TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ GIÁO DỤC
ISSN: 1859-1612
Journal homepage: https://tckhgd.dhsphue.edu.vn

Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào của *Bacillus* spp. phân lập ở Phá Tam Giang, Thừa Thiên Huế

Lê Ngọc Sương, Đặng Thị Thúy Ngọc, Lâm Giang Hồng Phúc, Nguyễn Thị Kim Cơ

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

THÔNG TIN BÀI BÁO

Quá trình xử lý:
Ngày nhận bài: 04/10/2024
Ngày nhận bản chỉnh sửa: 14/12/2024
Ngày nhận đăng: 24/12/2024
Ngày xuất bản: 20/10/2025

Từ khóa:
Amylase
Bacillus spp.
Cellulase
Lipase
Protease

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào gồm protease, amylase, lipase và cellulase của các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. được phân lập từ 04 mẫu nước thu được tại phá Tam Giang, Thừa Thiên Huế. Thông qua sàng lọc đặc điểm hình thái khuẩn lạc và một số chỉ tiêu sinh hóa, 25/52 chủng vi khuẩn đã phân lập được xác định sơ bộ thuộc chi *Bacillus* để tiến hành đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào của chúng. Kết quả sàng lọc đã tuyển chọn được bốn chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. bao gồm BS03.05, BS03.07, BS04.01 và BS04.05 có khả năng sản sinh tất cả các enzyme khảo sát thông qua hoạt tính phân giải các cơ chất là gelatin, tinh bột, CMC và dầu olive (nhũ hóa trong đệm PBS). Kết quả ghi nhận chủng BS01.05 có khả năng sinh enzyme protease và lipase mạnh nhất với đường kính vòng phân giải cơ chất là 20,00 mm cho cả hai loại enzyme; trong khi đó, hoạt tính amylase và cellulase được ghi nhận cao nhất ở chủng BS03.05 với đường kính vòng phân giải cơ chất đo được lần lượt là 8,33 mm và 19,00 mm.

1. GIỚI THIỆU

Phá Tam Giang thuộc tỉnh Thừa Thiên Huế có tiềm năng phát triển ngành nuôi trồng thủy sản. Theo thống kê vào năm 2024, hiện đang có khoảng 300.000 cư dân sinh sống ở 41 xã sinh sống xung quanh ven phá Tam Giang (Hạnh, nd). Đời sống của các hộ dân gắn liền với khai thác trực tiếp hoặc gián tiếp nguồn tài nguyên trong đầm phá và ven phá dẫn đến lượng rác thải đang ngày một tăng lên, trong đó có những hợp chất hữu cơ phức tạp khó phân hủy được thải ra trong sinh hoạt hằng ngày của người dân hoặc do sự gia tăng hoạt động nuôi tôm ven bờ và nuôi cá lồng. Sự phát triển nuôi trồng thủy sản mang lại kinh tế cho người dân khu vực đầm phá Thừa Thiên Huế nhưng nếu không quản lý theo quy hoạch, không có các hình thức nuôi phù hợp và các giải pháp xử lý sẽ gây ô nhiễm. Có thể thấy, dưới sự phát triển nhanh chóng của ngành này đã dẫn đến tình trạng ô nhiễm nguồn nước bởi lượng thức ăn thủy sản được bổ sung vào nước cũng như các chất thải sinh hoạt của người dân khu vực này (Hạnh, nd).

Bacillus spp. là trực khuẩn phân bố rộng rãi trong đất, ao, hồ, sông, suối và nước biển. Chúng có khả năng hình thành nội bào tử, di chuyển bằng tiên mao, Gram dương, catalase dương tính và có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao do sử dụng được đa dạng nguồn cơ chất để tăng sinh khối và phát triển (Hatmanti, 2000). Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi khuẩn phân bố trong tự nhiên có ý nghĩa lớn trong xử lý hiệu quả chất thải trong nước, đặc biệt là các hợp chất hữu cơ dư thừa từ ngành nuôi trồng thủy sản. Enzyme protease, amylase, cellulase và lipase được sản sinh bởi *Bacillus* spp. có khả năng phân giải các phân tử hữu cơ phức tạp gồm protein, tinh bột, cellulose và lipid thành các đơn phân. Các enzyme này được ứng dụng để làm chế phẩm sinh học, các chất tẩy rửa, vật liệu sinh học và các chất xúc tác sinh học trong một số quy trình khác nhau ở quy mô công nghiệp. *Bacillus* spp. có tiềm năng lớn được sử dụng để loại bỏ các chất ô nhiễm, cải thiện chất lượng nước, cung cấp một nguồn nước sạch và bảo vệ môi trường là một giải pháp an toàn đối với con người và hệ

Tác giả liên hệ: Lê Ngọc Sương;
Địa chỉ e-mail: lnsuong@dhsphue.edu.vn
DOI: https://doi.org/10.26459/jse.067.2025

