



DOI:10.22144/ctu.jos.2026.043

PHÂN LẬP VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI LIPID TRONG NƯỚC THẢI CHẾ BIẾN TÔM VÀ CÁ DA TRƠN

Phạm Như Huỳnh¹, Võ Phát Tài² và Nguyễn Thị Phi Oanh^{2*}

¹Học viên cao học ngành Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

²Trường Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

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

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 08/09/2025

Sửa bài (Revised): 21/10/2025

Duyệt đăng (Accepted): 05/02/2026

Title: Isolation of lipid degrading bacteria from shrimp and catfish processing wastewater

Author(s): Pham Nhu Huynh¹, Vo Phat Tai² and Nguyen Thi Phi Oanh²

Affiliation(s): ¹Graduate student in Biotechnology, Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Viet Nam; ²College of Natural Sciences, Can Tho University, Viet Nam

TÓM TẮT

Chế biến thủy sản là ngành công nghiệp góp phần đảm bảo nguồn thực phẩm cho địa phương, trong nước và xuất khẩu. Tuy nhiên, nước thải chế biến thủy sản chứa nhiều chất hữu cơ, trong đó có lipid, cần được xử lý đúng cách để không gây ô nhiễm môi trường. Từ các mẫu nước thải chế biến tôm và cá da trơn, 19 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải lipid đã được phân lập, trong đó, 4 dòng LF2, LF4, LS3 và LS4 có hoạt tính lipase cao nhất ở thời điểm 48 giờ nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 1% dầu hướng dương. Dòng vi khuẩn LS4 có hoạt tính lipase cao nhất trong môi trường pH trung tính, đạt 47,19 U/mL. Kết quả so sánh trình tự gen 16S-rRNA và đặc điểm sinh hóa chứng tỏ dòng vi khuẩn LS4 thuộc loài *Aeromonas hydrophila* nên được định danh là *Aeromonas hydrophila* LS4.

Từ khóa: *Aeromonas hydrophila*, lipase, lipid, nước thải chế biến thủy sản

ABSTRACT

Seafood processing is an industry contributing to food supply for local consumption, domestic markets, and export. However, wastewater from seafood processing contains a high amount of organic compounds such as lipids, which should be properly treated to avoid environmental pollution. From wastewater samples collected at a shrimp and catfish processing factory, 19 lipid-degrading bacterial isolates were obtained, of which LF2, LF4, LS3, and LS4 exhibited the highest lipase activity at 48 hours of cultivation in minimal medium supplemented with 1% sunflower oil. The isolate LS4 showed the highest lipase activity under neutral pH conditions (47.19 U/mL). Sequence analysis of the 16S-rRNA gene and biochemical characterization of LS4 confirmed that the isolate belongs to *Aeromonas hydrophila* and was designated as *Aeromonas hydrophila* LS4.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, lipase, lipid, seafood processing wastewater

1. GIỚI THIỆU

Chế biến thủy sản là một trong những ngành công nghiệp quan trọng và phát triển nhanh. Theo báo cáo của Tổ chức Nông lương Liên Hiệp Quốc (FAO), ngành chế biến thủy sản toàn cầu là nguồn cung cấp thực phẩm chính cho hàng triệu người trên thế giới, đạt doanh thu khoảng 1.200 tỷ USD vào năm 2022 (FAO, 2022). Chế biến thủy sản không chỉ làm tăng giá trị từ nguồn tài nguyên thủy sản mà còn góp phần vào việc phát triển kinh tế địa phương, đặc biệt ở các quốc gia ven biển như Việt Nam. Mặc dù chế biến thủy sản mang lại nhiều lợi ích kinh tế, nhưng cũng đối mặt với các vấn đề về môi trường do nước thải chế biến thủy sản chứa phần lớn các chất thải hữu cơ, trong đó có lipid. Lipid không tan trong nước có thể tạo váng lipid trên mặt nước làm giảm nồng độ oxy hòa tan trong nước, ảnh hưởng đến đời sống của các động vật thủy sinh (Fitzgerald et al., 2020). Sự tích tụ lipid cũng có thể dẫn đến tắc nghẽn đường ống, làm giảm hiệu suất của quá trình xử lý nước thải (Liu et al., 2018).

Để giảm thiểu lipid trong nước thải, nhiều phương pháp xử lý đã được nghiên cứu và áp dụng. Trong đó, xử lý sinh học sử dụng vi sinh vật có khả năng tổng hợp lipase để phân hủy lipid thành các sản phẩm không gây hại được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng. Công nghệ này có thể bao gồm hệ thống lọc sinh học hoặc bể sinh học có tác dụng phân hủy lipid (Chính, 2021). Các vi sinh vật đã được chứng minh có khả năng tổng hợp lipase như vi khuẩn *Klebsiella* sp. (Bhatia & Sharma, 2012), *Bacillus* sp. (Kumar et al., 2003), *Pseudomonas* sp. (Liang et al., 2018), *Rhodopseudomonas* sp. (Nhi và ctv., 2020) hoặc nấm *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* và *Rhizomucor* (Muir & Yamane, 1997).

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là vùng nuôi trồng thủy sản lớn, trong đó, Cần Thơ là một trong những khu vực trọng điểm về chế biến tôm và cá da trơn. Theo Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Việt Nam, Cần Thơ (sau khi sáp nhập với Hậu Giang và Sóc Trăng) có khoảng 60 cơ sở và nhà máy chế biến thủy sản. Lipid trong nước thải chế biến thủy sản được xử lý vật lý bằng cách vớt các váng lipid nổi trên mặt nước. Theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về nước thải chế biến thủy sản (QCVN-32-1:2019/BNNPTNT) thì tổng dầu mỡ động, thực vật trong nước thải sau khi xử lý khi xả ra nguồn nước được dùng cho mục đích cấp nước sinh hoạt là 10 mg/L. Hiện nay, việc ứng dụng biện pháp sinh học để xử lý chất thải chứa lipid vẫn còn hạn chế. Chính vì vậy, nước thải chế biến thủy sản cũng là vấn đề được quan tâm nghiên cứu để giảm thiểu ô nhiễm

môi trường. Mặc dù đã có nhiều công bố về vi sinh vật có khả năng tổng hợp lipase nhưng cho đến nay, các nghiên cứu về xử lý sinh học lipid trong nước thải chế biến thủy sản ở ĐBSCL rất hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng phân giải lipid làm tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng xử lý lipid trong nước thải.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu mẫu

Mẫu nước thải đầu ra và mẫu nước thải của bể hiếu khí được thu tại hệ thống xử lý nước thải chế biến tôm và cá da trơn thuộc Khu công nghiệp Trà Nóc, thành phố Cần Thơ. Mẫu được thu trong chai nhựa vô trùng, sau đó mẫu được bảo quản lạnh và chuyển về phòng thí nghiệm Sinh học Tế bào và Phân tử, Khoa Sinh học, Trường Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ để tiến hành phân lập vi khuẩn.

2.2. Phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải lipid

Chọn lọc vi khuẩn: Quy trình làm giàu mật số vi khuẩn được thực hiện theo mô tả của Cipinyte et al. (2009). Chủng 5 mL mẫu nước thải vào bình tam giác 100 mL chứa 45 mL môi trường gồm 1 g/L dầu hướng dương, 0,5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,1 g/L MgSO₄, 0,5 g/L KH₂PO₄, 0,1 g/L CaCl₂ và 1 g/L cao nấm men. Mẫu được nuôi cấy trên máy lắc tròn với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau 1 tuần nuôi cấy, 5 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn được chuyển vào môi trường tương tự, vi khuẩn phân giải lipid được chọn lọc bằng cách nuôi cấy 1 tuần và tiếp tục chuyển huyền phù vi khuẩn lần 2 và lần 3 trong 2 tuần liên tiếp.

