



DOI:10.22144/ctujs.2025.113

PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH PHÂN GIẢI TINH BỘT VÀ KHÁNG *E. coli* CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus* spp. ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THẢI SẢN XUẤT BÁNH MÌ

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm*, Đinh Ngọc Bích và Trần Hữu Hậu

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): hnttam@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 09/11/2024

Sửa bài (Revised): 12/12/2024

Duyệt đăng (Accepted): 13/03/2025

Title: Isolation and determination of the starch-degrading and *E. coli*-resistant characteristics of *Bacillus* spp. isolated from bread wastewater

Author(s): Huynh Ngoc Thanh Tam*, Dinh Bich Ngoc and Tran Huu Hau

Affiliation(s): Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Viet Nam

TÓM TẮT

Ô nhiễm môi trường do các cơ sở sản xuất thực phẩm gây ra đang trở nên ngày càng phổ biến. Do đó, việc nghiên cứu, tìm kiếm các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sản xuất enzyme amylase để xử lý nước thải ô nhiễm chứa nhiều tinh bột như nước thải từ sản xuất bánh mì đang là vấn đề cấp bách. Từ nguồn nước thải tại Cần Thơ, 20 chủng *Bacillus* spp. đã được phân lập với khả năng phân giải tinh bột, đường kính vòng phân giải dao động từ 9 mm đến 30 mm trong khoảng thời gian từ 2 đến 8 ngày khảo sát. Chủng vi khuẩn NK16 có khả năng phân giải tinh bột, tạo ra hàm lượng đường khử cao nhất đạt 1,798 mg/mL sau thời gian khảo sát 6 ngày. Chủng vi khuẩn NK16 cũng có khả năng kháng *Escherichia coli* mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn là 9,33 mm. Bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA kết hợp một số thử nghiệm sinh hóa đã xác định được rằng chủng vi khuẩn NK16 là thuộc chi *Bacillus* sp. và có độ tương đồng lên đến 99,73% với *Bacillus velezensis*.

Từ khóa: Enzyme amylase, nước thải, phân giải tinh bột, phân lập, vi khuẩn

ABSTRACT

Environmental pollution from food production facilities is becoming increasingly common. Therefore, research on *Bacillus* strains capable of producing amylase enzymes to treat wastewater rich in starch, such as wastewater from bread production, has become an urgent issue. From wastewater sources in Can Tho, 20 *Bacillus* spp. strains have been isolated with the ability to hydrolyze starch, showing clearing zone diameters ranging from 9 mm to 30 mm for 2 to 8 days. The strain NK16 exhibited the highest starch hydrolysis capability, producing 1.798 mg/mL of reducing sugars after 6 days. The results of the antibacterial capability survey showed that NK16 isolate had the highest antibacterial activity against *Escherichia coli*, with an inhibition zone diameter of 9.33 mm. Using 16S rRNA gene sequencing combined with several biochemical tests, NK16 was identified as *Bacillus* sp. and *Bacillus velezensis* with 99.73% similarity.

Keywords: Bacteria, enzyme amylase, isolation, resolving starch, wastewater

1. GIỚI THIỆU

Năm 1859, bánh mì du nhập vào Việt Nam với tên gọi là bánh mì Baguette và chiếm vai trò quan trọng đối với nền ẩm thực Việt Nam. Tuy nguyên liệu của bánh mì gần gũi, dễ tìm như bột mì, men và một số phụ liệu khác tùy nơi sản xuất nhưng ở mỗi bước làm đều được thực hiện rất cẩn thận. Do đó, bánh mì được tiêu thụ hằng ngày bởi sự tiện lợi và ngon, kéo theo sự phát triển của các cơ sở sản xuất từ qui mô công nghiệp đến hộ gia đình và một trong những vấn đề đáng lo ngại trong ngành công nghiệp sản xuất bánh mì là việc xử lý nước thải.

Thành phần dinh dưỡng trong các nguồn nước thải hữu cơ này giàu các nguyên tố sinh học và hợp chất hữu cơ khác nhau (Kieliszek et al., 2020). Điều này rất thích hợp để tận dụng các chất dinh dưỡng có sẵn để nhân nuôi sinh khối vi sinh vật nói chung và vi khuẩn nói riêng. *Bacillus* có thể phân hủy các chất hữu cơ trong ao, điều này giúp cải thiện chất lượng nước, tăng số lượng vi sinh vật phù du và giảm mùi hôi (Lopes et al., 2020). Hơn thế nữa, *Bacillus* có khả năng sinh bào tử giúp chúng có thể chống chịu tốt hơn khi gặp điều kiện bất lợi từ môi trường. Nhờ đặc tính này, *Bacillus* đã được nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là xử lý nước thải, nơi chúng đóng vai trò như một loài vi sinh vật hữu ích mang lại hiệu quả cao.

Vi sinh xử lý Microbe-Lift IND là sản phẩm chứa đa dạng chủng vi khuẩn *Bacillus* hoạt tính mạnh, men vi sinh có thể sử dụng được cho tất cả các loại hình nước thải. Vu et al. (2023) cũng sử dụng kỹ thuật xử lý nước thải sinh hoạt bằng công nghệ bùn hoạt tính có bổ sung vi khuẩn *Bacillus* sp. Theo Nguyen and Ly (2012) cùng với Chen et al. (2022), nghiên cứu và phát hiện các chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh enzyme ngoại bào để phân hủy các hợp chất hữu cơ trong nước thải, đặc biệt là tinh bột từ các cơ sở sản xuất sản phẩm tinh bột là điều hết sức cần thiết hiện nay. Việc ứng dụng vi sinh vật trong việc xử lý nước thải đã được nhiều nhà khoa học quan tâm. Vì đây là hướng xử lý thân thiện với môi trường, ít độc hại hơn so với những phương pháp xử lý khác (Rani et al., 2019; Bhatt et al., 2020). Vì vậy, việc nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn các vi khuẩn tiềm năng thuộc chi *Bacillus* có khả năng phân giải tinh bột từ nguồn nước thải giàu tinh bột như nước thải sản xuất bánh mì được thực hiện nhằm tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải mạnh và có thể ứng dụng vi khuẩn trong xử lý nước thải ở tương lai.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Mẫu nước thải được thu tại 04 cơ sở sản xuất bánh mì vào buổi sáng (từ 9 đến 11 giờ) khi công đoạn sản xuất bánh mì đã kết thúc tại khu vực các quận trên địa bàn thành phố Cần Thơ như: Bình Thủy, Cái Răng, Trà Nóc, Ninh Kiều.

Vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học thực phẩm, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và nhận diện vi khuẩn *Bacillus* spp.

Mẫu nước thải được thu ở vị trí cuối nguồn thải của 04 cơ sở sản xuất bánh mì tại thành phố Cần Thơ. Mẫu nước thải được tiến hành pha loãng 1000 lần với nước cất khử trùng. Sau đó, mẫu được đun cách thủy ở 80°C trong 15 phút. Tiếp theo, mẫu được trải đều 50 µL huyền phù vi khuẩn sau khi pha loãng trên đĩa chứa sẵn môi trường starch agar (SA) theo Geetha et al. (2014). Sau 24 - 48 giờ, các khuẩn lạc có xuất hiện vòng halo xung quanh sẽ được cấy chuyển sang môi trường nutrient (NA) (5 g/L peptone; 3 g/L cao thịt; 5 g/L NaCl và 20 g/L agar, pH 7) cho đến khi nhận được khuẩn lạc thuần. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn đã phân lập được ghi nhận. Kính nhìn nổi được sử dụng để quan sát và ghi nhận các chỉ tiêu hình dạng, màu sắc, kích thước, độ nổi, dạng bìa. Kính hiển vi quang học cũng được dùng để xác định Gram và ghi nhận hình dạng tế bào của các chủng vi khuẩn. Sinh hóa catalase, oxidase và indole của các chủng vi khuẩn đã phân lập được xác định.

2.2.2. Xác định khả năng sản sinh enzyme amylase của vi khuẩn *Bacillus* spp.

Mục tiêu tuyển chọn được những dòng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme amylase ngoại bào. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường nutrient broth (NB), lắc với tốc độ 150 vòng/phút (rpm) ở 27°C±3 (nhiệt độ phòng). Enzyme ngoại bào được thu nhận sau 2, 4, 6 và 8 ngày nuôi cấy bằng phương pháp ly tâm lạnh (4°C) với tốc độ 13.000 rpm trong 15 phút. Dịch nổi sau ly tâm (cell-free supernatant - CFS) được bảo quản trong điều kiện lạnh (10°C) và được sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo. Sau đó, 100 µL dịch nổi sau ly tâm được chuyển vào giếng (đường kính 6 mm) trên đĩa môi trường SA, sử dụng môi trường NB và nước cất làm đối chứng âm.

Sau khi ủ 48 giờ, dung dịch Lugol được tráng lên bề mặt môi trường, cơ chất tinh bột trong môi trường phản ứng với iod, tạo thành phức chất có màu xanh tím đặc trưng. Tuy nhiên, khi tinh bột bị enzyme amylase phân giải, phức chất này không còn hình thành, để lại vùng không màu (vòng sáng). Vi khuẩn có khả năng tạo enzyme phân giải tinh bột xuất hiện vòng sáng (halo) và được xác định bởi công thức (1). Những chủng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột trong suốt 6 ngày nuôi cấy được chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

$$\text{KNPG} = D - d \quad (1)$$

Trong đó: D là đường kính vòng halo (mm), d là đường kính giếng (6 mm).

KNPG cơ chất dựa vào đường kính vòng halo (mm) tương ứng được xác định: hoạt tính enzyme rất mạnh: $D - d \geq 25$ mm, hoạt tính enzyme mạnh: $20 \leq D - d < 25$ mm, hoạt tính enzyme trung bình: $10 \leq D - d < 20$ mm, hoạt tính enzyme yếu: $D - d < 10$ mm (Huynh & Huynh, 2024).

2.2.3. Xác định hàm lượng đường khử

Mục đích của thí nghiệm là tuyển chọn được các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng phân giải tinh bột và cho ra hàm lượng đường khử cao trong môi trường lỏng bằng phương pháp DNS (Acid Dinitrosalysilic) .

Đường chuẩn: $y = 1,3276x + 0,2329$ với ($R^2 = 0,9905$). Trong đó: y là giá trị mật độ quang (optical density – OD) ở bước sóng 540 nm; x là hàm lượng đường khử sinh ra (mg/mL). Nồng độ glucose chuẩn sử dụng trong thí nghiệm này được bố trí từ 0 mg/mL đến 1,2 mg/mL. Tất cả các ống sau khi pha đúng nồng độ, 2 mL thuốc thử DNS được thêm vào 1 mL glucose chuẩn và trộn đều. Hỗn hợp được đun cách thủy trong 5 phút, để nguội. Mật độ hấp thụ được đo ở bước sóng 540 nm.

Đối với mẫu vi khuẩn: Mẫu 1 mL được hút huyền phù các chủng vi khuẩn được tuyển chọn ở mục 2.2.2 (mật số về 10^8 CFU/mL) cho vào 9 mL môi trường SA lỏng. Hỗn hợp được nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Sau 2; 4; 6 và 8 ngày nuôi cấy lắc, mẫu được thu để xác định hàm lượng đường khử sinh ra tại từng thời điểm. Mẫu được ly tâm trong 15 phút với tốc độ 5000 vòng/phút, thu phần dịch nổi sau ly tâm và chuyển sang ống mới. Sau đó, 1 mL dịch nổi sau ly tâm được cho vào tác dụng với 2 mL thuốc thử DNS và đun sôi hỗn hợp trong 5 phút và để nguội ở nhiệt độ phòng. Giá trị OD 540 nm được xác định và kết hợp

với phương trình đường chuẩn để tính được hàm lượng đường khử sinh ra trong mẫu.

