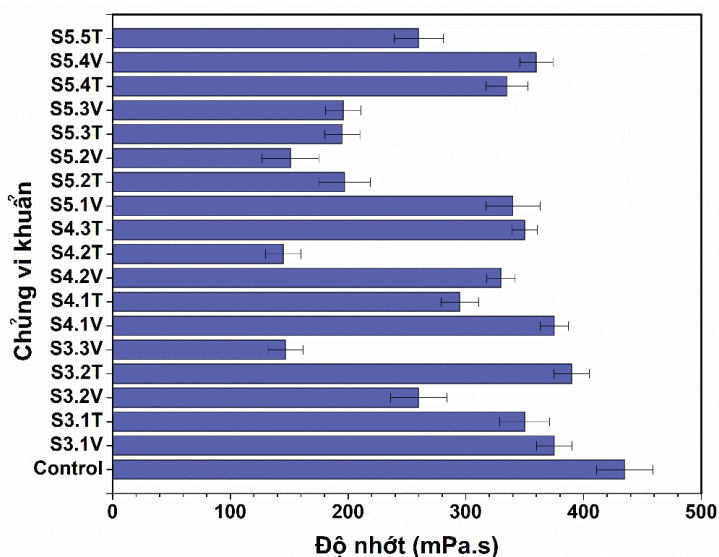
**2.2. Kết quả xác định khả năng cắt mạch chitosan của chủng vi khuẩn phân lập**

Trong môi trường chứa chitosan là nguồn carbon duy nhất, vi khuẩn thường tiết ra các enzyme ngoại bào nhằm mục đích cắt liên kết β - (1-4) - glycosidic hình thành nên các đơn

phân β - D - glucosamine để sử dụng. Quá trình cắt đứt các liên kết β - (1-4) - glycosidic sẽ làm giảm khối lượng phân tử chitosan từ đó làm giảm độ nhớt biểu kiến của chúng [5]. Do vậy, sự suy giảm độ nhớt biểu kiến sau quá trình cắt mạch là thông số để xác định mức độ cắt mạch chitosan của các chủng vi khuẩn.

Kết quả Bảng 2 cho thấy, các chủng vi khuẩn đã phân lập từ vỏ tôm đều có khả năng cắt mạch chitosan do đều tạo ra vòng phân giải chitosan với kích thước khác nhau. Tuy nhiên cần tuyển chọn, xác định chủng vi khuẩn có khả năng cắt mạch chitosan mạnh nhất thông qua quá trình cắt mạch chitosan ở trạng thái rắn. Kết quả xác định độ nhớt biểu kiến chitosan sau cắt mạch được thể hiện ở Hình 1.

Kết quả Hình 1 cho thấy độ nhớt chitosan sau cắt mạch dao động trong khoảng 145 – 390 mPa.s (giảm 10 – 67 % so với mẫu đối chứng



**Hình 1. Độ nhớt chitosan sau cắt mạch bằng dịch enzyme thô thu nhận từ các chủng vi khuẩn phân lập.**

(mẫu chitosan đối chứng có độ nhớt 435 mPa.s). Trong 18 vi khuẩn thử nghiệm có 6 chủng (S5.3V; S5.3T; S5.2T; S5.2V; S4.2T và S3.3V) có khả năng cắt mạch chitosan mạnh với mức độ suy giảm độ nhớt đạt trên 50% so với đối chứng.

Độ nhớt của các mẫu chitosan cắt mạch bằng các chủng S5.3V, S5.3T, S5.2T đạt lần lượt là 196, 195, 197mPa.s và không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên, chitosan cắt mạch bằng các chủng S3.3V, S4.2T và S5.2V có mức suy giảm độ nhớt cao hơn, độ nhớt chitosan sau cắt mạch đạt lần lượt là 147, 145, 151 mPa.s (giảm 66,2; 66,7; 65,3% so với đối chứng). Kết quả này cũng phù hợp với thí nghiệm sàng lọc xác định vòng phân giải. Đây

đều là các chủng vi khuẩn cho kích thước vòng phân giải chitosan >20mm.