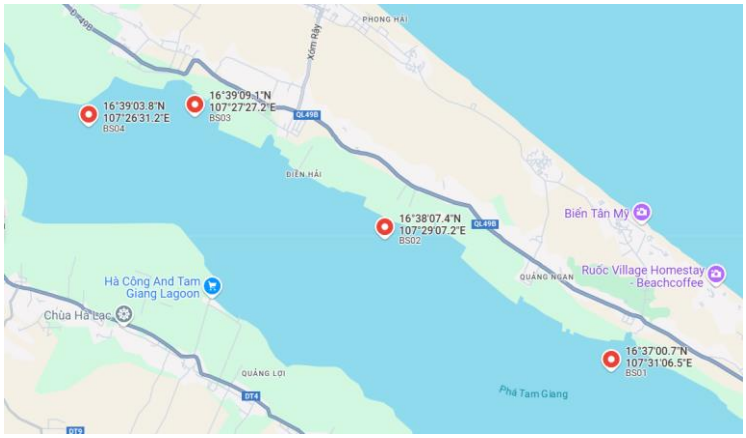
sinh thái (GürköK, 2019).

Nghiên cứu này tập trung khảo sát tiềm năng sản sinh enzyme ngoại bào của các chủng *Bacillus* spp. được phân lập tại phá Tam Giang để tìm kiếm giải pháp trong xử lí ô nhiễm môi trường nước bằng tác nhân sinh học an toàn và bền vững. Từ đó, có thể đóng góp vào việc hiểu rõ hơn về sự phân bố và tiềm năng ứng dụng của các chủng *Bacillus* spp. trong khu vực thu mẫu Phá Tam Giang cũng như cơ hội áp dụng những giải pháp tương tự cho các khu vực khác.

2. PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương pháp thu mẫu

Mẫu nước được thu tại 4 điểm ở phá Tam Giang, tỉnh Thừa Thiên Huế, Việt Nam (Hình 1) và bảo quản theo TCVN 6663-6:2018 của Tổng cục môi trường, Bộ Tài nguyên và môi trường. Sử dụng chai thủy tinh Duran 500 ml vô trùng để thu mẫu nước giữa dòng cách tầng mặt 20 - 30 cm. Chai Duran được để trống một khoảng hở không khí, đậy kín nắp và bảo quản ở nhiệt độ 0 - 5ºC trước khi đưa về phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ.



Hình 1. Sơ đồ thu mẫu.

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn Bacillus spp.

9 ml mẫu được cho vào ống nghiệm thủy tinh đã được hấp tiệt trùng, gia nhiệt trong máy gia nhiệt Wish Bath ở nhiệt độ 80 ºC trong 15 phút để loại bỏ hoàn toàn các tế bào sinh dưỡng trước khi pha loãng mẫu ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-5} bằng dung dịch nước cất vô trùng. Sau đó, hút 100 µl dịch pha loãng ở tất cả các nồng độ trải đều trên đĩa Petri chứa sẵn môi trường thạch Luria Bertani Agar (LBA) (Miller, Ấn Độ). Đĩa Petri được ủ ở tủ ấm 30 ºC trong 24 - 48 giờ. Các khuẩn lạc riêng lẻ được tiếp tục làm thuần trên môi trường LBA và bảo quản với dung dịch Glycerol 20% ở -20 ºC cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.3. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng phân lập

Các khuẩn lạc phân lập được xác định sơ bộ hình thái theo khóa phân loại của Bergey (Breed & Smith, 1957) thông qua quan sát, ghi nhận và mô tả các đặc điểm hình thái khuẩn lạc. Các chủng vi khuẩn sau 12 - 18 giờ nuôi cấy được nhuộm Gram theo phương pháp Hucker cải tiến với thuốc nhuộm Gelatin violet và Safranin để xác định khả năng bắt màu của vi khuẩn. Trong đó, vi khuẩn Gram dương (+) sẽ bắt màu tím và vi khuẩn Gram âm (-) sẽ bắt màu hồng (Giang et al., 2017). Khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi ở 30ºC được cho lên lam kính có sẵn một giọt nước cất vô trùng dàn đều và nhuộm bào tử theo phương pháp Ogietska (Phương & Hà, 2014). Kết quả cho thấy vi khuẩn có khả năng sinh nội bào tử khi dưới kính hiển vi bào tử bắt màu đỏ của dung dịch Fuchsin Ziehl và tế bào chất bắt màu xanh của dung dịch xanh methylen Loeffler. Thử nghiệm sinh enzyme oxidase được thực hiện bằng cách cho khuẩn lạc lên đĩa giấy có tẩm N-dimethyl-paraphenylenediamine, khi có sự xuất hiện của enzyme oxidase đĩa giấy sẽ chuyển màu xanh. Vi khuẩn hiếu khí hay kỵ khí được xác định bằng khả năng sinh enzyme catalase sau khi quan sát có hiện tượng sủi bọt khí do O_2 được tạo ra khi cho dung dịch H_2O_2 vào khuẩn lạc trên tiêu bản (Ngân et al., 2021).