2.2.4. Khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn *Escherichia coli*

Mục đích tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng kháng lại vi khuẩn chỉ thị gây bệnh *Escherichia coli*. Bố trí bằng phương pháp đục đĩa thạch bằng dịch nổi sau ly tâm vi khuẩn đối kháng. Huyền phù vi khuẩn *E. coli* (100 μ L) được nuôi cấy lắc (mật số 10^6 CFU/mL) và trải đều trên đĩa chứa môi trường NA bằng tăm bông vô trùng. Các giếng trên môi trường được tạo ra bằng phương pháp đục lỗ, với đường kính mỗi giếng là 6 mm. Sau đó, 100 μ L dịch sau ly tâm của vi khuẩn đối kháng (13000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để loại bỏ tế bào) được chuyển lần lượt vào ba giếng tương ứng với ba lần lặp lại. Song song đó, 100 μ L nước cất (đối chứng âm) và 100 μ L ampicillin (đối chứng dương) được chuyển lần lượt vào hai giếng còn lại.

Khả năng tạo vòng vô khuẩn của các chủng vi khuẩn đối kháng sau 48 giờ ủ được quan sát. Hoạt tính kháng khuẩn được tính theo Moore et al. (1997). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đường kính vòng vô khuẩn (ĐK) được tính bằng công thức: $D - d$

Trong đó: D là đường kính tổng (mm), d là đường kính của giếng (6 mm).

Đường kính vòng vô khuẩn (mm) tương ứng sẽ được xác định là: không có tính kháng khuẩn: $\text{ĐK} < 1$ mm, tính kháng khuẩn trung bình: $1 \text{ mm} \leq \text{ĐK} \leq 5$ mm, tính kháng khuẩn mạnh: $6 \text{ mm} \leq \text{ĐK} \leq 20$ mm (Huynh et al., 2019).

2.2.5. Định danh vi khuẩn *Bacillus* sp.

Chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng phân giải tinh bột và cho hàm lượng đường khử cao nhất sẽ được chọn để giải trình tự gene *16S rRNA*.

Vi khuẩn *Bacillus* được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Trình tự gene 16S rRNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. Thành phần của quá trình PCR bao gồm: mạch khuôn DNA, enzyme Taq polymecrase, đoạn mồi 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') và 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'). Chất lượng sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2%, sản phẩm có chất lượng tốt được tiến hành giải trình tự đoạn gene *16S rRNA*. Kết quả được phân tích bằng BLAST trình tự trên hệ thống NCBI để so sánh với các trình tự tương đồng đã được công bố, trình tự gen và di truyền được phân tích. Giản đồ phả hệ được xây dựng bằng

phương pháp Maximum Likelihood với mô hình tiến hóa Kimura 2-parameter. Độ tin cậy của sự phân nhóm được kiểm định bằng kỹ thuật bootstrap với 1000 lần lặp lại. Các phân tích được thực hiện bằng phần mềm MEGA X (Kumar et al., 2018).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

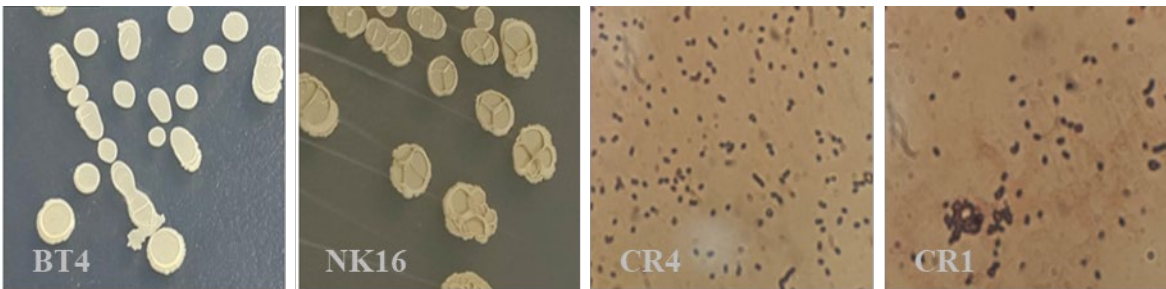
3.1. Phân lập và nhận diện các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp.

Khuẩn lạc của 20 chủng phân lập từ nước thải bánh mì có hình dạng và màu sắc đặc trưng của

nhóm vi khuẩn thuộc Chi *Bacillus* như: đều có dạng hình tròn màu trắng đục hoặc trắng sữa, có bờ nguyên, chia thùy hoặc răng cưa; độ nổi mô hoặc lồi; bề mặt khuẩn lạc có trạng thái nhẵn hoặc láng; kích thước khuẩn lạc dao động từ 0,5 đến 5,0 mm trên môi trường NA. Tế bào có dạng hình que ngắn; Gram dương; có khả năng sinh enzyme catalase, oxidase (Hình 1 và Bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào và đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc						Đặc điểm tế bào	Gram	Oxidase/ Catalase/ Indole
		Màu sắc	Hình	Độ nổi	Bề mặt	Dạng bờ	Kích thước (mm)			
1	BT4	Trắng sữa	Tròn	Lồi	Nhẵn	Nguyên	2,0-3,0	Que ngắn	+	+/+/+
2	BT9	Trắng đục	Tròn	Mô	Láng	Răng cưa	2,5-3,5	Que ngắn	+	+/+/+
3	BT10	Trắng đục	Tròn	Mô	Láng	Răng cưa	0,5-2,0	Que ngắn	+	+/+/+
4	BT11	Trắng sữa	Tròn	Lồi	Nhẵn	Nguyên	2,5-3,0	Que ngắn	+	+/+/+
5	CR1	Trắng đục	Tròn	Mô	Nhẵn	Răng cưa	2,5-3,0	Que ngắn	+	+/+/+
6	CR3	Trắng sữa	Tròn	Mô	Nhẵn	Chia thùy	3,5-4,0	Que ngắn	+	+/+/+
7	CR4	Trắng đục	Tròn	Lồi	Láng	Răng cưa	1,5-2,0	Que ngắn	+	+/+/+
8	CR14	Trắng sữa	Tròn	Lồi	Nhẵn	Chia thùy	3,0-3,5	Que ngắn	+	+/+/+
9	CR16	Trắng đục	Tròn	Lồi	Láng	Chia thùy	3,0-5,0	Que ngắn	+	+/+/+
10	NK1	Trắng sữa	Tròn	Lồi	Nhẵn	Nguyên	3,0-3,5	Que ngắn	+	+/+/+
11	NK3	Trắng đục	Tròn	Lồi	Nhẵn	Nguyên	3,5-5,0	Que ngắn	+	+/+/+
12	NK16	Trắng đục	Tròn	Lồi	Nhẵn	Chia thùy	3,0-3,5	Que ngắn	+	+/+/+
13	NK18	Trắng đục	Tròn	Lồi	Nhẵn	Răng cưa	2,5-3,5	Que ngắn	+	+/+/+
14	CT1.2	Trắng đục	Tròn	Lồi	Láng	Răng cưa	3,0-4,0	Que ngắn	+	+/+/+
15	CT1.3	Trắng ngà	Tròn	Lồi	Nhẵn	Răng cưa	5,0-6,0	Que ngắn	+	+/+/+
16	CT2	Trắng đục	Tròn	Lồi	Nhẵn	Chia thùy	4,0-6,0	Que ngắn	+	+/+/+
17	CT3	Trắng đục	Tròn	Lồi	Nhẵn	Răng cưa	3,0-4,0	Que ngắn	+	+/+/+
18	CT4	Trắng đục	Tròn	Lồi	Nhẵn	Răng cưa	4,0-5,0	Que ngắn	+	+/+/+
19	CT6	Trắng ngà	Không đều	Lồi	Láng	Chia thùy	4,0-5,0	Que ngắn	+	+/+/+
20	CT8	Trắng đục	Không đều	Lồi	Nhẵn	Chia thùy	4,0-5,0	Que ngắn	+	+/+/+



