



DOI:10.22144/ctujos.2026.199

PHÂN LẬP VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP PROTEASE TỪ DA MẶT NGƯỜI

Ngô Thị Thu Ngân¹, Nguyễn Như Biết¹, Lê Thị Yến Nhi¹, Nguyễn Thị Thanh Thanh¹, Lê Thị Cẩm Vân⁴, Nguyễn Thị Huỳnh Như², Lưu Phúc Lợi³, Lê Uyển Thanh¹ và Huỳnh Ngọc Tâm^{1,*}

¹Khoa Công nghệ và Kỹ thuật, Trường Đại học Đồng Tháp, Việt Nam

²Trung tâm Liên kết đào tạo và Bồi dưỡng, Trường Đại học Đồng Tháp, Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Ứng dụng Khoa học Sức khỏe và Lão hóa (ARiHA), Bệnh viện Thống Nhất, Việt Nam

⁴Trường Trung học Phổ thông Tân Hưng, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): hntam@dtu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 08/06/2026

Sửa bài (Revised): 21/06/2026

Duyệt đăng (Accepted): 23/08/2026

Title: Isolation of protease-producing bacteria from human facial skin

Author(s): Ngô Thị Thu Ngân¹, Nguyễn Như Biết¹, Lê Thị Yến Nhi¹, Nguyễn Thị Thanh Thanh¹, Lê Thị Cẩm Vân⁴, Nguyễn Thị Huỳnh Như², Lưu Phúc Lợi³, Lê Uyển Thanh¹ and Huỳnh Ngọc Tâm^{1,*}

Affiliation(s): ¹Faculty of Technology and Engineering, Dong Thap University, Viet Nam; ²Center for Training Cooperation and Professional Development, Dong Thap University, Viet Nam; ³Institute for Applied Research in Health Sciences and Aging (ARiHA), Thong Nhat Hospital, Viet Nam; ⁴Tan Hung High School, Viet Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn sinh protease từ bã nhờn da mặt người khỏe mạnh. Từ 30 mẫu thu tại vùng trán, má và cằm, 260 dòng vi khuẩn đã được phân lập. Hoạt tính protease được khảo sát trên môi trường Casein agar và Skim milk agar trong 72 giờ nuôi cấy. Kết quả ghi nhận 21 dòng có khả năng phân giải protein, trong đó dòng M7 thể hiện hoạt tính cao nhất với đường kính vòng phân giải đạt 40,67 mm trên Casein agar và 37,33 mm trên Skim milk agar. Trong số các dòng có hoạt tính protease, 8 dòng biểu hiện hoạt tính lipase và 6 dòng biểu hiện hoạt tính amylase. Kết quả định danh phân tử bằng 16S rDNA cho thấy dòng M7 thuộc chi *Bacillus* và có quan hệ di truyền gần với *Bacillus albus*, *Bacillus paramycoides* và các thành viên thuộc *Bacillus cereus* group. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu đã giúp tuyển chọn được dòng M7 có hoạt tính protease nổi bật và cho thấy hệ vi sinh vật da mặt người là nguồn tiềm năng để khai thác các vi khuẩn sinh enzyme ngoại bào.

Từ khóa: 16S rDNA, *Bacillus* sp., enzyme ngoại bào, hệ vi sinh vật da, protease

ABSTRACT

This study aimed to isolate and screen protease-producing bacterial strains from the facial sebum of healthy humans. From 30 samples collected across the forehead, cheeks, and chin, a total of 260 bacterial strains were isolated. Proteolytic activity was evaluated on Casein agar and Skim milk agar plates over a 72-hour incubation period. The results revealed 21 strains capable of protein degradation, among which strain M7 exhibited the highest activity, achieving zone of clearance diameters of 40.67 mm on Casein agar and 37.33 mm on Skim milk agar. Among the protease-producing strains, 8 strains displayed lipase activity and 6 strains showed amylase activity. Molecular identification using 16S rDNA sequencing revealed that strain M7 belongs to the genus *Bacillus* and is phylogenetically closely related to *Bacillus albus*, *Bacillus paramycoides*, and members of the *Bacillus cereus* group. In conclusion, the study successfully selected strain M7 for its outstanding protease activity, demonstrating that the human facial microbiota represents a potential source for exploiting extracellular enzyme-producing bacteria.