Phân lập vi khuẩn: Sau 3 lần chọn lọc, mẫu được để yên 30 phút, sau đó pha loãng huyền phù vi khuẩn đến 10⁻⁵ (hệ số pha loãng 10 lần). Tiếp theo, 100 µL huyền phù của từng độ pha loãng được hút và trải lên môi trường thạch Tween 80, mẫu được ủ ở 32°C. Môi trường thạch Tween 80 là môi trường tương tự như môi trường sử dụng để chọn lọc vi khuẩn như đã trình bày ở trên, tuy nhiên, dầu hướng dương được thay bằng Tween 80 (1% v/v). Qua 72 giờ, những khuẩn lạc rời rạc, khác nhau về hình thái, làm đục môi trường xung quanh khuẩn lạc được phân lập thuần bằng phương pháp cấy ria trên môi trường thạch Tween 80 (Cipinyte et al., 2009). Sau đó, các khuẩn lạc được tiếp tục cấy ria để làm rỗng trên môi trường TSA. Những dòng vi khuẩn thuần được mô tả hình thái khuẩn lạc sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA và xác định Gram. Gram được xác định

nhanh bằng phương pháp String test theo mô tả của Dash and Payyappilli (2016). Tế bào của các dòng vi khuẩn phân giải lipid tiềm năng được nhuộm Gram bằng phương pháp truyền thống theo mô tả của Ảnh (2006) để quan sát hình dạng và đo kích thước tế bào ở độ phóng đại 1000X dưới kính hiển vi quang học.

2.3. Khảo sát khả năng phân giải lipid của vi khuẩn phân lập

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn: Các dòng vi khuẩn được phân lập từ kết quả ở Mục 2.2 được sử dụng để đánh giá khả năng phân giải lipid. Chúng một khuẩn lạc của mỗi dòng khuẩn vào 4 mL môi trường TSB. Vi khuẩn được nuôi cấy trên máy lắc tròn với tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, 1,8 mL dịch huyền phù vi khuẩn sau nuôi cấy được hút và cho vào eppendorf 2 mL, ly tâm mẫu ở 4°C với vận tốc 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Tiếp đó, phần dung dịch phía trên được loại bỏ và phần sinh khối tế bào được rửa 3 lần bằng dung dịch NaCl 0,9% (w/v). Huyền phù vi khuẩn được hiệu chỉnh bằng dung dịch NaCl 0,9% để đạt giá trị $OD_{600nm} = 0,7$ và sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo. Khả năng phân giải lipid của vi khuẩn được xác định trên 2 loại môi trường có bổ sung tributyrin và Tween 80.

Khả năng phân giải tributyrin được khảo sát theo phương pháp của Carrazco-Palafox et al. (2018) có hiệu chỉnh: Thí nghiệm được thực hiện với hai nghiệm thức: (1) chủng 50 μ L dung dịch huyền phù vi khuẩn ($OD_{600nm} = 0,7$); và (2) cho 50 μ L dung dịch NaCl 0,9% vào giếng (đường kính 9 mm) trên môi trường tributyrin agar (1%). Sau 24 giờ, các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải lipid tạo vòng sáng xung quanh giếng trên môi trường tributyrin.

Khả năng phân giải Tween 80 được tiến hành theo mô tả của Jain et al. (2012) có hiệu chỉnh. Thí nghiệm được thực hiện tương tự như thí nghiệm khảo sát khả năng phân giải tributyrin. Sau 24 giờ, các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy lipid tạo vòng đục xung quanh giếng trên môi trường Tween 80. Đường kính vòng phân giải (mm) được tính bằng hiệu số giữa đường kính vòng sáng/đục (mm) và đường kính giếng (9 mm).

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và pH đến khả năng tổng hợp lipase của vi khuẩn

Việc khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự tổng hợp lipase của vi khuẩn được tiến hành bằng cách chủng 40 μ L huyền phù của từng dòng vi khuẩn đã được điều chỉnh mật độ quang (dịch huyền

phù vi khuẩn sau nuôi cấy được ly tâm và rửa sinh khối tế bào như mô tả ở Mục 2.3 để đạt giá trị $OD_{600nm} = 0,7$) vào 4 mL môi trường khoáng tối thiểu (MM) có bổ sung 1% dầu hướng dương. Vi khuẩn được nuôi cấy trên máy lắc (200 vòng/phút) ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 72 giờ, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau mỗi 24 giờ nuôi cấy, xác định mật độ quang của huyền phù vi khuẩn ở bước sóng 600 nm, mật số vi khuẩn bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben & Somasegaran, 1982) và hoạt tính lipase (Pinsirodom & Parkin, 2001). Thành phần của môi trường MM gồm 1,4196 g Na_2HPO_4 ; 1,3609 g KH_2PO_4 ; 0,3 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,0985 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5,75 mg $CaCl_2 \cdot H_2O$; 3,2 mg Na_2EDTA ; 2,75 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,7 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$; 1,16 mg H_3BO_3 ; 1,15 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,24 mg $CuSO_4$; 0,235 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,125 mg $(NH_4)_6Mo_{24} \cdot 4H_2O$; 1000 mL H_2O ; pH $7 \pm 0,2$; (Nguyen et al., 2014).

Ảnh hưởng của pH đến sự tổng hợp lipase của vi khuẩn cũng được thực hiện tương tự, tuy nhiên, môi trường MM được hiệu chỉnh về các giá trị pH 6, 7 và 8 trước khi chủng vi khuẩn.

2.5. Xác định hoạt tính lipase

Phương pháp xác định hoạt tính lipase được chuẩn bị và tiến hành theo mô tả của Pinsirodom and Parkin (2001). Phản ứng giữa *p*-nitrophenyl laurate và enzyme lipase thô trong Tris-Cl 0,1 M (pH 8) tạo ra sản phẩm sau phản ứng là *p*-nitrophenol.

Huyền phù vi khuẩn tại thời điểm thu mẫu được ly tâm 3.000 vòng/phút trong 10 phút. Dung dịch thu được sau ly tâm được sử dụng như lipase thô. Cho 2,5 mL dung dịch đệm Tris-Cl 0,1 M (pH 8), 2,5 mL 420 μ M *p*-nitrophenyl laurate và 1 mL dung dịch lipase thô vào ống nghiệm 10 mL, trộn đều hỗn hợp và ủ mẫu ở 37°C trong 15 phút. Sau khi ủ, mẫu được kiểm tra độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 410 nm. Một đơn vị hoạt động lipase (U) được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng 1 μ mol *p*-nitrophenol khỏi *p*-nitrophenyl laurate mỗi phút trong điều kiện thí nghiệm (1U = 1 μ mol *p*-nitrophenol trong 1 phút) (Gitlesen et al., 1997).

2.6. Đánh giá sự khác nhau về di truyền của các dòng vi khuẩn phân hủy lipase được tuyển chọn

Kỹ thuật BOX-PCR được tiến hành để đánh giá sự khác nhau về di truyền của các dòng vi khuẩn được tuyển chọn. Các dòng vi khuẩn phân giải lipid hiệu quả (dựa vào kết quả Mục 2.4 khi khảo sát về mật số vi khuẩn và hoạt tính lipase theo thời gian) được nuôi cấy trên môi trường TSA trong 24 giờ,

sau đó tiến hành ly trích DNA và thực hiện phản ứng BOX-PCR.