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn

3.2. Khả năng sản sinh enzyme amylase

Kết quả nghiên cứu cho thấy, phần lớn các chủng vi khuẩn phân lập *Bacillus* spp. đều có khả năng phân giải tinh bột tại thời điểm 2; 4; 6 và 8 ngày. Khả năng phân giải tinh bột của 20 chủng vi khuẩn phân lập tại thời điểm 2 đến 8 ngày nuôi cấy lắc có đường kính vòng halo đạt từ 7,33 đến 30 mm (Bảng

2). Khả năng phân giải tinh bột của các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này cho thấy sự tương đồng đáng kể với kết quả của Mai et al. (2019). Cụ thể khả năng phân giải tinh bột của các chủng vi khuẩn được phân lập từ ruột sùng (*Holotrichia parallela*), trùn đất (*Lubricus terrestris*) và rác thải hữu cơ. Các chủng vi khuẩn này đã thể hiện khả năng tạo vòng

halo khi nhuộm với dung dịch Lugol với đường kính vòng halo dao động từ 5,7 mm đến 23,4 mm, điều này cho thấy mức độ phân giải tinh bột mạnh mẽ và đa dạng tùy thuộc vào từng chủng vi khuẩn được phân lập. Kết quả khảo sát khả năng phân giải tinh

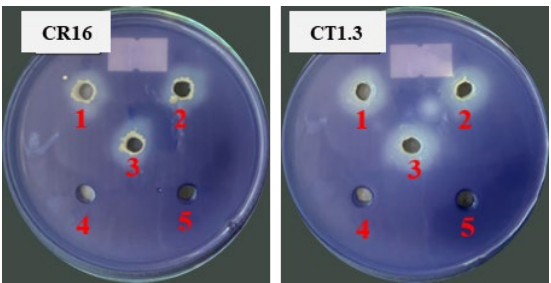
bột của các chủng vi khuẩn phân lập từ nước thải sản xuất bánh mì trong nghiên cứu này cao hơn các chủng vi khuẩn được phân lập từ rơm rạ hoai mục và chất thải rắn trong nghiên cứu của Dang and Tran (2022), kết quả chỉ đạt từ 9,66 đến 13,81 mm.

Bảng 2. Khả năng phân giải tinh bột bởi các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp.

STT	Chủng vi khuẩn	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6	Ngày 8
1	BT4	18,67±0,58 ⁱ	20,33±0,58 ^{cdef}	16,33±0,58 ^{efg}	10,00±0,00 ^{ghij}
2	BT9	22,67±0,58 ^{ef}	15,33±0,58 ^{ij}	9,67±0,58 ^k	9,00±0,00 ^{ijk}
3	BT10	11,33±0,58 ^j	21,67±0,58 ^{bcd}	14,67±0,58 ^{ghi}	12,33±0,58 ^{ef}
4	BT11	28,00±0,00 ^b	21,67±0,58 ^{bcd}	20,67±0,58 ^a	18,00±1,00 ^{ab}
5	CR1	25,33±0,58 ^{cd}	19,33±0,58 ^{defg}	20,67±0,58 ^a	18,00±0,00 ^{ab}
6	CR3	12,00±1,00 ^j	16,67±0,58 ^{hij}	17,33±0,58 ^{cdef}	8,33±1,16 ^{jk}
7	CR4	26,33±0,58 ^{bc}	23,67±1,16 ^b	13,33±1,53 ^{hi}	11,00±0,00 ^{fgh}
8	CR14	24,33±0,58 ^{de}	17,33±0,58 ^{ghi}	19,00±0,00 ^{abcd}	18,33±0,58 ^a
9	CR16	22,67±0,58 ^{ef}	14,67±0,58 ^j	9,33±0,58 ^k	7,33±0,58 ^k
10	NK1	23,33±0,58 ^{ef}	18,33±0,58 ^{fgh}	10,67±1,16 ^{jk}	11,67±0,58 ^{fg}
11	NK3	26,33±0,58 ^{bc}	22,00±1,00 ^{bc}	20,00±0,00 ^{ab}	16,33±0,58 ^{bc}
12	NK16	30,00±0,00 ^a	28,33±0,58 ^a	19,67±0,58 ^{abc}	17,33±0,58 ^{ab}
13	NK18	25,33±0,58 ^{cd}	21,33±1,16 ^{bcd}	18,67±1,16 ^{abcde}	18,33±0,58 ^a
14	CT1.2	20,67±0,58 ^{gh}	19,00±1,00 ^{efgh}	17,67±1,16 ^{bcdef}	15,00±0,00 ^{cd}
15	CT1.3	19,00±0,00 ^{hi}	18,33±0,58 ^{fgh}	12,33±1,16 ^{ij}	9,67±0,58 ^{hij}
16	CT2	22,00±1,00 ^{fg}	17,67±1,16 ^{ghi}	16,67±0,58 ^{defg}	10,67±0,58 ^{fghi}
17	CT3	20,00±0,00 ^{hi}	18,67±1,16 ^{fgh}	16,67±1,16 ^{defg}	13,67±1,16 ^{de}
18	CT4	30,00±0,00 ^a	26,67±0,58 ^a	17,33±0,58 ^{cdef}	15,00±0,00 ^{cd}
19	CT6	25,33±0,58 ^{cd}	17,33±0,58 ^{ghi}	15,33±0,58 ^{fgh}	9,67±1,16 ^{hij}
20	CT8	20,00±1,00 ^{hi}	17,67±0,58 ^{ghi}	18,67±0,58 ^{abcde}	8,33±0,58 ^{jk}

Ghi chú: Các giá trị là trung bình của 3 lần lặp lại, các giá trị trong cùng thời điểm theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% bằng kiểm định Tukey.