Keywords: 16S rDNA, *Bacillus* sp., extracellular enzymes, protease, skin microbiota

1. GIỚI THIỆU

Da người là môi trường cư trú của hệ vi sinh vật đa dạng bao gồm vi khuẩn, nấm và virus cộng sinh. Thành phần hệ vi sinh vật da thay đổi tùy theo đặc điểm sinh lý của từng vùng da, trong đó các vùng giàu tuyến bã nhờn như trán, má và cằm thường chứa nhiều lipid từ bã nhờn cùng các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc từ tế bào biểu bì bong tróc (Byrd et al., 2018). Nghiên cứu của Flowers and Grice (2020) cũng cho rằng mặc dù bề mặt da nhìn chung là môi trường nghèo dinh dưỡng, các vùng da dầu vẫn cung cấp nguồn protein và lipid đáng kể cho vi sinh vật cư trú. Để thích nghi với điều kiện này, nhiều vi khuẩn trên da có khả năng tiết các enzyme nhằm phân giải cơ chất hữu cơ và thu nhận nguồn dinh dưỡng cần thiết cho quá trình sinh trưởng.

Trong số các enzyme ngoại bào của vi sinh vật, protease là nhóm enzyme xúc tác phản ứng thủy phân liên kết peptide trong protein và được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và công nghệ sinh học (Contesini et al., 2018). Đối với vi sinh vật cư trú trên da, protease có thể tham gia quá trình phân giải các hợp chất protein có nguồn gốc từ tế bào biểu bì bong tróc, góp phần hỗ trợ quá trình thu nhận dinh dưỡng và thích nghi với môi trường sống.

Khác với các nguồn phân lập vi sinh vật truyền thống như đất hoặc nước thải, hệ vi sinh vật da người tồn tại trong môi trường có những đặc điểm sinh lý riêng, bao gồm pH acid nhẹ, sự hiện diện của lipid từ bã nhờn và các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc từ tế bào biểu bì bong tróc. Những điều kiện này tạo áp lực chọn lọc tự nhiên, góp phần hình thành các vi sinh vật có khả năng tiết enzyme ngoại bào để thích nghi và khai thác nguồn dinh dưỡng sẵn có (Byrd et al., 2018; Flowers & Grice, 2020). Vì vậy, hệ vi sinh vật da người được xem là nguồn phân lập tiềm năng cho việc tuyển chọn các vi sinh vật có khả năng sinh enzyme ngoại bào. Trong số các enzyme ngoại bào, protease là nhóm enzyme đáng quan tâm do vai trò quan trọng trong quá trình thích nghi và sinh tồn của vi sinh vật trong môi trường da, cũng như khả năng tham gia vào các hoạt động chuyển hóa cơ chất protein (Byrd et al., 2018; Flowers & Grice, 2020). Ngoài vai trò sinh học đối với vi sinh vật cư trú trên da, protease còn là nhóm enzyme được quan tâm nhờ tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như công nghệ sinh học, mỹ phẩm và chăm sóc cá nhân (Contesini et al., 2018; Danilova & Sharipova, 2020). Đồng thời, protease có nguồn gốc từ hệ vi sinh vật da cũng được quan tâm trong các nghiên cứu về tương tác vi sinh vật và các hoạt tính sinh học

liên quan (Chua et al., 2022). Bên cạnh protease, nhiều vi khuẩn còn có khả năng sinh tổng hợp lipase và amylase, phản ánh tính đa dạng về năng lực chuyển hóa và khai thác các nguồn cơ chất khác nhau (Danilova & Sharipova, 2020).

Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn sinh protease chủ yếu tập trung vào các nguồn môi trường như đất, nước thải (Afrin et al., 2024), trong khi hệ vi sinh vật trên da người vẫn còn là nguồn tài nguyên vi sinh vật chưa được khai thác đầy đủ cho mục đích nghiên cứu enzyme. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu gần đây về hệ vi sinh vật da mặt thường tập trung vào khả năng hình thành biofilm, đối kháng vi sinh vật hoặc vai trò liên quan đến bệnh lý da (Tu et al., 2025; Le et al., 2025), trong khi các nghiên cứu phân lập vi khuẩn từ da mặt người khỏe mạnh nhằm tuyển chọn các dòng có hoạt tính protease cao còn khá hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập các dòng vi khuẩn từ bã nhờn da mặt người khỏe mạnh, khảo sát hoạt tính protease của các dòng phân lập, đồng thời đánh giá hoạt tính lipase và amylase của các dòng tuyển chọn và định danh dòng có hoạt tính protease cao nhất dựa trên phân tích trình tự 16S rDNA.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Mẫu vi sinh vật được thu từ bã nhờn da mặt của 30 tình nguyện viên (18 - 40 tuổi) là sinh viên, học viên và giảng viên tại Trường Đại học Đồng Tháp. Các đối tượng không có biểu hiện viêm da, không bị mụn viêm và không sử dụng kháng sinh hoặc mỹ phẩm trong vòng 24 giờ trước khi lấy mẫu.