Dùng đầu cone khử trùng để lấy một khuẩn lạc và cho vào ống PCR có chứa 100 µL nước cất vô trùng. Vi khuẩn được trộn đều vào nước cất bằng cách vortex. Mẫu được giữ ở 99°C trong 5 phút để phá vỡ tế bào, sau đó hỗn hợp chứa DNA vi khuẩn được bảo quản ở -30°C đến khi sử dụng (Horecka & Chu, 2017). DNA trong hỗn hợp được sử dụng để thực hiện phản ứng BOX-PCR với môi BOX-A1rev. Thành phần của một phản ứng BOX-PCR gồm 2,5 µL dNTPs (10 mM); 0,85 µL môi BOX-A1rev (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (0,1 mM); 1,25 U Taq DNA polymerase; 5 µL 10X đệm PCR; 0,8 µL BSA (1% w/v); 5 µL dimethyl sulfoxide (100%); 2 µL hỗn hợp chứa DNA; nước cất khử ion được thêm vào để đạt tổng thể tích 50 µL. Chu trình nhiệt của phản ứng BOX-PCR gồm 95°C (2 phút) (1 chu kỳ); 94°C (3 giây), 92°C (30 giây), 50°C (1 phút), 65°C (8 phút) (35 chu kỳ); 65°C 8 phút (1 chu kỳ); giữ ở 4°C (Nguyen et al., 2019). Agarose (1,5%, w/v) pha trong dung dịch đệm TAE (1X) được sử dụng để điện di kiểm tra sản phẩm BOX-PCR ở dòng điện 60 V trong 120 phút. Kết quả điện di được ghi nhận bằng hệ thống chụp gel Analytik Jena (Đức).

2.7. Định danh vi khuẩn phân giải lipid

Kỹ thuật sinh học phân tử: Vi khuẩn có khả năng phân giải hiệu quả lipid và có hoạt tính lipase cao được giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA để định danh vi khuẩn. Cặp môi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Frank et al., 2008) được sử dụng để khuếch đại đoạn gen 16S-rRNA. Thành phần của một phản ứng PCR (25 µL) gồm 1,25 µL dNTPs (10 mM); 0,625 µL U Taq DNA polymerase; 2,5 µL 10X đệm PCR; 0,4 µL BSA (1% w/v); 2,5 µL dimethyl sulfoxide (100%); 0,5 µL hai loại môi; 3 µL DNA; 16,475 µL nước khử ion. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR gồm 95°C (6 phút); 40 chu kỳ nhân số lượng DNA với nhiệt độ và thời gian tương ứng là 95°C (30 giây), 55°C (30 giây), 72°C (30 giây); và 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 1,5% (w/v) (150 V, 30 phút) và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger tại công ty Eurofin (Đức). Trình tự gen 16S-rRNA của vi khuẩn được so sánh với trình tự gen tương ứng trong ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BlastN để định danh vi khuẩn.

Nhằm định danh đến bậc phân loại loài, một số đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn đã giải trình tự cũng được phân tích, gồm khả năng đồng hóa citrate, hoạt

tính urease, oxidase, catalase, lipase (Dũng và ctv., 1972), khả năng lên men các nguồn carbon như glycerol, glucose, galactose, D-fructose, lactose, D-xylose, và maltose (Chandra & Mani, 2011).

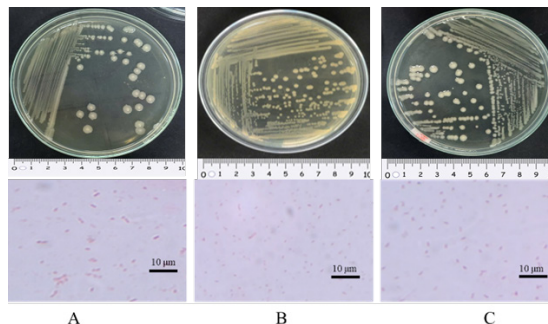
2.8. Xử lý số liệu

Phần mềm Microsoft Excel 2016 được sử dụng để nhập và xử lý số liệu thô, tính các trung bình và vẽ biểu đồ. Phần mềm Minitab 18 được dùng để phân tích ANOVA và kiểm định trung bình các nghiệm thức bằng kiểm định Tukey's.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải lipid

Từ 4 mẫu nước thải chế biến thủy sản, 19 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải lipid đã được phân lập. Trong đó, 9 dòng phân lập được từ nước thải tôm (7 dòng phân lập từ bề nước thải đầu vào và 2 dòng được phân lập từ nước thải của bể hiếu khí) và 10 dòng vi khuẩn được phân lập từ nước thải chế biến cá da trơn (7 dòng từ bề nước thải đầu vào và 3 dòng từ nước thải thu ở bể hiếu khí). Các dòng vi khuẩn được xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào ở thời điểm 3 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA (Bảng 1). Khuẩn lạc và tế bào của ba dòng vi khuẩn đại diện được minh họa ở Hình 1.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của ba dòng vi khuẩn đại diện

Ghi chú: A: dòng LF2; B: dòng LS4 ; C: dòng LF9

Về hình thái, 17/19 dòng có khuẩn lạc tròn, 2/19 dòng có khuẩn lạc không đều. Phần lớn khuẩn lạc có màu trắng ngà (11/19 dòng), trắng đục (5/19 dòng) hoặc màu vàng (3/19 dòng). Hầu hết các dòng vi khuẩn có bề mặt khuẩn lạc trơn (13/19 dòng), 6/19 dòng có bề mặt nhẵn. Khuẩn lạc có bìa nguyên chiếm số lượng nhiều nhất với 12/19 dòng, bìa răng cưa gồm 7/19 dòng. Về độ nổi, đa phần các dòng có khuẩn lạc lồi (11/19) và 8/19 dòng có khuẩn lạc mô. Tế bào vi khuẩn có hình cầu (4 dòng) hoặc hình que (15 dòng). Kết quả nhuộm Gram cho thấy có 12

dòng vi khuẩn Gram âm và 7 dòng vi khuẩn Gram dương.

Nhiều dòng vi khuẩn có khả năng phân giải lipid trên cùng địa bàn cũng đã được công bố. Theo Phong et al. (2021), 11 dòng vi khuẩn được phân lập

từ nước thải chế biến thực phẩm ở Cần Thơ có khả năng phân giải dầu ăn trong nước thải. Từ ba mẫu nước thải sinh hoạt tại quận Ninh Kiều (Cần Thơ), Men et al. (2023) đã phân lập được 9 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải lipid, trong đó 3 dòng vi khuẩn Gram dương và 6 dòng vi khuẩn Gram âm.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải lipid