Cụ thể, khi nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong môi trường NB sau 2 ngày cho thấy chủng vi khuẩn NK16 và CT4 là hai chủng vi khuẩn cho đường kính vòng phân giải cao nhất là 30,00 mm và thấp nhất là chủng vi khuẩn CR3 với đường kính vòng phân giải là 12,00 mm khác biệt có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 5%. Đến thời điểm 4 ngày, đường kính vòng phân giải của chủng hai chủng vi khuẩn NK16 và CT4 vẫn duy trì ở mức cao nhất với đường kính vòng phân giải đạt lần lượt là 28,33 mm và 26,67 mm; chủng vi khuẩn có đường kính vòng phân giải thấp nhất là CR16 với đường kính vòng phân giải là 14,67 mm khác biệt không ý nghĩa với các chủng vi khuẩn BT9 và CR3. Đến thời điểm 6 ngày nuôi cấy, chủng vi khuẩn BT11, CR1 cho đường kính vòng phân giải tinh bột cao nhất đạt 20,67 mm khác biệt không có ý nghĩa với các chủng CR14, NK3, NK16, NK18 và CT8. Bên cạnh đó, đến thời điểm 8 ngày chủng vi khuẩn CR14 và NK18 có khả năng phân giải tinh bột cao nhất, đạt 18,33 mm khác biệt không có ý nghĩa với các chủng BT11, CR1 và NK16.



Hình 2. Vòng phân giải tinh bột của các chủng vi khuẩn

Ghi chú: Ký hiệu 1,2,3 là giếng chứa dịch nổi sau ly tâm của vi khuẩn; ký hiệu 4 là giếng chứa nước cất; ký hiệu 5 là giếng chứa môi trường NB.

Dựa vào kết quả nghiên cứu trên cho thấy, có 8/20 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng phân giải tinh bột từ thời điểm 2 ngày đến 8 ngày với đường kính vòng phân giải cơ chất trên 15 mm. Các chủng vi khuẩn BT11, CR1, CR14, NK3, NK16, NK18, CT1.2 và CT4 được tuyển chọn để xác định

hàm lượng đường khử sinh ra bằng phương pháp DNS.

3.3. Xác định hàm lượng đường khử

Tám chủng vi khuẩn BT11, CR1, CR14, NK3, NK16, NK18, CT1.2 và CT4 là tám chủng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột ở mức mạnh ($20 \leq D - d < 25$ mm) và duy trì từ thời điểm 2 ngày đến 6 ngày nuôi lắc nên tám chủng vi khuẩn này được tiến hành khảo sát hàm lượng đường khử sinh ra. Hàm

lượng đường khử sinh ra bởi các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có sự biến thiên tại 4 thời điểm khảo sát (Bảng 3). Kết quả nghiên cứu cho thấy từ thời điểm 2 ngày đến 8 ngày hàm lượng đường khử sinh ra bởi chủng vi khuẩn NK16 là cao nhất với hàm lượng đường khử tăng dần từ 1,338 mg/mL đến 2,096 mg/mL, hàm lượng đường khử sinh ra bởi chủng vi khuẩn NK18 là thấp nhất với hàm lượng đường khử dao động từ 0,532 mg/mL đến 1,173 mg/mL.

Bảng 3. Hàm lượng đường khử sinh ra bởi các chủng vi khuẩn tuyển chọn

STT	Chủng vi khuẩn	Hàm lượng đường khử (mg/mL)			
		2 ngày	4 ngày	6 ngày	8 ngày
1	BT11	1,234±0,035 ^b	1,735±0,008 ^d	1,668±0,026 ^c	1,603±0,010 ^b
2	CR1	0,789±0,011 ^d	1,171±0,013 ^f	1,123±0,005 ^e	0,945±0,011 ^c
3	CR14	1,128±0,007 ^c	1,546±0,005 ^e	1,529±0,014 ^d	1,234±0,023 ^d
4	NK3	0,685±0,005 ^e	1,887±0,000 ^b	1,734±0,031 ^b	1,629±0,050 ^b
5	NK16	1,338±0,008 ^a	2,096±0,026 ^a	1,798±0,018 ^a	1,787±0,006 ^a
6	NK18	0,532±0,009 ^f	0,666±0,011 ^h	0,927±0,016 ^f	1,173±0,061 ^d
7	CT1.2	0,669±0,011 ^e	0,834±0,012 ^g	1,134±0,013 ^e	1,389±0,021 ^c
8	CT4	1,251±0,005 ^b	1,804±0,011 ^c	1,752±0,006 ^{ab}	1,371±0,011 ^c

Ghi chú: Các giá trị trung bình của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Cụ thể, tại thời điểm 2 ngày khảo sát chủng vi khuẩn NK16 cho hàm lượng đường khử cao nhất với 1,338 mg/mL; chủng NK18 là chủng cho hàm lượng đường khử thấp nhất đạt chỉ 0,532 mg/mL có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại. Đến thời điểm 4 ngày, chủng vi khuẩn NK16 vẫn cho hàm lượng đường khử cao với 2,096 mg/mL và chủng cho hàm lượng đường khử thấp nhất là NK18 (0,666 mg/mL). Trong suốt thời gian khảo sát, chủng NK16 vẫn duy trì được hàm lượng đường khử cao nhất 1,798 mg/mL khác biệt không ý nghĩa thống kê với chủng CT4 (1,752 mg/mL). Đặc biệt, chủng vi khuẩn NK16 vẫn duy trì được hàm lượng đường khử cao nhất và có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại với hàm lượng đường khử là 1,787 mg/mL.