2.4. Phương pháp khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào của Bacillus spp.

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của vi sinh vật được xác định thông qua phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. nuôi trong môi trường LB lỏng bổ sung 4 loại cơ chất CMC, tinh bột, gelatin và dầu olive lần lượt vào 4 bình, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30ºC trong 24 giờ. Dịch nuôi được đem ly tâm ở 4ºC với tốc độ 6000 vòng trong 15 phút, sau đó dịch ngoại bào được cho vào giếng trên đĩa agar chứa cơ chất tương ứng gồm 1% tinh bột, 1% CMC, 1% gelatin và 1% dầu olive đã được nhũ hóa bằng đệm PBS pH = 7,4 nhằm đánh giá khả năng sinh enzyme amylase, cellulase, protease và lipase của các chủng nghiên cứu. Đối chứng âm

là môi trường LB không chứa vi khuẩn *Bacillus*. Sau đó, đĩa Petri được đem đi ủ lạnh ở 4ºC trong 120 phút để dịch khuếch tán đều trong giếng trước khi tiếp tục ủ ấm ở 37ºC trong 24 giờ. Kết quả khảo sát được đánh giá thông qua đường kính vòng phân giải cơ chất trong đó thuốc thử $HgCl_2$ 10% được bổ sung để khảo sát enzyme protease và thuốc thử lugol 1,5% được dùng cho các enzyme còn lại (Ngân et al., 2021).

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày ở dạng Mean ± SD. Kết quả nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm thống kê Microsoft excel 2021.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

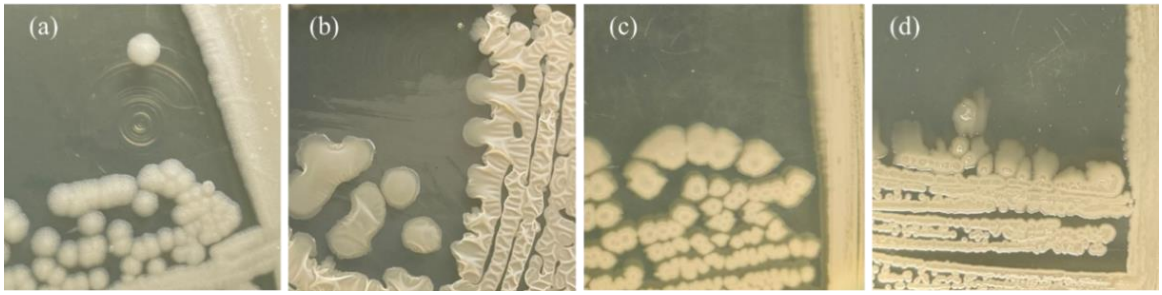
3.1. Phân lập, xác định sơ bộ loài và nghiên cứu đặc điểm sinh học

Từ các mẫu nước thu tại phá Tam Giang, 52 chủng vi khuẩn khác nhau đã được phân lập. Trong đó, dựa trên hình thái sơ bộ xác định 25 chủng thuộc chi *Bacillus*. Các chủng được làm thuần trên môi trường LBA và tiến hành quan sát các đặc điểm hình thái khuẩn lạc gồm kích thước, màu sắc, hình dạng, bờ rìa, độ cao và tính chất bề mặt được mô tả ở Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 25 chủng Bacillus spp. phân lập ở Phá Tam Giang

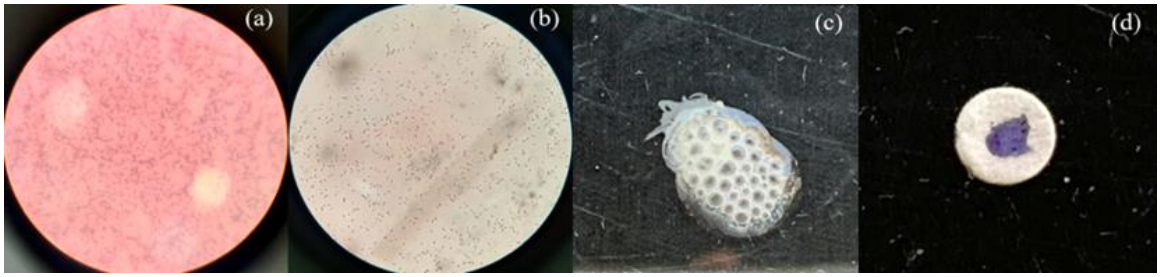
STT	Ký hiệu chủng	Kích thước (mm)	Màu sắc	Hình dạng	Bờ, rìa	Độ cao	Tính chất bề mặt
1	BS01.01	5x5	Trắng	Tròn	Đều	Nổi	Khô
2	BS01.02	3x3	Trắng kem	Tròn	Đều	Đắp nổi	Khô
3	BS01.03	1x1	Trắng kem	Tròn	Đều	Bằng phẳng	Khô
4	BS01.04	2x2	Trắng kem	Tròn	Mép răng cưa	Bằng phẳng	Khô
5	BS01.05	3x3	Trắng kem	Tròn	Đều	Đắp nổi	Nhầy
6	BS02.01	4x3	Vàng	Tròn	Đều	Bằng phẳng	Trơn nhẵn
7	BS02.02	2x2	Vàng	Tròn	Đều	Nổi	Khô
8	BS02.03	2x2	Trắng kem	Tròn	Đều	Bằng phẳng	Khô
9	BS02.04	3x3	Vàng	Tròn	Đều	Bằng phẳng	Khô
10	BS02.05	4x4	Trắng kem	Tròn	Đều	Nổi	Nhầy
11	BS03.01	4x3	Vàng	Tròn	Đều	Bằng phẳng	Khô
12	BS03.02	3x2	Vàng	Tròn	Mép lượn sóng	Bằng phẳng	Khô
13	BS03.03	2x2	Vàng	Tròn	Đều	Nổi	Khô
14	BS03.04	3x3	Vàng	Tròn	Đều	Nổi	Trơn nhẵn
15	BS03.05	2x2	Trắng kem	Tròn	Đều	Bằng phẳng	Khô
16	BS03.06	3x3	Trắng	Tròn	Đều	Nổi	Trơn nhẵn
17	BS03.07	3x3	Trắng	Tròn	Đều	Lồi	Nhầy
18	BS04.01	6x8	Trắng	Tròn	Đều	Lồi	Trơn nhẵn
19	BS04.02	4x4	Trắng	Tròn	Đều	Bằng phẳng	Nhầy
20	BS04.03	8x6	Trắng	Tròn	Đều	Bằng phẳng	Khô
21	BS04.04	3x3	Vàng	Tròn	Đều	Lồi	Trơn nhẵn
22	BS04.05	3x3	Trắng	Tròn	Đều	Lồi	Nhầy
23	BS04.06	3x3	Trắng	Tròn	Đều	Bằng phẳng	Trơn nhẵn
24	BS04.07	2x2	Trắng	Tròn	Đều	Nổi	Khô
25	BS04.08	3x3	Trắng	Tròn	Đều	Nổi	Khô