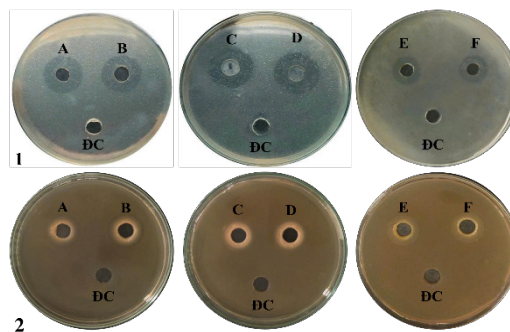
TT	Nguồn gốc	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc					Đặc điểm tế bào			
			Hình dạng	Màu sắc	Bề mặt	Bia	Độ nổi	Kích thước (mm)	Hình dạng	Kích thước (µm)	Gram
1	Bể hiếu khí	LS1	không đều	trắng đục	nhăn	răng cưa	lài	3	que	1x7	+
2		LS2	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	mô	3	que	1x3	-
3		LS3	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	mô	3	cầu	2	-
4	Nước thải chế biến tôm	LS4	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	mô	6	que	1x1,5	-
5		LS5	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	lài	3	que	1x2	+
6		LS6	tròn	trắng ngà	nhăn	nguyên	lài	5	que	1x1	-
7	Bể dầu vào	LS7	không đều	trắng ngà	trơn	răng cưa	mô	6	que	1x2	-
8		LS8	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	mô	5	que	1x2	+
9		LS9	tròn	vàng	trơn	nguyên	mô	2	que	1x1	-
10	Bể hiếu khí	LF1	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	lài	2,5	que	1x2	-
11		LF2	tròn	trắng ngà	nhăn	răng cưa	lài	6	que	1x1	-
12		LF3	tròn	trắng đục	nhăn	răng cưa	lài	6,5	que	1x4	+
13	Nước thải chế biến cá da trơn	LF4	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	mô	2	que	1x1,5	-
14		LF5	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	lài	6	que	1x1,5	-
15		LF6	tròn	vàng	trơn	nguyên	lài	2,5	que	1x2	-
16	Bể dầu vào	LF7	tròn	trắng đục	nhăn	răng cưa	lài	12	cầu	2	+
17		LF8	tròn	trắng đục	nhăn	răng cưa	lài	3	cầu	2	+
18		LF9	tròn	trắng đục	trơn	nguyên	mô	6	que	1x2	-
19		LF10	tròn	vàng	trơn	nguyên	lài	3	cầu	2	+

3.2. Khả năng phân giải lipid trên đĩa thạch của vi khuẩn

Kết quả khảo sát cho thấy hầu hết các dòng vi khuẩn đều có khả năng làm đục môi trường thạch Tween 80 và tạo vòng sáng trên môi trường tributyrin agar (TBA) sau 24 giờ nuôi cấy (Bảng 2).

Trên môi trường tributyrin agar, bốn dòng vi khuẩn LF2, LF4, LS3 và LS4 có khả năng phân giải lipid cao nhất trong các dòng vi khuẩn phân lập. Dòng LS4 tạo vòng phân giải lớn nhất với đường kính 17,33 mm, tiếp đến là LS3 (16,33 mm), LF2 (13,67 mm) và LF4 (13 mm), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại. Trên môi trường thạch Tween 80, 15/19 dòng vi khuẩn có khả năng làm đục môi trường sau 24 giờ nuôi cấy. Trong đó, bốn dòng vi khuẩn gồm LF2, LF4, LS3 và LS4 thể hiện hoạt tính phân giải mạnh nhất, với đường kính vòng phân giải lần lượt là 11,33; 11,33; 13,33

và 15,67 mm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại.



Hình 2. Khả năng phân giải lipid tạo thành vòng sáng quanh các giếng có chủng huyền phù vi khuẩn trên môi trường tributyrin (1) và Tween 80 (2)

A: dòng LF2, B: dòng LF4, C: dòng LS3, D: dòng LS4, E: dòng LS6, F: dòng LF7, ĐC: đối chứng

Các nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh mối liên hệ giữa đường kính vòng phân giải và hiệu quả phân giải lipid của vi khuẩn. Bestari and Suharjono (2015) đã phân lập và tuyển chọn được các dòng vi khuẩn từ nước thải chế biến cá có khả năng phân giải lipid. Vi khuẩn tạo vòng phân giải có đường kính 4 mm trên môi trường thạch có bổ sung dầu olive và có hoạt tính lipase cao. Trong một nghiên cứu khác, Akhtar et al. (2016) đã phân lập vi khuẩn từ môi trường giàu lipid tại Dhaka (Bangladesh) và khảo sát khả năng sinh lipase trên môi trường TBA để đánh giá hiệu quả phân giải

lipid, một số dòng vi khuẩn tạo vòng phân giải có đường kính 4,08 mm được ghi nhận. Pallavi et al. (2016) đã phân lập các dòng vi khuẩn từ đất nhiễm dầu và chỉ tuyển chọn những dòng tạo đường kính vòng phân giải lớn hơn 1 mm trên môi trường TBA để kiểm tra hoạt tính enzyme, kết quả cũng cho thấy vi khuẩn tạo vòng lớn nhất cũng có hoạt tính lipase cao nhất. Trong nghiên cứu này, 15/19 dòng vi khuẩn phân lập có khả năng làm đục môi trường Tween 80 đều tạo vòng sáng trên môi trường tributyrin agar. Chính vì vậy, 15 dòng vi khuẩn này được tiếp tục sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Đường kính vòng phân giải khi vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường tributyrin và Tween 80

TT	Dòng	Đường kính vòng phân giải (mm)	
		Tributyrin	Tween 80
1	Đối chứng	0±0 ⁱ	0±0 ⁱ
2	LF1	0,67±0,57 ^{gh}	0±0 ⁱ
3	LF2	13,67±0,57 ^b	11,33±0,57 ^c
4	LF3	7,33±0,57 ^c	6,50±0,50 ^d
5	LF4	13,00±1,0 ^b	11,33±0,57 ^c
6	LF5	3,00±1,0 ^{ef}	1,17±0,29 ^{gh}
7	LF6	5,33±0,57 ^{cd}	3,33±0,57 ^{ef}
8	LF7	3,00±1,0 ^{ef}	1,33±0,57 ^{gh}
9	LF8	0,33±0,57 ^h	0±0 ⁱ
10	LF9	0,67±0,57 ^{gh}	0±0 ⁱ
11	LF10	1,00±1,0 ^{fgh}	0±0 ⁱ
12	LS1	3,33±0,57 ^{de}	2,67±1,15 ^{fg}
13	LS2	3,33±0,57 ^{de}	1,17±0,29 ^{gh}
14	LS3	16,33±0,57 ^a	13,33±1,15 ^b
15	LS4	17,33±0,57 ^a	15,67±0,57 ^a
16	LS5	5,33±0,57 ^{cd}	3,67±0,57 ^{ef}
17	LS6	2,33±0,57 ^{efg}	0,33±0,57 ^h
18	LS7	4,33±0,57 ^{de}	3,33±0,57 ^{ef}
19	LS8	5,33±0,57 ^{cd}	5,00±0,00 ^{de}
20	LS9	3,33±0,57 ^{de}	2,33±0,57 ^{fg}

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số liệu đính kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.3. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy và pH đến khả năng tổng hợp lipase của vi khuẩn

3.3.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tổng hợp lipase

Kết quả thí nghiệm cho thấy mật độ quang và mật số vi khuẩn (MSVK) được xác định ở ba thời điểm nuôi cấy gồm 24, 48 và 72 giờ có sự khác nhau (Bảng 3).