Hàm lượng đường khử có xu hướng tăng từ thời điểm 2 ngày đến 8 ngày. Tuy nhiên, khả năng phân giải tinh bột trên đĩa tại thí nghiệm mục 3.2 lại có xu hướng giảm. Chủng vi khuẩn NK16 sinh ra trong nghiên cứu này nhỏ hơn kết quả nghiên cứu của Tran et al. (2022) về chủng vi khuẩn KTXA1 với hàm lượng đường khử là 2,99 mg/mL sau 2 ngày khảo sát. Nguyên nhân có thể là do môi trường nuôi cấy vi khuẩn trong thí nghiệm 3.2 là môi trường NB với các thành phần dinh dưỡng dễ sử dụng, giúp quá trình trao đổi chất diễn ra thuận lợi. Trong khi đó, môi trường đường khử là môi trường SA dạng lỏng,

yêu cầu vi khuẩn cần thời gian thích nghi. Vi khuẩn có xu hướng ưu tiên sử dụng các nguồn dinh dưỡng dễ hấp thụ trước khi phân giải tinh bột để tạo ra đường khử, dẫn đến sự gia tăng lượng đường khử tại các mốc thời gian khảo sát. Ngoài ra, vi khuẩn có thể tái sử dụng lượng đường khử tạo ra làm nguồn carbon, gây ra sự dao động trong lượng đường khử.

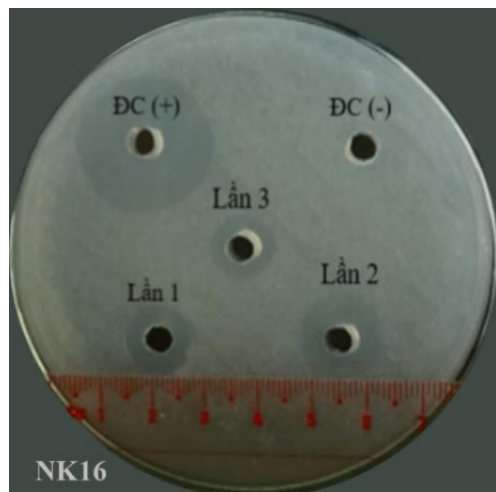
Qua kết quả khảo sát khả năng phân giải tinh bột bằng phương pháp DNS, nghiệm thức NK16 có khả năng phân giải tinh bột tạo ra lượng đường khử cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại ở tất cả thời điểm khảo sát, hàm lượng đường khử sinh ra nằm trong khoảng 1,338 mg/mL đến 2,096 mg/mL.

3.4. Khả năng kháng khuẩn *E.coli*

Từ các thí nghiệm trên, 8 chủng vi khuẩn được chọn để đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *E.coli*. Ba dòng vi khuẩn được xác định có khả năng ức chế *E.coli* là BT11, NK16 và CT4. Khả năng kháng chủng vi khuẩn chỉ thị dựa vào vòng vô khuẩn (mm) của chủng vi khuẩn đã chọn thể hiện ở (Hình 4) và kích thước trung bình ĐKVVK được thể hiện ở Bảng 4.

Khả năng tạo vòng vô khuẩn của chủng vi khuẩn đối kháng sau 48 giờ ủ được quan sát. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả cho thấy chủng NK16 có khả năng kháng *E.coli*. Đường kính vòng vô khuẩn

(mm) của NK16 là 9,33mm nằm trong mức kháng khuẩn mạnh: $6 \text{ mm} \leq \text{ĐKVVK} \leq 20 \text{ mm}$.



Hình 3. Khả năng ức chế *E. coli* của vi khuẩn NK16

Kết quả cho thấy có 3 chủng có khả năng kháng khuẩn chỉ thị với kích thước ĐKVVK dao động từ 9,33 - 6,67 mm, tạo vòng vô khuẩn lớn nhất là chủng vi khuẩn NK16 (9,33 mm), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% so với các chủng vi khuẩn còn lại, chủng cho ĐKVVK thấp nhất là chủng BT11 (7,33 mm) và CT4 (6,67 mm) khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Bên cạnh đó, có 5/8 chủng vi khuẩn không có khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn *E. coli*.

Bảng 4. Khả năng kháng vi khuẩn *E. coli*

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
BT11	7,33 ^b
NK16	9,33 ^a
CT4	6,67 ^b
CV (%)	17,31

Ghi chú: không có tính kháng khuẩn khi ĐKVVK < ĐKVVK $\leq 20 \text{ mm}$, theo Moore et al. (1997). Các giá trị trung bình của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Kết quả nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu của Tran et al. (2018) về hoạt tính kháng khuẩn của chủng *S. albobrisesolus* VD111 đối với một số vi sinh vật gây bệnh điển hình. Cụ thể, kích thước vòng vô khuẩn mà *S. albobrisesolus* VD111 tạo ra khi được thử nghiệm với các vi sinh vật gây bệnh dao động từ $16,8 \pm 0,1 \text{ mm}$ đến $19,5 \pm 0,1 \text{ mm}$. Trước đó, chủng xạ khuẩn HLD3.16 được phân lập tại Quảng Ninh cũng đã cho thấy khả năng kháng khuẩn

mạnh đối với 4 chủng vi sinh vật gây bệnh phổ biến, bao gồm: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 15224, *Sarcina lutea* M5 và *Aspergillus niger* 114. Kết quả cho thấy, đường kính vòng vô khuẩn của chủng HLD3.16 đối với các vi sinh vật gây bệnh này dao động từ 10,2 mm đến 17,5 mm. Chủng TH7 phân lập được trong nghiên cứu này có hoạt tính kháng khuẩn rất mạnh, đường kính vòng vô khuẩn đều lớn hơn 25 mm. Trong nghiên cứu của Nguyen et al. (2019), có 20 trong tổng số 62 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập thể hiện khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh *E. coli*, đường kính vòng vô khuẩn có xu hướng tăng và đạt cao nhất ở ngày thứ 2 sau khi ủ và giảm ở ngày thứ 3 (10/20 chủng). Qua nghiên cứu khảo sát khả năng kháng khuẩn của NK16 có tính kháng khuẩn mạnh nằm trong khoảng $6 \text{ mm} \leq \text{ĐKVVK} \leq 20 \text{ mm}$ được tuyển chọn để định danh.