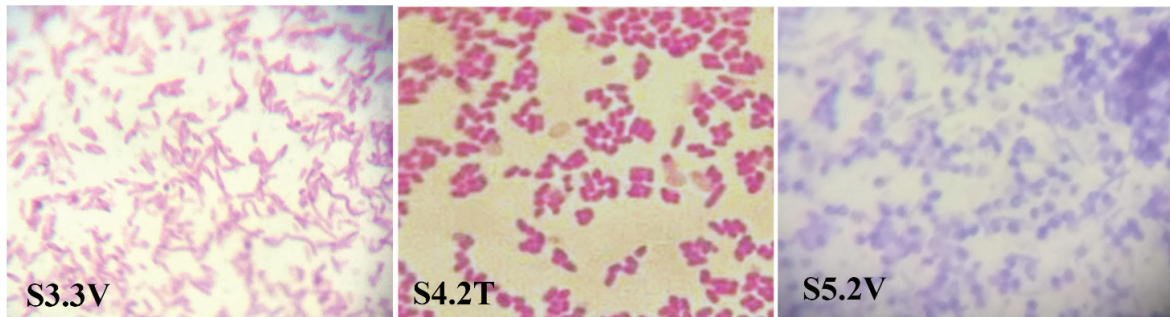
Như vậy, S3.3V, S4.2T và S5.2V thu nhận từ 3 đợt phân lập là các chủng vi khuẩn có khả năng cắt mạch chitosan mạnh. Tất cả 3 chủng vi khuẩn trên sẽ được lựa chọn để thực hiện các đánh giá về hình thái tế bào, khả năng bắt màu gram, test hoá sinh và định danh bằng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA.

### 3. Kết quả xác định hình thái và định danh vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA.

Kết quả đặc điểm hình thái tế bào và một số test sinh hóa của khuẩn lạc tuyển chọn được thể hiện trong Bảng 3 và Hình 2.

**Bảng 3. Hình thái tế bào và một số test sinh hóa của chủng tuyển chọn**

Khuẩn lạc	Hình thái tế bào (x100)	Test hóa sinh sơ bộ					
		Catalase	Oxidase	Indol	Glucose	Urea	H <sub>2</sub> S
S3.3V	Hình que ngắn mảnh, dạng đơn	+	+	-	+	+	+
S4.2T	Hình que ngắn, to, 2 đầu tròn, dạng đơn hoặc đôi	+	+	-	+	-	+
S5.2V	Hình cầu đơn/đôi	+	-	-	+	+	-



**Hình 2. Hình thái nhuộm Gram của 3 chủng vi khuẩn dưới kính hiển vi quang học (vật kính x100).**

Chủng S3.3V là vi khuẩn Gram âm, tế bào hình que ngắn, khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, màu nâu, tổng hợp được enzyme catalase, oxidase, dương tính với các test glucose, urea, H<sub>2</sub>S và âm tính với test indol. S4.2T là vi khuẩn Gram âm, khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, màu vàng, tế bào vi khuẩn có hình que ngắn, 2 đầu tròn, dạng đơn hoặc đôi, có khả năng sinh catalase, oxidase, dương tính với glucose, H<sub>2</sub>S nhưng âm tính với indol, urae. S5.2V là vi khuẩn Gram dương, tế bào hình cầu, dương tính với catalase, glucose, urea nhưng âm tính với oxidase, indol và H<sub>2</sub>S.

Theo hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey's (1994), chủng S3.3V là chủng vi khuẩn mang nhiều đặc điểm hình thái và sinh hoá giống với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Shewanella*, chủng S4.2T mang nhiều đặc điểm hình thái và sinh hoá giống với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Sphingobacterium*, chủng S5.2V mang nhiều đặc điểm hình thái và sinh hoá giống với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Macrococcus* [27].

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh độ tương đồng trên Genbank được thể hiện trong Hình 3.