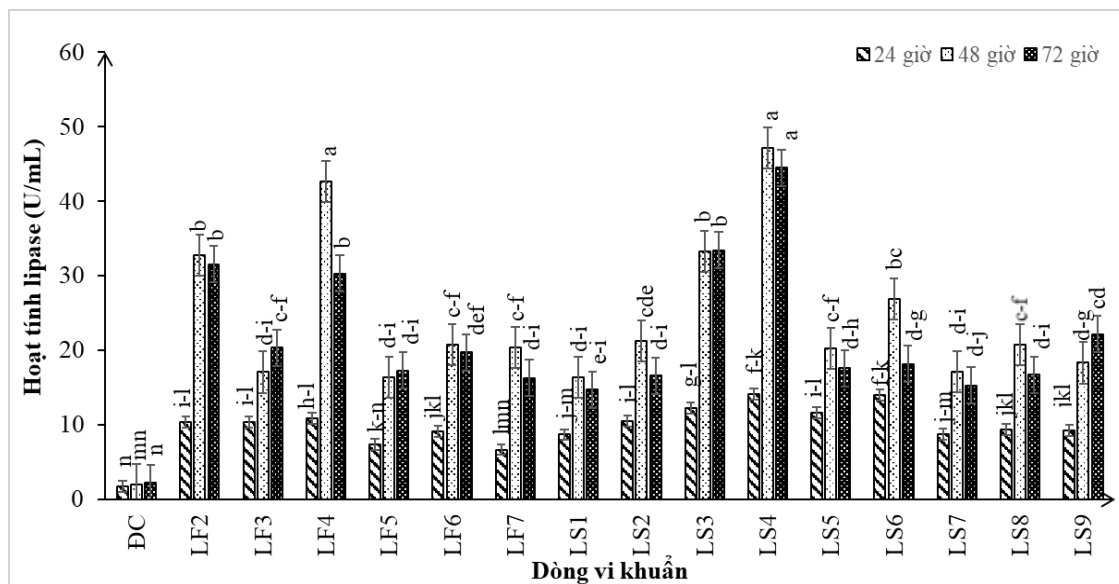
Sau 24 giờ nuôi cấy, dòng LS4 phát triển mạnh nhất với OD_{600nm} đạt 0,101 và mật số 63,56 × 10⁸ CFU/mL, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng và phần lớn các dòng vi khuẩn còn lại. Các

dòng LF2, LF3 và LS9 cũng đạt mật số cao lần lượt là 44 × 10⁸, 45 × 10⁸ và 40 × 10⁸ CFU/mL. Tại thời điểm 48 giờ, các dòng vi khuẩn LF2, LF4, LS3 và LS4 có giá trị OD_{600nm} và mật số gia tăng nhanh, phản ánh giai đoạn tăng trưởng mạnh, trong đó, dòng vi khuẩn LS4 có mật độ quang đạt 0,245 và MSVK cao nhất, đạt 61111 × 10⁸ CFU/mL. Tại thời điểm 72 giờ, mật số của tất cả các dòng vi khuẩn đều giảm so với 48 giờ chứng tỏ vi khuẩn đang ở giai đoạn suy thoái. Như vậy, ở thời điểm 48 giờ nuôi cấy, các dòng vi khuẩn đạt mật số tối đa, trong đó dòng vi khuẩn LS4 có mật số cao nhất trong các thời điểm khảo sát, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại (Bảng 3).

Bảng 3. Mật độ quang và MSVK khi vi khuẩn được nuôi cấy ở các thời điểm khác nhau trong môi trường MM có bổ sung 1% dầu hướng dương

TT	Dòng	Mật độ quang (OD _{600nm})			Mật số vi khuẩn (x10 ⁸ CFU/mL)		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
1	ĐC	0,054±0,006 ^h	0,06±0,003 ^g	0,062±0,003 ⁱ	0±0 ^h	0±0 ^c	0±0 ^g
2	LF2	0,089±0,007 ^{abc}	0,211±0,012 ^{bc}	0,223±0,002 ^c	44±3 ^b	14556±509 ^{bcd}	1500±88 ^b
3	LF3	0,092±0,006 ^{ab}	0,114±0,111 ^e	0,128±0,002 ^e	45±2 ^b	9556±1072 ^{cde}	1144±154 ^c
4	LF4	0,075±0,003 ^{cdef}	0,218±0,002 ^{bc}	0,227±0,002 ^{bc}	34±0,5 ^{cd}	15667±333 ^{bc}	1578±246 ^b
5	LF5	0,062±0,009 ^{efgh}	0,107±0,006 ^c	0,113±0,002 ^{ef}	1,2±0,34 ^h	3±1,34 ^e	1,05±0,18 ^g
6	LF6	0,070±0,009 ^{ef}	0,376±0,034 ^a	0,392±0,006 ^a	24±3,75 ^e	22667±1453 ^b	944±107 ^{cd}
7	LF7	0,055±0,005 ^{gh}	0,070±0,004 ^{fg}	0,072±0,006 ^{hi}	0,05±0,01 ^h	2±1,5 ^e	0,05±0,02 ^g
8	LS1	0,094±0,002 ^{ab}	0,103±0,002 ^{ef}	0,113±0,003 ^{ef}	38±4,4 ^{bcd}	110±15,28 ^e	33±8,82 ^g
9	LS2	0,063±0,001 ^{efgh}	0,087±0,007 ^{efg}	0,087±0,007 ^{gh}	4,78±1,34 ^{gh}	944±241 ^e	0,43±0,03 ^g
10	LS3	0,069±0,004 ^{efg}	0,206±0,003 ^c	0,215±0,004 ^c	11±0,69 ^{fg}	22000±4978 ^{bc}	856±107 ^{de}
11	LS4	0,101±0,002 ^a	0,245±0,018 ^b	0,249±0,009 ^b	63±4,86 ^a	61111±15753 ^a	3400±33,3 ^a
12	LS5	0,061±0,003 ^{efgh}	0,095±0,016 ^{ef}	0,098±0,001 ^{fg}	0,10±0,02 ^h	233±0 ^e	0,38±0,07 ^g
13	LS6	0,085±0,005 ^{bcd}	0,209±0,016 ^c	0,222±0,005 ^c	33±0,69 ^d	589±259 ^e	315±25 ^f
14	LS7	0,062±0,004 ^{efgh}	0,099±0,001 ^{ef}	0,119±0,027 ^{ef}	1,26±0,33 ^h	2,44±0,19 ^e	0,53±0,05 ^g
15	LS8	0,072±0,002 ^{def}	0,155±0,002 ^d	0,166±0,002 ^d	12±0,5 ^f	2911±50,9 ^{de}	353±51 ^f
16	LS9	0,076±0 ^{cde}	0,081±0,002 ^{efg}	0,086±0,001 ^{ghi}	40±1,5 ^{bc}	1756±134,7 ^e	633±0 ^e

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số liệu đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. ĐC: đối chứng



Hình 3. Hoạt tính lipase của vi khuẩn ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau

Ghi chú: Các cột đi kèm các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. ĐC: đối chứng

Kết quả khảo sát cho thấy các dòng vi khuẩn khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung 1% dầu hướng dương ở thời điểm 24, 48 và 72 giờ cũng có hoạt tính lipase khác nhau (Hình 3). Lipase được tạo ra ở thời điểm 24 giờ khá thấp so với 48 và 72 giờ ở tất cả các dòng vi khuẩn. Dòng LS4 tổng hợp lipase cao nhất, đạt 47,19 và 44,49 U/mL ở thời điểm 48 và 72 giờ nuôi cấy, khác biệt có ý nghĩa

thống kê so với thời điểm 24 giờ (14,11 U/mL). Dòng LS3 cũng tổng hợp lipase cao, với hàm lượng lipase tạo ra ở 48 và 72 giờ lần lượt là 33,24 và 33,43 U/mL. Hai dòng LF2 và LF4 có hoạt tính lipase cao hơn so với các dòng vi khuẩn còn lại ở thời điểm 48 và 72 giờ nuôi cấy. Như vậy, 4 dòng vi khuẩn LF2, LF4, LS3 và LS4 đều có hoạt tính lipase cao ở thời điểm 48 và 72 giờ, trong đó 3 dòng khác biệt không

có ý nghĩa thống kê giữa hai thời điểm này, ngoại trừ dòng vi khuẩn LF4, hoạt tính lipase giảm ở 72 giờ, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 48 giờ. Như vậy, ở thời điểm 48 giờ nuôi cấy, vi khuẩn có mật số và hoạt tính lipase cao nên được áp dụng để nuôi cấy vi khuẩn trong các thí nghiệm tiếp theo.