Kết quả đánh giá hình thái khuẩn lạc khi nuôi cấy các chủng đã sàng lọc trên môi trường LBA trong 24 giờ cho thấy hầu hết các khuẩn lạc có hình tròn, đa số có bờ đều và màu sắc đa dạng như trắng, trắng kem hoặc vàng (Hình 2). Độ cao của các khuẩn lạc có thể là bằng phẳng, nổi, đắp nổi và lồi. Cấu trúc và tính chất bề mặt khuẩn lạc có một số khác biệt ở các chủng chẳng hạn như BS01 và BS02 chủ yếu có cấu trúc bề mặt khô, trong khi chủng BS03 và BS04 có cấu trúc trơn nhẵn và nhầy (Hình 2). Kích thước khuẩn lạc của các chủng phân lập trên môi trường LBA cũng có sự khác biệt và dao động từ từ 1x1 mm đến 8x6 mm. Sự khác biệt về màu sắc, độ cao, cấu trúc và kích thước cho thấy sự đa dạng về mặt hình thái của các chủng *Bacillus* spp. trong khu vực nghiên cứu; tuy nhiên, cần thêm các nghiên cứu sâu hơn về mặt di truyền để định danh chính xác các loài vi khuẩn này.



Hình 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc các chủng *Bacillus* spp.
(a): BS01.05; (b): BS02.02; (c): BS03.04; (d): BS04.08.

Kết quả nhuộm Gram cho thấy 25 chủng vi khuẩn phân lập đều bắt màu tím của thuốc nhuộm gentian violet, chứng tỏ tất cả vi khuẩn phân lập đều thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương (+) (Hình 3). Các chủng *Bacillus* spp. sinh nội bào tử sau 1 tuần nuôi cấy trên môi trường LBA, khi sử dụng phương pháp Ogietska để quan sát kết quả nhuộm bào tử ở vật kính 100x và xác định được tế bào có hình que ngắn hoặc dài trong đó tế bào chất bắt màu xanh nhạt; nội bào tử bắt màu đỏ. Bào tử của *Bacillus* spp. đa phần có hình bầu dục và nằm ở giữa tế bào. Dung dịch H_2O_2 10% được sử dụng để khảo sát hoạt tính catalase và kết quả ghi nhận 25 chủng đều cho kết quả dương tính với thuốc thử này thông qua quá trình phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 tạo bọt khí (Hình 3). Khuẩn lạc được cho lên trên đĩa giấy có tẩm N-dimethyl-para phenylenediamine. Kết quả cho thấy 25 chủng vi khuẩn phân lập được đều có hiện tượng xuất hiện phức hợp xanh đậm sau 10-30 giây (dương tính), các chủng này đều có khả năng sinh enzyme oxidase. Dựa theo khóa phân loại Bergey, 25 chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu nước ở phá Tam Giang đều có đặc điểm gồm tế bào hình que, Gram dương, có nội bào tử, catalase dương tính, oxidase dương tính, như vậy các dòng vi khuẩn này được xác định sơ bộ thuộc chi *Bacillus* (Breed & Smith, 1957).



Hình 3. Khảo sát một số đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn BS04.07
(a): nhuộm gram; (b): nhuộm bào tử; (c): hoạt tính catalase; (d): hoạt tính oxidase.

Theo nghiên cứu của nhóm tác giả Giang (Giang et al., 2022) khi tiến hành phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột, chủng *Bacillus* trong nghiên cứu có đặc điểm hình thái khá tương đồng với ghi nhận của chúng tôi như khuẩn lạc có màu trắng đục, dạng tròn và Gram dương (+).