3.5. Định danh vi khuẩn

Chủng vi khuẩn NK16 được chọn để giải trình tự gene vì chủng này có khả năng phân giải tinh bột bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch với hoạt tính enzyme amylase ở mức mạnh và duy trì được đến thời điểm 6 ngày nuôi lắ ở nhiệt độ phòng, chủng vi khuẩn này có khả năng phân giải tinh bột và cho ra hàm lượng đường khử, kháng *E.coli* cao nhất và có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$) so với các chủng vi khuẩn còn lại ở tất cả các thời điểm khảo sát. Sau khi giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn NK16, nó được so sánh với cơ sở dữ liệu ngân hàng gen trên NCBI bằng công cụ BLAST, kết quả cho thấy chủng vi khuẩn NK16 được xác định là chủng *Bacillus velezensis* với độ tương đồng đạt 99,73% (Bảng 5). Mỗi quan hệ di truyền giữa dòng vi khuẩn *Bacillus* NK16 với một số loài *Bacillus* khác được thể hiện qua sự phân nhóm trên giản đồ phát sinh loài (Hình 5). Dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. NK16 được xếp cùng nhánh với *B. velezensis*, *B. amyloquelais*, *B. vallismortis* với sự khác biệt về di truyền chỉ 0,2% và tỉ lệ bootstrap là 62%. Mỗi quan hệ di truyền gần gũi của 3 loài vi khuẩn này cũng được ghi nhận trong các phân tích đa dạng di truyền trên gen 16S rRNA (Adelskov & Patel, 2016; Fan et al., 2018). Việc kết hợp nhận diện hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào cho thấy NK16 tương đồng cao với *Bacillus velezensis*.

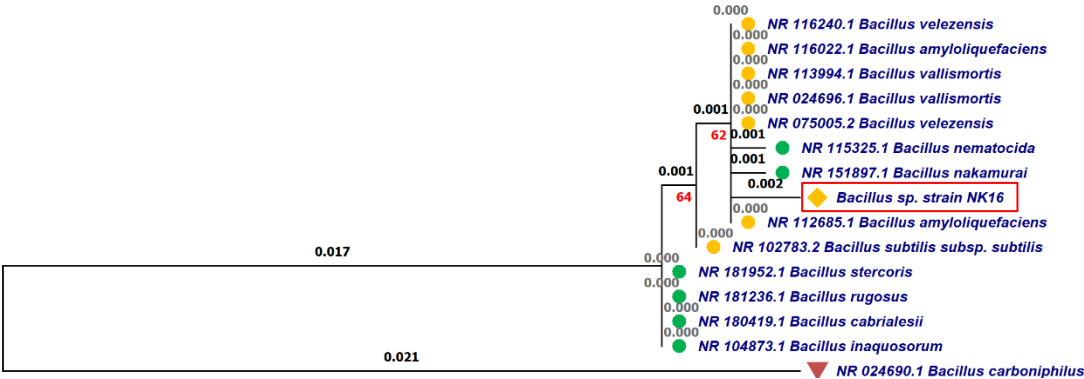
Kết quả quan sát hình thái tại Bảng 1 cho thấy phù hợp với mô tả của Huynh and Huynh (2024) về đặc điểm của dòng *Bacillus velezensis* là khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt nhẵn, dạng bìa chia thùy không đều. Theo kết quả nghiên cứu của Rabbee et

al. (2019), chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* đã được xác định là vi khuẩn Gram dương, không gây bệnh và hình thành nội bào tử. Chủng vi khuẩn này có mặt ở khắp nơi, chủ yếu là đất, nước, rễ cây và thực phẩm lên men. Chúng có khả năng thúc đẩy sự phát triển của thực vật ngay cả trong những điều kiện môi trường bất lợi. Trong nghiên cứu của Li et al. (2023) đã xác định chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* có tiềm năng sản xuất đa enzyme xuất sắc bao gồm: protease, cellulase và phytase. Hơn nữa, chủng này còn thể hiện hoạt tính phân giải tinh bột và phân giải mỡ với hàm lượng cao trong ống nghiệm. Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn *Bacillus*

velezensis còn được ứng dụng ngày càng phổ biến trong vấn đề xử lý ô nhiễm môi trường, đặc biệt là môi trường bị ô nhiễm bởi các chất hữu cơ. Trong nghiên cứu của Agunbiade et al. (2022) đã công bố chủng vi khuẩn này có hoạt tính tạo chất kết tụ sinh học dạng polysaccharide cao với hoạt tính kết tụ đạt 96,8%. Chất kết tụ sinh học tinh khiết được tạo ra bởi *B. velezensis* đã loại bỏ đáng kể nhu cầu oxy hóa học, nhu cầu oxy sinh học và độ đục trong nước thải nhà máy bia, kết quả nghiên cứu này đã cho thấy tiềm năng ứng dụng vi khuẩn *B. velezensis* trong xử lý nước thải.

Bảng 5. Độ tương đồng của trình tự vùng gen 16S của vi khuẩn NK16 với cơ sở dữ liệu NCBI

Độ dài (nt)	Độ phủ (%)	Độ tương đồng (%)	Loài	Mã số
1112	100	99,73	<i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	NR_075005.2
		99,73	<i>Bacillus vallismortis</i> strain DSM 11031	NR_024696.1
		99,64	<i>Bacillus velezensis</i> strain CBMB205	NR_116240.1
		99,64	<i>Bacillus vallismortis</i> strain NBRC 101236	NR_113994.1
		99,55	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain 168	NR_102783.2
		99,55	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain BCRC 11601	NR_116022.1
		99,46	<i>Bacillus nakamurai</i> strain NRRL B-41091	NR_151897.1



Hình 4. Mối quan hệ di truyền giữa dòng vi khuẩn NK16 và các loài *Bacillus* khác dựa vào trình tự gen 16S rRNA

4. KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu là phân lập được 20 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột. Các khuẩn lạc vi khuẩn này thể hiện sự đa dạng về màu sắc bao gồm: màu vàng, màu trắng ngà hoặc trắng đục. Các chủng này đều thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương. Đáng chú ý, có 8 chủng vi khuẩn bao gồm BT11, CR1, CR14, NK3, NK16, NK18, CT1.2 và CT4 thể hiện khả năng phân giải tinh bột mạnh mẽ. Khả năng này được duy trì đến thời điểm 8 ngày khi nuôi cấy lắc cho thấy tiềm năng cao trong việc ứng dụng các chủng vi khuẩn này vào các quy trình sản xuất enzyme amylase hoặc các ứng dụng phân giải tinh bột khác trong công nghiệp sinh học. Chủng vi

khẩn NK16 cho hàm lượng đường khử cao nhất dao động từ 1,338 đến 2,096 mg/mL tại thời điểm 2 ngày đến 8 ngày. Khả năng kháng *E.coli* của chủng NK16 tạo vòng vô khuẩn mạnh đạt 9,33 mm. Kết quả phân tích giải trình tự gen 16S rRNA xác định chủng vi khuẩn NK16 thuộc chi *Bacillus* và có mức tương đồng lên đến 99,73% với loài *Bacillus velezensis*. Với kết quả nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. NK16 là chủng vi khuẩn tiềm năng trong việc xử lý nước thải tại các cơ sở sản xuất có nguồn nguyên liệu đầu vào là tinh bột.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, mã số: T2024-124.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Adelskov, J., & Patel, B. K. (2016). A molecular phylogenetic framework for *Bacillus subtilis* using genome sequences and its application to *Bacillus subtilis* subspecies stecoris strain D7XPN1, an isolate from a commercial food-waste degrading bioreactor. *Biotech*, 6(1), 96. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0408-8>
- Agunbiade, M., Oladipo, B., Ademakinwa, A. N., Awolusi, O., Adesiyun, I. M., Oyekola, O., & Ojo, A. (2022). Bioflocculant produced by *Bacillus velezensis* and its potential application in brewery wastewater treatment. *Scientific Reports*, 12(1), 10945. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15193-8>
- Bhatt, B., Prajapati, V., Patel, K., & Trivedi, U. (2020). Kitchen waste for economical amylase production using *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101654. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101654>
- Chen, Q., Ding, Q., Li, W., Deng, J., Lin, Q., & Li, J. (2022). Enhanced treatment of organic matters in starch wastewater through *Bacillus subtilis* strain with polyethylene glycol-modified polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogel microspheres. *Bioresource Technology*, 347, 126741. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126741>
- Dang, Q. H., & Tran, T. T. T. (2022). Isolation, screening and identification of effective microbial strains to make bio-organic fertilizer from organic solid waste. *The University of Danang-Journal of Science and Technology*, 20(5), 56-61 (in Vietnamese).
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
- Geetha, K., Venkatesham, E., Hindumathi, A., & Bhadrarai, B. (2014). Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on *Vigna Radita* (L.) R. Wilczek. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3(6), 799-899.
- Huynh, N. T. T., Nguyen, L. H. D., & Phan, T. T. S. (2019). Isolation and selection of *Lactobacillus* having probiotic potential from *Colocasia esculenta* (L.) Schott. *CTU Journal of Science*, 55(1), 15-23. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2019.017>
- Huynh, N. T. T., & Huynh, V. T. (2020). Characteristics of *Bacillus* spp. from white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Kien Giang province. *CTU journal of science*, 56(2), 44-52. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.029> (in Vietnamese).
- Huynh, Y. N., & Huynh, N. T. T. (2024). Isolation and selection of starch degrading bacteria from vermicelli production wastewater. *TNU Journal of Science and Technology*, 229(1), 28-37. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8243> (in Vietnamese).
- Kieliszek, M., Piwowarek, K., Anna, M. Kot., & Katarzyna, P. (2020). The aspects of microbial biomass use in the utilization of selected waste from the agro-food industry. *Open Life Sci*, 15(1), 787 - 796. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0099>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Li, C., Li, S., Dang, G., Jia, R., Chen, S., Deng, X., & Cai, H. (2023). Screening and characterization of *Bacillus velezensis* LB-Y-1 toward selection as a potential probiotic for poultry with multi-enzyme production property. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1143265. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1143265>
- Lopes, G. R., Oliveira, H. M., Jesus, G. F. A., Martins, M. L., Gomes, C. H. A. M., Soligo, T., & Mourão, J. L. P. (2020). Biological strategy to improve decomposition of organic matter in tilapia pond. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 32(e27). DOI.org/10.1590/S2179-975X8419.
- Mai, T., Nguyen, H. H., & Che, M. N. (2019). Isolation and identification of starch-degrading bacteria from organic waste and intestines (*Holotrichia parallela*) và earthworms (*Lubricus terrestris*). *Can Tho University Journal of Science*, 55, 57-64 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2019.044>
- Moore, L. W., Chilton, W. S., & Canfield, M. L. (1997). Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 201-207. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.201-207.1997>
- Nguyen, H. H., & Ly, N. T. H. (2012). Isolation of bacteria strains capable of degrading starch. *Can Tho University Journal of Science*, 21(a), 37-44 (in Vietnamese).
- Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. H. (2019). *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1046.

- Rani, N., Sangwan, P., Joshi, M., Sagar, A., & Bala, K. (2019). *Microbial Wastewater Treatment* (Chapter 5 - Microbes: A Key Player in Industrial Wastewater Treatment), Microbes. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-03885-5>
- Tran, T. G., Trinh, H. N., Nguyen, T. H. N., Vo, D. L. A., & Do, T. K. (2022). Isolation and selection of starch-degrading bacteria strains, *Can Tho University Journal of Science*, 58, 225-231 (in Vietnamese).
- Tran, T. T., Nguyen, V. G., Tran, T. H., Chu, D. H., Pham, P. T., & Nguyen, V. G. (2018). Characterization of marine-derived *Streptomyces* spp against pathogenic bacteria. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 6(10), 13-17 (in Vietnamese).
- Vu, T. M.C., Nguyen, T. H., Quang, T. M., & Nguyen, D. T. (2023). Assess the wastewater treatment efficiency of the rice paper craft village with activated sludge supplemented with probiotics. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 65(8), 61-66 (in Vietnamese). [https://doi.org/10.31276/VJST.65\(8\).61-66](https://doi.org/10.31276/VJST.65(8).61-66)