>S3.3	<b>(a)</b>
<p>AACCCGATTCAAGCACTTCAGTATCAAGGGCACTGCGACAGTTGAGCTGCCGCTTTACCCCTGACTTAAAGTG                  CCGCTACGCACCCCTTAAACCAATAAATCCGGATAACGCTCGGATCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGC                  GAGTTAGCCGATCTTATTCTTAGGTACATTCAGCCCGTACACGTAGCGGGGTTTATCCCTAACAAAAGCAGT                  TTACAACCCATAGGGGAGTCTCTGACCGGGCATGGTGGTTGAGGGTTGCCCAATTGACCAATATTCCTTAC                  TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTCTCAGTACAGTGTGGGGGATTCTCCTCAGAGCCCTAGACAT                  CGTCGCCTTGGTGGGCGTTACCCACCAACTAGCTAATGTCACGCGAGCCCATCATATCTATGAATATTTGAC                  TACCTCCCGATGCCGAAAGCAGTGTATGCGGTGTTAATCCGGATTCTCCGGGCTATCCCCCTGATATGGGA                  GGTGCTACGCGTTACGCACCCGTGCGCCACTCTACCATCGGTAGCAAGCTACCGATGGATCCCGTCCGACTT                  GCATGTATTAGGCTGCCGTAGCGTTTATCTGAGCCT</p>	
>S4.2	<b>(b)</b>
<p>GACGTCGTCACCCCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTAAAGTTCGCGGCATTACCGCTGGCAAGTAA                  GGATAGGGGTTGCGCTGTTGCGGGACTTAACCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACC                  TGCTCTCAGTCCCGAAGGCACACCTGCGCTCCCGTGGCTTCTGAGGATGTCAGAGTAGGTAAGGTTCTTCCG                  CGTTGCATCGAATTAACACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCATTGAGTTTAACTTCCGG                  CCGTACTCCCGAGGGTCTACTAATGCGTTAGCTTGGAGAGCCAGTGTCAAGACACCAAACTCCGAGTAGAC                  ATCGTTTACGCGGTGACTACCAAGGTATCTAATCTGTTTGTCCCAACGCTTTCGTCGCTGAGCGTCACTTT                  GTCCAGGGGGCGCCTCCGCCCGGTATTCTCCAGACTCTACGCATTTCCCGCTACACTGGAATTCACCC                  CCCCCTACAAGACTCTAGTTTCCAGTTCGAAATGCGGTTCCAGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCTCGCTTAA                  CAAACCGCTGCGCAGCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTCGCACCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGC                  ACGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGCGAGTACGTCACAGCTAGCAGGTATTAACCTACTAACCTTCTCCCTCGCT                  GAA</p>	
>S5.2	<b>(c)</b>
<p>CCCCAATCATCTGCCACCTTCGACGGCTAGCTCTAAAAGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAAACTCTC                  GTGGTGTGACGGGGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTAATCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTAAGCGA                  TTCCAGCTTATGATGAGTTCGAGTTCAGACTACAATCCGAATGAGAAATGTTTATGGGATTTGCTTGACCTCGG                  GTTTTGTGCTTTGTACCATCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGCTCA                  TCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAATAAGATAAGGG                  TTGCGCTGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAACCATGCACACCTGTCACTTTGT                  CCCCCAAGGGGAAAGCTCTATCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTGGTAAGTTTCTCGCGTTGCTTC                  GAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGGTCAATTCCTTGAAGTTTCAAGTCTTCCGACCTCC                  CCAGGCGGAGTCTTAATGCGTTAGCTGACGACTGAGGGGCGGAAACCCCAACACTTAGCACTCATCGTTTA                  CGGCGTGGACTACCAAGGTATCTAATCTGTTGATCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAAGTACAGACAGA                  GAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCATATCTGCGCATTTCCCGCTACACATGGAATTCACCTCTCTCTTC                  TGCACCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGC                  CTACGCGCTTTACGCCAATAATCCGGATAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTT                  AGCCGTGGCTTTCGGTAAGTACCGTCAAGGTACGTTCAAGTACTAAGTACTTGTCTTCCCTTACAACAGAGT                  TTTACGATCCGAAAACCTTCTCACTACGCGGGGCTTGTCCGTCAGACTTTCGCTCCATTGCGGAAGATTCCCTACT                  GCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGCTATGTATC                  GTTGCTTGGTGGAGCGTTACCTCACCACTAGCTAATACACCGCGGGTCCATCTATAAGTGACAGCAAAACCGT                  CTTTCACTATTGCTTCAATGCGAAGCTAAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTATTCCAGTCTATA                  GGTAGTTACCCAGTGTACTCACCGTCCGCGCTAACGTCAGAGAGTGCAAGCACTCTGTCAGTTCGCTG                  ACTTGC</p>	