Khi phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp protease từ các sản phẩm đậu nành lên men (Hân et al., 2021) đã mô tả đặc điểm của khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn phân lập được trên môi trường Minimal agar sau 48 giờ nuôi cấy có hình dạng tròn hoặc không đều, màu sắc phần lớn sẽ là màu trắng đục còn lại sẽ là màu trắng. Đặc điểm bờ, rìa trong nghiên cứu của nhóm tác giả có dạng chia thùy, răng cưa và nguyên và độ cao của khuẩn lạc có dạng phẳng, lài và mô. Sự khác nhau về đặc điểm khuẩn lạc của nhóm tác giả và chúng tôi cũng phản ánh sự đa dạng của chủng *Bacillus* được phân lập trong hai nghiên cứu. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của chúng tôi so với nhóm tác giả cũng có một số điểm tương đồng về đặc điểm sinh hóa của *Bacillus* như các chủng phân lập đều là trực khuẩn Gram dương có khả năng hình thành nội bào tử và có khả năng sinh enzyme catalase.

Nghiên cứu của chúng tôi có sự tương đồng với nghiên cứu của Doggalli (Gireesha et al., 2024) về đặc điểm hình thái và một số chỉ tiêu sinh hóa của *Bacillus subtilis* được phân lập từ rễ củ mì. Trong đó, các khuẩn lạc được nuôi trên môi trường thạch dinh dưỡng hầu hết đều có hình tròn. Kèm theo đó, chủng nghiên cứu được ghi nhận có khả năng sinh enzyme catalase, hình thành nội bào tử và là vi khuẩn Gram dương. Màu sắc khuẩn lạc gồm trắng, trắng đục, trắng nhạt, trắng vàng và màu kem cho thấy sự đa dạng trong đánh giá của nhóm tác giả.

Ngoài những tương đồng với các nghiên cứu trước, nghiên cứu của chúng tôi đã đề cập cụ thể hơn về đặc điểm độ cao và bờ, rìa của khuẩn lạc. Về độ cao, khuẩn lạc được phân loại ở các dạng nổi, đắp nổi, bằng phẳng và lồi. Đồng thời, đặc điểm bờ, rìa của khuẩn lạc sẽ được chia thành 4 dạng gồm đều, mép răng cưa và mép lượn sóng. Việc đánh giá những đặc điểm hình thái như độ cao, bờ, rìa và màu sắc của khuẩn lạc sẽ cung cấp đầy đủ

hơn dữ liệu để góp phần định danh các chủng vi khuẩn phân lập.

3.2. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi khuẩn đã phân lập được đánh giá dựa vào khả năng phân giải cơ chất trên môi trường thạch bổ sung cơ chất tương ứng cho từng loại enzyme. Kết quả khảo sát được thể hiện qua Bảng 2.

Bảng 2. Đường kính vòng phân giải cơ chất của 25 chủng *Bacillus* spp. phân lập

STT	Ký hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải $\bar{D}$ – d (mm)			
		Protease	**Amylase**	**Cellulase**	**Lipase**
1	BS01.01	9,33 ± 0,44	5,67 ± 0,44	3,33 ± 0,44	19,67 ± 0,44
2	BS01.02	17,33 ± 1,11	-	3,67 ± 0,89	8,00 ± 0,67
3	BS01.03	9,33 ± 1,11	4,33 ± 0,44	16,33 ± 0,89	19,67 ± 0,44
4	BS01.04	4,33 ± 0,44	-	3,00 ± 0	13,33 ± 0,44
5	BS01.05	20,00 ± 0,76	-	3,67 ± 0,44	20,00 ± 0
6	BS02.01	11,00 ± 0,67	8,00 ± 0	15,67 ± 0,89	20,00 ± 0
7	BS02.02	12,67 ± 1,11	6,67 ± 0,44	15,67 ± 1,11	19,00 ± 0,67
8	BS02.03	11,33 ± 0,44	6,00 ± 0,67	16,33 ± 0,89	19,33 ± 0,44
9	BS02.04	11,67 ± 0,44	5,00 ± 0	14,67 ± 1,11	19,67 ± 0,44
10	BS02.05	19,67 ± 0,89	-	3,67 ± 0,89	8,00 ± 0,67
11	BS03.01	11,33 ± 0,44	7,67 ± 0,44	16,00 ± 1,33	19,00 ± 0,67
12	BS03.02	11,00 ± 0,67	5,67 ± 0,44	15,00 ± 1,33	18,67 ± 0,89
13	BS03.03	3,33 ± 0,44	-	3,33 ± 0,44	-
14	BS03.04	19,00 ± 0,67	-	8,67 ± 0,44	15,33 ± 0,89
15	BS03.05	11,67 ± 0,44	8,33 ± 0,44	19,00 ± 1,33	17,67 ± 0,44
16	BS03.06	15,67 ± 1,11	5,33 ± 0,44	15,33 ± 0,89	20,00 ± 0,67
17	BS03.07	19,00 ± 0,67	7,67 ± 0,89	17,33 ± 1,11	19,33 ± 0,44
18	BS04.01	12,00 ± 1,33	7,33 ± 0,44	17,00 ± 0,67	19,00 ± 0,67
19	BS04.02	19,00 ± 0,67	-	5,00 ± 0,67	12,33 ± 1,11
20	BS04.03	11,33 ± 0,89	7,33 ± 0,44	15,67 ± 1,11	18,67 ± 0,44
21	BS04.04	-	-	11,67 ± 1,11	14,67 ± 0,44
22	BS04.05	17,33 ± 1,11	5,67 ± 0,44	16,00 ± 1,33	17,33 ± 0,44
23	BS04.06	11,67 ± 0,44	5,67 ± 0,44	16,33 ± 0,89	19,33 ± 0,44
24	BS04.07	-	-	9,00 ± 0,67	3,00 ± 0
25	BS04.08	3,67 ± 0,44	-	3,00 ± 0	14,33 ± 0,44