Sulaiman et al. (2020) đã phân lập vi khuẩn *Bacillus cereus* HSS từ đất nhiễm dầu tại Indonesia với hoạt tính lipase 13,8 U/mL sau 72 giờ nuôi cấy trong môi trường có bổ sung dầu ô liu. Dòng *Pseudomonas aeruginosa* PseA-6 do Priyanka et al. (2021) phân lập từ nước thải nhà máy chế biến thực phẩm có thể tổng hợp 10,5 U/mL lipase sau 48 giờ nuôi cấy. Ikhwani et al. (2024) chứng minh vi khuẩn *Bacillus flexus* InaCC-B486 có khả năng tổng hợp lipase với hoạt tính 11,98 U/mL sau 96 giờ nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, bốn dòng vi khuẩn LF2, LF4, LS3 và LS4 được phân lập từ nước thải chế biến tôm và cá da trơn có khả năng tổng hợp lipase hiệu quả

với hàm lượng trên 32 U/mL ở thời điểm 48 giờ nuôi cấy.

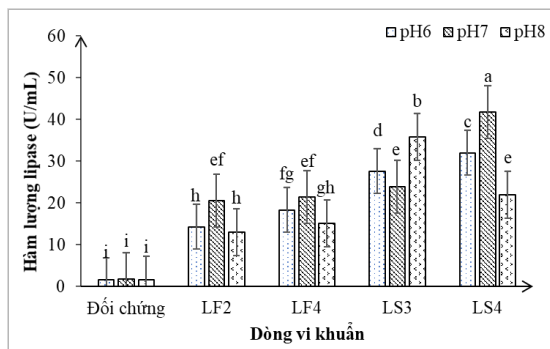
3.3.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tổng hợp lipase

Kết quả khảo sát cho thấy pH môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của các dòng vi khuẩn phân lập (Bảng 4). Ở pH trung tính (pH 7), ba dòng vi khuẩn LF2, LF4 và LS4 có mật độ quang (OD_{600nm}) và mật số cao hơn so với khi được nuôi cấy trong môi trường có các độ pH khảo sát còn lại, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tương tự, dòng LS4 cũng có khả năng sinh trưởng nhanh với mật độ quang đạt 0,39 và MSVK đạt 5444,4 × 10⁸ CFU/mL, cao nhất so với ba dòng vi khuẩn còn lại. Dòng vi khuẩn LF2 và LS3 có MSVK cao nhất khi được nuôi cấy trong môi trường có pH 8. Như vậy, trong bốn dòng vi khuẩn khảo sát, hai dòng LF2 và LS3 có mật số cao nhất khi được nuôi cấy trong môi trường có pH 8, hai dòng LF4 và LS4 thích hợp với môi trường nuôi cấy có pH 7.

Bảng 4. Mật độ quang và mật số vi khuẩn ở thời điểm 48 giờ nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung 1% dầu hướng dương

TT	Dòng	Mật độ quang (OD _{600nm})			Mật số vi khuẩn (x10 ⁸ CFU/mL)		
		pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8
1	Đối chứng	0,07±0,006 ^c	0,07±0,006 ^c	0,07±0,006 ^d	0±0 ^c	0±0 ^c	0±0 ^c
2	LF2	0,21±0,007 ^d	0,27±0,022 ^b	0,19±0,011 ^c	1822±283 ^b	2500±353 ^b	2567±186 ^b
3	LF4	0,25±0,002 ^c	0,50±0,010 ^a	0,22±0,009 ^c	2556±517 ^b	3133±88 ^b	2244±102 ^b
4	LS3	0,35±0,017 ^b	0,31±0,007 ^b	0,43±0,001 ^a	4067±333 ^a	3800±133 ^b	5167±416 ^a
5	LS4	0,39±0,015 ^a	0,39±0,015 ^a	0,29±0,020 ^b	4200±296 ^a	5444±168 ^a	2800±58 ^b

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số liệu đính kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%



Hình 4. Hoạt tính lipase khi nuôi cấy vi khuẩn 48 giờ trong môi trường có pH khác nhau

Ghi chú: Các cột có các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Kết quả khảo sát cho thấy có khác biệt về hoạt tính lipase ở bốn dòng vi khuẩn khi được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường MM có bổ sung 1% dầu hướng dương với các điều kiện pH khác nhau (Hình 4). Môi trường nuôi cấy với pH 7 là điều kiện phù

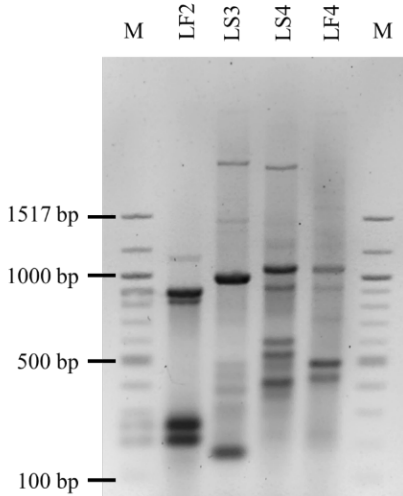
hợp cho hoạt tính lipase ở ba dòng vi khuẩn LF2, LF4 và LS4, trong đó, dòng LS4 có hoạt tính cao nhất (41,69 U/mL). Dòng LS3 có hoạt tính lipase cao nhất trong môi trường nuôi cấy với pH 8 (36,67 U/mL), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các môi trường có độ pH còn lại.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh ảnh hưởng của pH đến hoạt tính lipase và khả năng phân hủy lipid của vi khuẩn. Sugimogi et al. (2012) đã phân lập hai dòng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* SS-219 và *Acinetobacter* sp. SS-192 từ đất có khả năng phân hủy 89,5% và 77,5% hỗn hợp dầu mỡ ở pH 9 trong 24 giờ. Theo Sutar et al. (2025), dòng vi khuẩn *Staphylococcus petrasii* subsp. *jettensis* VSJK R1 được phân lập từ nước thải nhà hàng có khả năng phân giải hiệu quả nhiều loại dầu mỡ trong điều kiện pH trung tính ở nhiệt độ từ 22°C đến 45°C. Trong nghiên cứu này, ba dòng vi khuẩn LF2, LF4 và LS4 có hoạt tính lipase cao khi được nuôi cấy trong môi trường có pH 7 và dòng LS3 phù hợp với môi trường

có pH 8. Đây là các điều kiện phù hợp cho sự tổng hợp lipase của vi khuẩn.

3.4. BOX-PCR

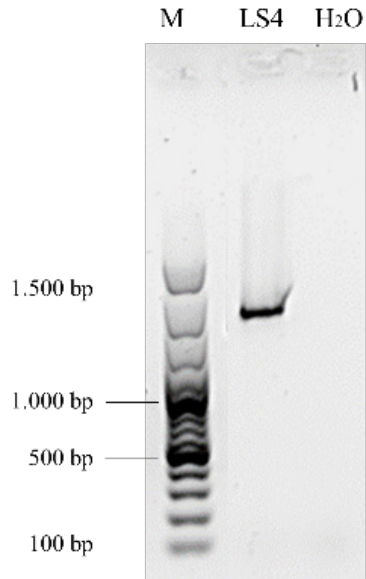
Kỹ thuật BOX-PCR được thực hiện để đánh giá sự khác biệt về mặt di truyền của bốn dòng vi khuẩn LF2, LF4, LS3 và LS4. Kết quả điện di sản phẩm BOX-PCR cho thấy các dòng vi khuẩn có các băng DNA ở các vị trí khác nhau trên phổ điện di chứng tỏ các dòng vi khuẩn này khác nhau về mặt di truyền (Hình 5).