**Hình 3. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của 3 chủng vi khuẩn (a): S3.3V; (b): S4.2T và (c): S5.2V.**

Từ kết quả giải trình tự gen 16S rRNA (Hình 3) của 3 chủng vi khuẩn cho thấy: chủng S3.3V có độ tương đồng 100% với chủng vi khuẩn *Shewanella chilikensis*; chủng S4.2T có độ tương đồng 99% với chủng vi khuẩn *Sphingobacterium mizutaii* và chủng S5.2V có độ tương đồng 100% với chủng vi khuẩn *Macrocooccus armenti*.

**IV. KẾT LUẬN**

Nghiên cứu này đã phân lập và tuyển chọn được 18 chủng vi khuẩn có khả năng cắt mạch chitosan từ vỏ tôm lột xác tại ao nuôi tôm thẻ chân trắng. Bằng phương pháp xác định hoạt tính chitosanase và xác định khả năng cắt mạch chitosan cho thấy 3 chủng S3.3V; S4.2T;

S5.2V có khả năng cắt mạch chitosan mạnh nhất. Độ nhớt chitosan sau cắt mạch giảm lần lượt là 66,2; 67,7 và 65,3% so với đối chứng. Kết quả định danh bằng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA đã khẳng định các chủng S3.3V có mức độ tương đồng 100% với *Shewanella chilikensis*; S4.2T có mức độ tương đồng 99% với *Sphingobacterium mizutaii* và S5.2V có mức độ tương đồng 100% với *Macrocooccus armenti*.

**LỜI CẢM ƠN**

Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn Trường Đại học Nha Trang đã tài trợ cho nghiên cứu này thông qua đề tài cấp Trường mã số: TR2021-13-11.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Park P.J., Je J.Y., Byun H.G., Moon S.H., and Kim S.K. (2004), “Antimicrobial activity of hetero chitosan and their oligosaccharides with different molecular weights”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, pp. 317–323.
2. Tsai G.J., Su W.H., Chen H.C., Chen H.C., Chen H.C., and Pan C.L. (2002), “Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation”, *Fisheries Science*, 68, pp. 170–177.
3. No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Shin H.L., and Samuel P.M. (2002), “Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights”, *International Journal of Food Microbiology*, 74, pp. 65–72.
4. Einbu A., Grasdalen H., and Varum K.M. (2007), “Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid”, *Carbohydrate Research*, 342, pp. 1055–1062.
5. Minh N.C., Cuong H.N., Phuong P.T.D. Simona S., Stevents W.F., and Trung T.S. (2017), “Swelling-assisted reduction of chitosan molecular weight in the solid-state using hydrogen peroxide”, *Polymer Bulletin*, 74(8), pp. 3077 – 3087.
6. El-Naggar N.E.A. (2021), “Streptomyces-based cell factories for production of biomolecules and bioactive metabolites”, In *Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules*, Academic Press, pp. 183-234.
7. 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, pp. 21–29.
8. Somashekar D., and Joseph R. (1996), “Chitosanases — properties and applications: A review”, *Bioresource Technology*, 55(1), pp. 35–45.
9. Wangtueai S., Worawattanamateekul W., Sangjindavong M., Naranong N., and Sirisansaneeyakul S. (2006), “Isolation and screening of chitosanase producing microorganisms”, *Kasetsart Journal*, 40(4), pp. 944–948.
10. Zhang H., Sang Q., and Zhang W. (2012), “Statistical optimization of chitosanase production by *Aspergillus sp.* QD-2 in submerged fermentation”, *Annals of Microbiology*, 62(1), pp. 193–201.
11. Razak A.R., Satrimafitrah P., Hardi J., Khoridah E.N., and Gita M. (2019), “Production of chitosanase from termophylic bacteria isolated from Bora Hotspring”, *Journal of Physics: Conference Series* 1242(1).
12. Johnsen M.G., Hansen O.C., and Stougaard P. (2010), “Isolation, characterization and heterologous expression of a novel chitosanase from *Janthinobacterium sp.* strain 4239”, *Microbial Cell Factories*, 9(5), pp. 1-9.
13. Kielak A.M., Cretoiu M.S., Semenov A.V., Sørensen, S.J., and van Elsas, J.D. (2013), “Bacterial chitinolytic communities respond to chitin and pH alteration in soil”, *Applied and environmental microbiology*, 79(1), pp. 263 – 272.
14. Gooday G.W. (1990), *The Ecology of Chitin Degradation In: Advances in microbial ecology*. Boston, MA: Springer US, pp. 387–430.
15. Hallmann J., Rodríguez-Kábana R., and Kloepper J.W. (1999), “Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control”, *Soil Biology and Biochemistry*, 31(4), pp. 551-560.
16. Manucharova N.A., Vlasenko A.N., Men’ko E.V., and Zvyagintsev D.G. (2011), “Specificity of the