Ghi chú: ($\bar{D}$: đường kính vòng phân giải; d: đường kính lỗ thạch = 6 mm; "-": Kết quả không kháng)

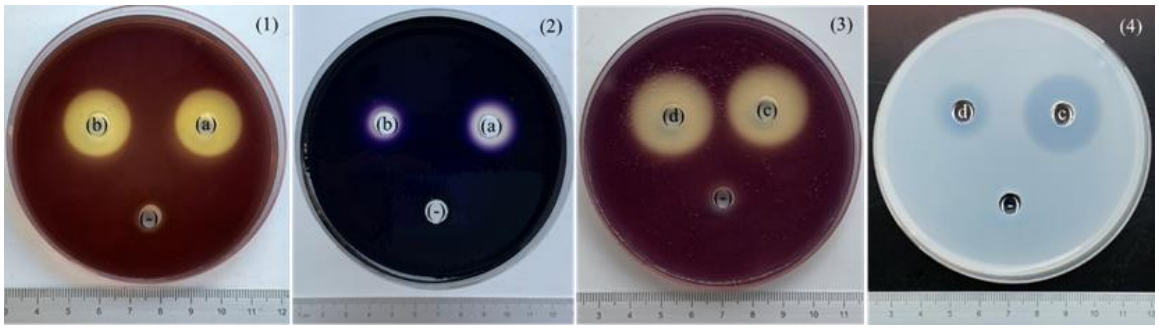
Kết quả cho thấy sự khác biệt rõ rệt về đường kính vòng phân giải của bốn loại enzyme trong đó 23/25 chủng vi khuẩn sàng lọc (92%) có khả năng sinh enzyme protease với đường kính vòng phân giải dao động trong khoảng từ 3,33 mm đến 20,00 mm. Các chủng *Bacillus* spp. có đường kính vòng phân giải gelatin trên 15 mm bao gồm BS01.02, BS01.05, BS02.05, BS03.04, BS03.06, BS03.07, BS04.02 và BS04.05 ngược lại, các chủng BS01.04, BS03.03, BS04.04, BS04.07 và BS04.08 có đường kính vòng phân giải thấp dưới 5 mm. Chủng BS01.05 là chủng có đường kính vòng phân giải gelatin cao nhất 20,00 ± 0,67 mm (Hình 4). Hai chủng BS04.04 và BS04.07 không có hoạt tính protease ngoại bào. So sánh với nghiên cứu của Hân (Hân et al., 2021) khi phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp protease từ các sản phẩm đậu nành lên men, vòng thủy phân cơ chất trên môi trường SMA sau 48 giờ nuôi cấy của 29 dòng vi khuẩn cao nhất là chủng CM01 (24,3 mm) và thấp nhất là chủng ML09 (11,7 mm). Theo nghiên cứu của Cơ và Dung (Cơ & Dung, 2020), tất cả chủng nghiên cứu đều có khả năng sinh enzyme protease với đường kính vòng phân giải cơ chất dao động từ 14,33 mm đến 18,67 mm.

Các chủng vi khuẩn có khả năng sinh amylase không đáng kể so với các enzyme ngoại bào khác. Nghiên cứu sàng lọc được 15/25 chủng có khả năng sinh enzyme amylase với tỉ lệ là 60%. Đường kính vòng phân giải tinh bột dao động từ 4,33 mm đến 8,33 mm; trong đó chủng BS03.05 có đường kính vòng phân giải tinh bột lớn nhất

là 8,33 ± 0,44 mm (Hình 4). Đối chiếu với kết quả khảo sát khả năng phân giải tinh bột dựa trên đường kính thủy phân của Giang và cộng sự (Giang et al., 2022), sau 72 giờ nuôi cấy đường kính vòng phân giải tinh bột dao động từ 1,00 đến 18,66 mm. Hoạt tính amylase của các chủng được khảo sát trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với những kết quả mà nhóm tác giả đưa ra và có thể liên quan đến điều kiện môi trường nuôi cấy cũng như thời điểm thu nhận dịch ngoại bào để khảo sát.