Hình 5. Phổ điện di sản phẩm BOX-PCR của các dòng vi khuẩn khảo sát

3.5. Định danh vi khuẩn

Trong bốn dòng vi khuẩn khảo sát, dòng LS4 có khả năng sinh trưởng và hoạt tính lipase cao nhất nên dòng này được tuyển chọn để định danh đến bậc phân loại loài dựa vào phân tích trình tự gen 16S-rRNA và các đặc điểm sinh hóa. Kết quả điện di sản phẩm PCR trong gel agarose 1,5% cho thấy kích thước của sản phẩm PCR đạt khoảng 1.450 bp là phù hợp với kích thước đoạn gen cần khảo sát (Hình 6). Khi so sánh trình tự gen 16S-rRNA của vi khuẩn LS4 với trình tự gen tương ứng của các dòng vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu cho thấy gen 16S-rRNA của LS4 tương đồng 100% với gen tương ứng của năm loài vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas*, gồm *A. hydrophila*, *A. aquatica*, *A. veronii*, *A. sobria* và *A. encheleia*.



Hình 6. Phổ điện di sản phẩm PCR của gen 16S-rRNA ở vi khuẩn LS4

Dòng vi khuẩn LS4 được kiểm tra các đặc điểm sinh hóa và so sánh với năm loài có độ tương đồng cao nhất. Kết quả khảo sát cho thấy dòng vi khuẩn LS4 có những đặc điểm sinh hóa tương đồng với loài *Aeromonas hydrophila* bao gồm có hoạt tính oxidase, catalase, lipase nhưng không có hoạt tính urease; có khả năng lên men glycerol, glucose, galactose, D-fructose, D-xylose, maltose nhưng không lên men lactose; và đồng hóa citrate (Bảng 5). Chính vì vậy, dòng vi khuẩn LS4 thuộc loài *Aeromonas hydrophila* và được định danh là *Aeromonas hydrophila* LS4.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* có khả năng tổng hợp lipase hiệu quả. Vi khuẩn *Aeromonas* sp. EBB-1 được phân lập từ bùn gần chợ cá ở Angsila, Thái Lan có khả năng tổng hợp lipase ngoại bào chịu nhiệt. Hoạt tính lipase cao nhất được xác định ở pH 8,0 và 25°C sau 15 giờ nuôi cấy. Enzyme này có hoạt tính ổn định trong khoảng pH từ 6,0 đến 8,0 và ở nhiệt độ từ 30 đến 80°C. Lipase sau khi tinh sạch có khối lượng phân tử tương đối là 45 kDa (Charoenpanich et al., 2011). Haselroth et al. (2021) đã phân lập vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* MF079290.1 từ nước thải lò mổ bò có khả năng tổng hợp lipase với hàm lượng 1,40 µmol/L và loại bỏ được 59% dầu ở điều kiện pH 7,0 và 30°C. Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* LS4 được phân lập từ nước thải chế biến tôm tại thành phố Cần Thơ có khả năng tổng hợp lipase hiệu quả với hoạt tính đạt 41,69 U/mL sau 48 giờ nuôi cấy ở pH 7,0 khi được bổ sung

1% dầu hướng dương. Dòng vi khuẩn này được tiếp tục nghiên cứu để tìm điều kiện tối ưu cho sự tổng hợp lipase hiệu quả nhất nhằm ứng dụng enzyme này trong xử lý lipid trong nước thải. Vi khuẩn thuộc loài *Aeromonas hydrophila* cũng được chứng minh là vi khuẩn gây bệnh thủy sản, tuy nhiên, khả năng gây bệnh tùy thuộc vào đặc điểm di truyền của mỗi dòng vi khuẩn và điều kiện môi trường, không phải tất cả dòng vi khuẩn thuộc loài *Aeromonas*

hydrophila đều là vi khuẩn gây bệnh. Thực tế, lipase từ vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* đã được ly trích để ứng dụng trong xử lý dầu và mỡ (Haselroth et al., 2021). Do đó, cần có những nghiên cứu tiếp theo về khả năng gây bệnh hay không của dòng vi khuẩn LS4 để có biện pháp bảo quản và xử lý phù hợp khi nghiên cứu vi khuẩn này trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Bảng 5. Đặc điểm sinh hóa của LS4 và các loài vi khuẩn có độ tương đồng gen 16S-rRNA cao

TT	Loài tương đồng	Đặc điểm sinh hóa											
		Urease	Oxidase	Glycerol	Glucose	Catalase	Galactose	Fructose	D-Xylose	Lactose	Citrate	Lipase	Maltose
	LS4	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
1	<i>Aeromonas hydrophila</i> ⁽¹⁾	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2	<i>A. aquatica</i> ⁽²⁾	-	+	+	+	+	+	+	-	+	±	±	+
3	<i>A. veronii</i> ⁽³⁾	-	+	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+
4	<i>A. sobria</i> ⁽⁴⁾	-	+	+	+	+	±	+	-	+	+	+	+
5	<i>A. encheleia</i> ⁽⁵⁾	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính; (±): khác nhau tùy dòng

(1): Samal et al., (2014), Mishra and Prasad (2013), (2): Austin and Austin (2016) (3): Majumdar et al. (2011), (4): Sharma and Kumar (2011), (5): Esteve et al. (2003)

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu nước thải chế biến tôm và cá da trơn đã phân lập được 19 dòng vi khuẩn, có 15 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải lipid, trong đó, bốn dòng vi khuẩn LF2, LF4, LS3 và LS4 có khả năng tạo vòng phân giải lớn trên môi trường có bổ sung tributyrin và Tween 80. Môi trường có pH trung tính và thời gian nuôi cấy 48 giờ là điều kiện tốt cho sự sinh trưởng và tổng hợp lipase của các dòng vi

khuẩn thử nghiệm. Dòng LS4 thể hiện khả năng tổng hợp lipase cao nhất, đạt 47,19 U/mL sau 48 giờ nuôi cấy. Phân tích trình tự gen 16S-rRNA và khảo sát các đặc điểm sinh hóa cho thấy dòng vi khuẩn LS4 thuộc loài *Aeromonas hydrophila* nên được định danh là *Aeromonas hydrophila* LS4. Đây là dòng vi khuẩn bản địa phân giải lipid hiệu quả trong điều kiện phòng thí nghiệm nên làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về ly trích enzyme lipase từ vi khuẩn này để thử nghiệm xử lý lipid trong nước thải.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akhtar, F., Moniruzzaman, M., & Saha, M. L. (2016). Screening of lipase-producing bacteria from lipid-rich environments in Dhaka metropolitan area on tributyrin agar. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 6(2), 135–142.

Ảnh, K. H. (2006). *Giáo trình vi sinh vật học*, phần 1. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

Austin, B., & Austin, D. A. (2016). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish* (6th ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>

Bestari, N. C., & Suharjo. (2015). Activity assay and identification of lipolytic bacteria from fish processing wastewater at district Muncar, Banyuwangi, Indonesia. *International Journal of ChemTech Research*, 8(11), 377-383.