- chitinolytic microbial complex of soils incubated at different temperatures”, *Microbiology*, 80(2), pp. 205–215.
17. Aumen N.G. (1980), “Microbial succession on a chitinous substrate in a woodland stream”, *Microbial ecology*, 6(4), pp. 317–327.
  18. Wurzbacher C.M., Bärlocher F., and Grossart H.P. (2010), “Fungi in lake ecosystems”, *Aquatic Microbial Ecology*, 59(2), pp. 125–149.
  19. Vrba J. and Macháček J. (1994), “Release of dissolved extracellular  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase during crustacean moulting”, *Limnology and Oceanography*, 39(3), pp. 712–716.
  20. Trung T.S., Tram L.H., Tan N.V., Hoa, N.V., Minh, N.C., Loc, P.T., and Stevens, W.F. (2020), “Improved method for production of chitin and chitosan from shrimp shells”, *Carbohydrate research*, 489.
  21. Shahbaz U. and Yu X. (2020), “Cloning, isolation, and characterization of novel chitinase-producing bacterial strain UM01 (*Myxococcus fulvus*)”, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), pp. 1–11.
  22. Kim P.I, Kang T.H., Chung K.J., Kim, I.S., and Chung, K.C. (2004), “Purification of a constitutive chitosanase produced by *Bacillus sp.* MET 1299 with cloning and expression of the gene”, *FEMS Microbiology letters*, 240(1), pp. 31–39.
  23. Chu Thanh Bình, Nguyễn Phương Nhuê, Hồ Tuyên (2019), “Tinh sạch và xác định hoạt tính chitinase từ nấm diệt tuyến trùng *Paecilomyces sp. P1*”, *Tạp chí Khoa học tự nhiên và công nghệ*, 35(1), pp. 1–7.
  24. Helrich, K. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of official analytical chemists.
  25. Zhang H., and Neau S.H. (2001), “In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation”, *Biomaterials*, 22(12), pp. 1653 – 1658.
  26. Lê Thị Mai, Lê Vũ Khánh Trang, Cáp Kim Cương, Lê Quang Trường, Nguyễn Thị Huyền Trang (2020), “Nghiên cứu tuyển chọn và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp chitinase của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*”. *Tạp chí Khoa học Và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*, 18(11), pp. 56–61.
  27. Bergey, D.H. (1994). “Bergey’s manual of determinative bacteriology”. Lippincott Williams & Wilkins.