Hầu hết tất cả các chủng *Bacillus* spp. trong nghiên cứu phân lập được đều có khả năng sinh enzyme cellulase, đường kính vòng phân giải dao động từ 3,00 mm đến 19,00 mm trong đó chủng BS03.05 sinh enzyme cellulase cao nhất với đường kính vòng phân giải cơ chất CMC là 19,00 ± 1,33 mm (Hình 4). Mặt khác, một số chủng *Bacillus* spp. gồm BS01.01, BS01.02, BS01.04, BS01.05, BS02.05, BS03.03, BS04.02 và BS04.08 lại có hoạt tính cellulase thấp, với đường kính vòng phân giải cơ chất dưới 5 mm trong khi các chủng còn lại đều có đường kính vòng phân giải trên 10 mm. So sánh với kết quả nghiên cứu của Hà và cộng sự (Hà et al., 2019), về khả năng phân giải cellulose của chủng *Bacillus* để xử lý nước rỉ rác, kết quả của nhóm tác giả có sự tương đồng so với nghiên cứu của chúng tôi. Các chủng vi khuẩn nuôi trong 24 giờ cho đường kính vòng phân giải cơ chất cao nhất là 19,00 mm. Các chủng còn lại đều cho đường kính vòng phân giải khá cao, bao gồm V28, V24 và V40 đạt kết quả tương ứng 17,6 mm, 17 mm, 16,4 mm.

Hoạt tính lipase cao được ghi nhận ở đa số các chủng *Bacillus* spp. phân lập ở phá Tam Giang với đường kính vòng phân giải từ 3,00 mm đến 20,00 mm trong đó hầu hết có đường kính trên 10 mm. Chủng BS01.01, BS01.03, BS01.05, BS02.01, BS02.02, BS02.03, BS02.04, BS03.01, BS03.02, BS03.06, BS04.03, BS04.05, BS04.06 thể hiện hoạt tính lipase rất mạnh, với đường kính vòng phân giải trên 15 mm, đặc biệt chủng BS01.05 và BS02.01 có đường kính vòng phân giải lên đến 20,00 mm (Hình 4). Tuy nhiên, một số chủng như BS01.02, BS02.05, BS04.07, BS04.08 lại có hoạt tính lipase thấp và chủng BS03.03 không thể hiện hoạt tính lipase. Trong nghiên cứu của Lam và Lý (Lam & Lý, 2021), về khả năng sinh enzyme lipase của chủng vi khuẩn *Bacillus*, các chủng vi khuẩn được nuôi trương 24 giờ với đường kính vòng phân giải giao động khoảng từ 16,00 mm đến 20,00 mm, có thể thấy trong nghiên cứu của nhóm tác giá khá tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi.



Hình 4. Đường kính vòng phân giải cơ chất CMC (1), tinh bột (2), dầu olive (3) và gelatin (4)
(a): chủng BS03.05; (b): chủng BS03.06; (c): chủng BS02.01; (d): chủng BS01.05.

Bên cạnh đó, so sánh với kết quả nghiên cứu của Phúc và Trang (Phúc & Trang, 2024), đa số các chủng phân lập được đều có khả năng phân giải tinh bột với bán kính vòng phân giải là 6,00 mm, hoạt tính enzyme cellulase mạnh với bán kính vòng phân giải CMC dao động 6,25 - 7,00 mm. Tất cả các chủng nghiên cứu đều có khả phân giải gelatin cho bán kính vòng phân giải cao nhất là 7,00 - 7,75 mm. Khả năng sinh enzyme lipase thấp hơn so với các loại enzyme khác, chỉ có 8 chủng có khả năng sinh enzyme lipase nhưng bán kính vòng phân giải chỉ 1,00 mm, kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả thấp hơn nhiều so với ghi nhận của chúng tôi. Trong nghiên cứu của Đoàn và Chi (Đoàn & Chi, 2021), đường kính vòng phân giải cơ chất tinh bột của *Bacillus* dao động từ 6,5 đến 18,3 mm, protease 6,2 - 20,8 mm và cellulase từ 6,1 - 20,9 mm. Đường kính vòng phân giải của enzyme amylase, protease, cellulase lớn nhất lần lượt là 18,3 mm (NTB5.7), 20,8 mm (NTB2.3) và 20,9 mm (NTB2.1) kết quả này cho thấy sự tương đồng với kết quả chúng tôi đưa ra.

Kết quả trình bày ở Bảng 2 cho thấy sự khác biệt rõ rệt về khả năng sinh enzyme của các enzyme protease, amylase, cellulase và lipase. BS03.05, BS03.07, BS04.01 và BS04.05 là 4 chủng có đường kính vòng thủy phân lớn về cả 4 loại enzyme các chủng còn lại đều có khả năng sinh enzyme trung bình.

4. KẾT LUẬN

Từ bốn mẫu nước thu nhận ở phá Tam Giang, Thừa Thiên Huế đã phân lập được 52 chủng vi khuẩn ban đầu. Kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc và một số chỉ tiêu sinh hóa đã sàng lọc được 25 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng sinh enzyme protease, amylase, cellulase và lipase ngoại bào với hoạt tính khác nhau. Trong số 25 chủng *Bacillus* spp. khảo sát, có 4 chủng có khả năng sinh cả bốn loại enzyme ngoại bào bao gồm BS03.05, BS03.07, BS04.01 và BS04.05. Chủng vi khuẩn BS01.05 có hoạt tính sinh enzyme protease và

lipase cao nhất còn chủng BS03.05 thể hiện hoạt tính phân giải cơ chất CMC và tinh bột tốt nhất. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng lớn của các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập và do đó, cần phát triển những nghiên cứu tiếp theo để định danh ở mức độ phân tử và đánh giá sâu hơn hoạt tính cũng như ứng dụng thực tế của các enzyme ngoại bào có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus*.