Bhatia, S., & Sharma, A. (2012). Microbial lipases and their industrial applications: A review. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 3(7), 92-102.

Carrasco-Palafox, J., Rivera-Chavira, B. E., Ramírez-Baca, N., Manzaneres-Papayanopoulos, L. I., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). Improved method for qualitative screening of lipolytic bacterial strains. *MethodsX*, 5, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.004>

Chandra, P., & Mani, P. (2011). Biochemical characterization and identification of lipase producing bacteria from oil contaminated industrial soil. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(3), B455-B460.

Charoenpanich, J., Suktanarag, S., & Toobbucha, N. (2011). Production of a thermostable lipase by

- Aeromonas* sp. EBB-1 isolated from marine sludge in Angsila, Thailand. *Science Asia*, 37(2), 105-114.
<https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2011.37.105>
- Chính, N. T. (2021). Nghiên cứu về chế biến và tiêu thụ sản phẩm thủy sản ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thủy sản*, 18(2), 45-52.
- Čipinytė, V., Grigiškis, S., & Baškys, E. (2009). Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. *Biologija*, 55(3-4).
<https://doi.org/10.2478/v10054-009-0014-3>
- Dash, C., & Payyappilli, R. J. (2016). KOH string and Vancomycin susceptibility test as an alternative method to Gram staining. *Journal of International Medicine and Dentistry*, 3(2), 88-90.
<https://doi.org/10.18320/JIMD/201603.0288>
- Dũng, N. L., Chiến, N. Đ., Ty, P. V. (1972). *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam
- Esteve, C., Alcaide, E., & Blasco, M. D. (2003). *Aeromonas jandaei* sp. nov.: Biochemical, phylogenetic, and virulence characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 43-51.
- Fitzgerald, J. A., Haslett, D., & Johnston, C. (2020). Environmental impacts of lipid contamination in aquatic systems. *Environmental Science Journal*, 45(3), 215-229.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). *The state of world fisheries and aquaculture 2022: Towards blue transformation*. Rome: FAO.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- Gitlesen, T., Bauer, M., & Adlercreutz, P. (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1345(2), 188-196.
[https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(96\)00176-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(96)00176-2)
- Haselroth, K. J., Wilke, P., Dalla Costa, I. M., Rotta, V. M. L., Rosado, A. F., & Hermes, E. (2021). Effectiveness of *Aeromonas hydrophila* for the removal of oil and grease from cattle slaughterhouse effluent. *Journal of Cleaner Production*, 287, 125533.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125533>
- Hoben, H. J., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1246-1247.
<https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982>
- Horecka, T., & Chu, V. T. (2017). A simple method for bacterial DNA extraction for PCR applications. *BioTechniques*, 62(5), 229-232.
- Ikhwan, A. Z. N., Idris, I., Elfirta, R. R., & Ferdian, P. R. (2024). Production and activity characterization of lipase from *Bacillus flexus* inacc-b486. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 11(2), 397-404.
<https://doi.org/10.18596/jotcsa.1333916>
- Jain, D., Mishra, S. K., & Singh, A. (2012). Production and partial characterization of lipase from *Bacillus subtilis* strain DVL2. *Advances in Biological Research*, 6(5), 203-207.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35-73.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2003). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* (7th ed.). Elsevier.
- Liang, Y., Cui, Y., Trushenski, J., & Blackburn, J. W. (2018). Lipase-producing *Pseudomonas* sp. isolated from wastewater and its potential application in bioremediation. *Bioresource Technology*, 256, 120-126.
- Liu, Y., Zhang, C., Wang, X., & Chen, L. (2018). Impact of lipid accumulation on membrane fouling and wastewater treatment efficiency. *Journal of Water Process Engineering*, 22, 100-107.
- Majumdar, R. K., Ghosh, S., & Das, S. (2011). Biochemical and molecular characterization of *Aeromonas veronii* from freshwater fish. *Journal of Environmental Biology*, 32(1), 65-69.
- Men, T. T., Son, N. H., Suong, N. T. D., Tuan, H. T., Thao, T. T. P., Tai, V. P. (2023). Isolation and selection of bacterial strains capable of degrading lipid. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(3), 183-188.
- Mishra, A., & Prasad, G. S. (2013). Production, optimization and partial purification of lipase from *Aeromonas hydrophila* isolated from tannery effluent. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(9), 20-25.
- Muira T., & Yamane, T. (1997). Screening for fungi that have lipolytic and acidolytic activities in biomass support particles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 611, 1252-1257.
<https://doi.org/10.1271/bbb.61.1252>

- Nguyen, T. P. O., Helbling, D. E., Bers, K., Fida, T. T., Wattiez, R., Kohler, H. P. E., Springael, D., & De Mot, R. (2014). Genetic and metabolic analysis of the carbofuran catabolic pathway in *Novosphingobium* sp. KN65. 2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8235-8252. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5858-5>
- Nguyen, T. P. O., Hansen, M. A., Hansen, L. H., Horemans, B., Sørensen, S.J., De Mot, R., & Springael, D. (2019). Intra- and inter-field diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmids and their *tfd* catabolic genes in rice fields of the Mekong delta in Vietnam. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(1), fiy214 <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy214>
- Nhi, P. T., Nguyen, T. H., & Tran, Q. K. (2020). Isolation and characterization of *Rhodopseudomonas* sp. with lipase activity from aquaculture wastewater. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 58(4), 401-410. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/58/3A/14322>
- Pallavi, P., Reddy, Z., & Ward, O. (2016). Isolation and optimization of lipase-producing *Bacillus subtilis* Y-IVI from oil-contaminated soil: Screening on tributyrin agar and assay of enzyme activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(12), 194-200.
- Phong, N. T., Vinh, B. T., Diep, C. N. (2021). Study on isolation and characterization of lipid-degrading bacteria in wastewater of food processing plants and restaurants in Can Tho city, Vietnam. *Current Approaches in Science and Technology Research*, 12, 69-81. <https://doi.org/10.9734/bpi/castr/v12/3355F>
- Pinsirodom, P., & Parkin, K. L. (2001). Lipase activity and protein profiles of *Pseudomonas fluorescens* strains from milk. *Journal of Food Science*, 66(4), 554-559.
- Priyanka, P., Sharma, A., & Pathania, A. (2021). Optimization of lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* PseA-6 isolated from food processing wastewater. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(2), 46-53.
- Samal, S. K., Dash, M., & Sahoo, P. K. (2014). Biochemical and antibiotic resistance characterization of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fish. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(12), 259-267.
- Sharma, A., & Kumar, S. (2011). Biochemical and molecular characterization of *Aeromonas sobria* isolated from fish. *Asian Journal of Animal Sciences*, 5(6), 385-392.
- Sugimori, D., & Utsue, T. (2012). A study of the efficiency of edible oils degraded in alkaline conditions by *Pseudomonas aeruginosa* SS-219 and *Acinetobacter* sp. SS-192 bacteria isolated from Japanese soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(3), 841-848. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0880-6>
- Sulaiman, J., Ismail, N., Mustapha, W. A. W., & Rahim, R. A. (2020). Production of cold-active lipase by free and immobilized marine *Bacillus cereus* HSS. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2377.
- Sutar, V. P., Singh, V. K., & Sinha, R. P. (2025). Biodegradation of various edible oils and fat by *Staphylococcus petrasii* subsp. *jettensis* VSJK R1 for application in bioremediation of lipid-rich restaurant wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 56(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01577-7>