Tất cả tình nguyện viên tham gia nghiên cứu đã được thông báo về mục đích nghiên cứu, quy trình lấy mẫu bã nhờn trên da mặt bằng phương pháp không xâm lấn và tự nguyện ký xác nhận đồng thuận trước khi lấy mẫu.

Môi trường nuôi cấy và khảo sát hoạt tính enzyme: Nutrient Agar (NA) được sử dụng để phân lập và duy trì các chủng vi khuẩn. Hoạt tính enzyme của các dòng vi khuẩn được đánh giá trên các môi trường chuyên biệt gồm: Skim milk agar (7,5% skim milk); Casein agar ((g/L): casein, 10; K_2HPO_4 , 0.2; KH_2PO_4 , 0.2; $MgSO_4.7H_2O$, 0.1; $MnSO_4.4H_2O$, 0.005; $FeSO_4.7H_2O$, 0.005; Na_2MoO_4 , 0.001; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.001; $CoCl_2$, 0.01; $CaCl_2$, 0.01; $CaSO_4.5H_2O$, 0.001). Hoạt tính amylase được đánh giá trên môi trường Starch agar theo phương pháp

của Thi và ctv. (2019). Trong khi đó, hoạt tính lipase được khảo sát trên môi trường Tween 80 agar.

Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 07 năm 2025 đến tháng 05 năm 2026 tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học và khu vực thí nghiệm của Trường Đại học Đồng Tháp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu và phân lập vi khuẩn từ da mặt người

Mục tiêu là phân lập được các dòng vi khuẩn từ mẫu vi sinh vật trong bã nhờn trên da mặt người.

Phương pháp thu mẫu vi khuẩn từ da mặt

Mẫu vi sinh được thu bằng tăm bông vô trùng thấm dung dịch saline 0,85%, lấy tại ba vùng trán, má và cằm với diện tích 4 cm² trên mỗi vùng (Bích, 2019). Sau khi thu, mẫu được đưa vào 1 mL dung dịch saline 0,85%, vortex đồng nhất và tiến hành xử lý trong điều kiện vô trùng. Mẫu được bảo quản ở 4°C và xử lý trong 15 phút.

Phương pháp phân lập vi khuẩn

Huyền phù vi sinh vật được pha loãng thập phân theo dãy từ 10⁻¹ đến 10⁻⁵. Tại mỗi nồng độ pha loãng, 100 µL dịch mẫu được hút và trải đều trên bề mặt môi trường NA bằng kỹ thuật trải đĩa, các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 - 48 giờ. Các khuẩn lạc riêng biệt được chọn và làm thuần bằng phương pháp rìa cây phân đoạn trên môi trường NA (Hằng và ctv., 2011). Các chủng thuần được bảo quản ngắn hạn ở 4°C và dài hạn trong glycerol 20% ở -20°C.

Quan sát hình thái khuẩn lạc và đặc tính Gram của các dòng vi khuẩn

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc được ghi nhận dựa trên màu sắc, kích thước, hình dạng, bề mặt và mép khuẩn lạc theo mô tả của Mai và ctv. (2011). Đặc tính Gram được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram tiêu chuẩn và quan sát dưới kính hiển vi quang học theo mô tả của Hằng và ctv. (2011). Ngoài ra, một số dòng vi khuẩn đại diện được nhuộm nội bào tử (endospore stain) theo phương pháp Wirtz-Conklin nhằm khảo sát khả năng hình thành nội bào tử. Các tiêu bản sau nhuộm được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính dầu (100x).

2.2.2. Khảo sát hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn được phân lập

Mục tiêu là tuyển chọn được các dòng vi khuẩn có hoạt tính protease thông qua khả năng phân giải protein trên môi trường chuyên biệt.

Các dòng vi khuẩn được nuôi trên NA trong 24 giờ và chuẩn hóa đến OD₆₀₀ = 0,3. Khoanh giấy thấm vô trùng (5 mm) được thấm dịch huyền phù vi khuẩn và đặt lên môi trường Casein agar và Skim milk agar. Dung dịch saline 0,85% được sử dụng làm đối chứng âm. Các đĩa được ủ ở 37°C và theo dõi sự hình thành vòng phân giải protein tại 24, 48 và 72 giờ. Hoạt tính protease được xác định dựa trên đường kính vòng phân giải (mm), mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần và kết quả được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình kèm ký tự phân nhóm thống kê.