Lời cám ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế trong khuôn khổ đề tài mã số T.24.TN.106.11. Chân thành cảm ơn quý Thầy Cô Khoa Sinh học đã giúp đỡ nhóm tác giả hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Smith, N. R. (1957). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins. https://www.biodiversitylibrary.org/item/41848

Lam, D. M., & Lý, V. T. (2021). Nghiên cứu tuyển chọn Bacillus sinh lipase kiềm từ rừng ngập mặn. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, (2)*. https://doi.org/10.15625/0866-708X/50/2/9495

Gireesha, D., Patil, P. V., Vishwas Gowda, G. R., Vijaykumar, K. N., & Doggallis, G. (2024). Morphological and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* isolated from rhizosphere of sugarbeet. *Biochemical and Cellular Archives*, *24*(1), 1077–1082. https://doi.org/10.51470/bca.2024.24.1.1077

GürköK, S. (2019). Microbial enzymes in detergents: A review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, *10*, 75–81.

Hatmanti, A. (2000). Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*, *25*(1), 31–41.

Hạnh, L. T. (n.d.). *Môi trường nước đầm phá Tam Giang – Cầu Hai: Thực trạng và giải pháp*. https://stnmt.thuathienhue.gov.vn/tin-tu-cac-don-vi.html

Hân, T. T. N., Điệp, V. T. N., Hoa, T. T. T., & Thành, N. V. (2021). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp protease từ các sản phẩm đậu nành lên men. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, *63*(8). https://doi.org/10.31276/VJST.63(8).49-54

Cơ, N. T. K., & Dung, T. Q. (2020). Phân lập và sàng lọc một số chủng *Bacillus* sp. sinh protease từ nước thải. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, (3)*, 100–108.

Phương, N. T. L., & Hà, Đ. T. (2014). Xác định chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. phân giải protein và thử nghiệm xử lý nước thải thủy sản. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, *11*(84).

Đoàn, N. T. L., & Chi, L. T. Q. (2021). Nghiên cứu một số đặc tính của vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ nước thải làng nghề Bún Phú Đô. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, *19*(5), 662–671.

Giang, N. T. T., Bình, D. V. Q., & Hòa, Đ. T. (2017). Nghiên cứu bước đầu về bệnh đốm trắng nội tạng ở cá chim vây vàng (*Trachinotus blochii*) nuôi ở Nha Trang. *Tạp chí Nông Lâm nghiệp và Phát triển*, 427–437.

Phúc, N. V., & Trang, P. T. P. (2024). Phân lập, định danh và xác định các đặc tính có lợi của chủng *Bacillus* spp. từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh*, *(64)*. https://doi.org/10.54607/hcmue.js.0.64.2084

Ngân, P. T. T., Hải, V. H., Út, V. N., & Giang, H. T. (2021). Chọn lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. từ ao nuôi tôm quảng canh có khả năng phân hủy hữu cơ và kháng *Vibrio parahaemolyticus*. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, *57*(3). https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.101

Hà, T. L., Luân, T. T., & Vinh, P. Đ. **(**2019). Phân lập và tuyển chọn chủng *Bacillus* có khả năng phân giải cellulose để xử lý nước rỉ rác. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*.

Giang, T. T., Nghĩa, T. H., Nghi, N. T. H., Anh, V. D. L., & Khang, Đ. T. (2022). Phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, *58*, 225–231. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.141

Survey on the extracellular enzyme production capability of *Bacillus* spp. isolated from Tam Giang Lagoon, Thua Thien Hue province

Le Ngoc Suong, Dang Thi Thuy Ngoc, Lam Giang Hong Phuc, Nguyen Thi Kim Co

University of Education, Hue University

ARTICLE INFO

Article history:
Received 04 October 2024
Received in revised form 14 December 2024
Accepted 24 December 2024
Published 20 October 2025

Keywords:
Amylase
Bacillus spp.
Cellulase
Lipase
Protease

Corresponding author:
Le Ngoc Suong
E-mail address:
lnsuong@dhsphue.edu.vn

ABSTRACT

The study was conducted to investigate the extracellular enzyme production capabilities, including protease, amylase, lipase, and cellulase, of *Bacillus* spp. strains isolated from four water samples collected in the Tam Giang Lagoon, Thua Thien Hue province. Through screening based on colony morphological characteristics and several biochemical criteria, 25 out of 52 isolated bacterial strains were preliminarily identified as belonging to the *Bacillus* genus for further evaluation of their extracellular enzyme production potential. The screening results identified four *Bacillus* spp. Strains, BS03.05, BS03.07, BS04.01 and BS04.05, that exhibited the ability to produce all the surveyed enzymes by degrading substrates such as gelatin, starch, CMC (carboxymethyl cellulose), and olive oil (emulsified in PBS buffer). Notably, strain BS01.05 demonstrated the strongest protease and lipase activities, with substrate degradation zone diameters of 20.00 mm for both enzymes. Meanwhile, the highest amylase and cellulase activities were observed in strain BS03.05, with substrate degradation zone diameters of 8.33 mm and 19.00 mm, respectively.