2.2.3. Khảo sát hoạt tính lipase và amylase của các dòng vi khuẩn tuyển chọn

Mục tiêu là khảo sát được hoạt tính lipase và amylase của các dòng vi khuẩn có hoạt tính protease và đánh giá được khả năng sinh enzyme của các dòng tuyển chọn.

Tất cả các dòng vi khuẩn ghi nhận có hoạt tính protease, không phân biệt mức độ hoạt tính mạnh hay yếu, đều được tiếp tục khảo sát khả năng sinh lipase và amylase. Phương pháp tương tự được áp dụng với khoanh giấy thấm chứa huyền phù vi khuẩn đặt trên môi trường Tween 80 agar và Starch agar.

Hoạt tính lipase được ghi nhận dựa trên sự xuất hiện vùng kết tủa trắng đục hoặc dạng tinh thể xung quanh khuẩn lạc trên môi trường Tween 80 agar. Vùng kết tủa này được hình thành do enzyme lipase thủy phân Tween 80 giải phóng acid béo tự do; các acid béo sau đó phản ứng với ion Ca²⁺ có trong môi trường tạo thành muối canxi không tan và lắng đọng xung quanh khuẩn lạc. Trong khi hoạt tính amylase được xác định bằng vòng phân giải tinh bột sau khi nhuộm Lugol. Mỗi thí nghiệm được thực hiện ba lần.

2.2.4. Định danh trình tự 16S rDNA bằng kỹ thuật phân tích sinh học phân tử

Mục tiêu là định danh được dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp protease cao nhất dựa trên phân tích trình tự 16S rDNA.

Dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp protease cao nhất được chọn để định danh phân tử bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA. DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen). Trình tự 16S rDNA được khuếch đại bằng cặp mồi 27F/1492R theo quy trình của Weisburg et al. (1991). Sản phẩm PCR được giải trình tự bằng phương pháp Sanger (Macrogen Inc., Hàn Quốc). Các trình tự thu được từ cả hai môi được kiểm tra, lắp ráp và chỉnh sửa bằng phần mềm Clone

Manager 9.0. Trình tự hoàn chỉnh sau đó được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Trình tự được chọn đăng ký số hiệu truy cập (accession number) trên GenBank. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng MEGA 12 với phương pháp bootstrap 1000 lần.

2.2.5. Xử lý thống kê

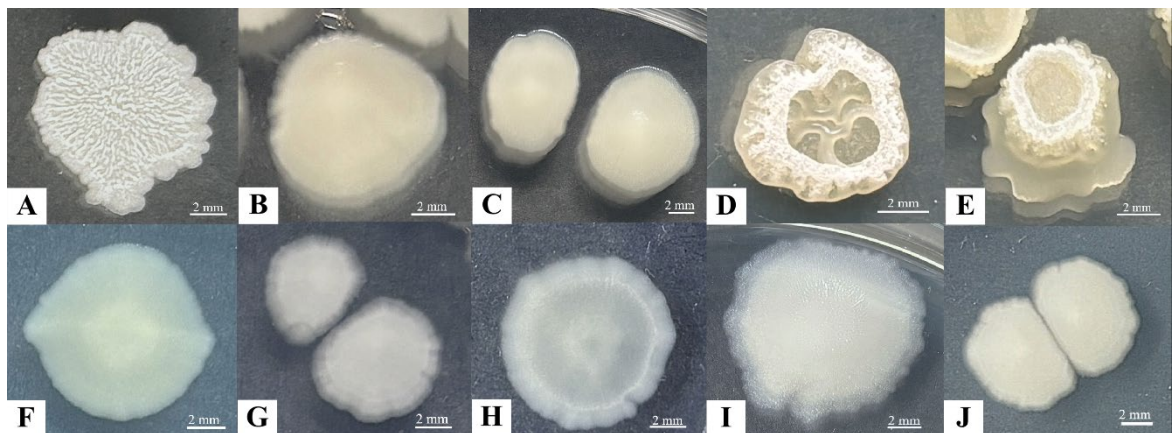
Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.1 với phép thử Tukey's ở mức ý nghĩa 5%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm các dòng vi khuẩn được phân lập từ da mặt người

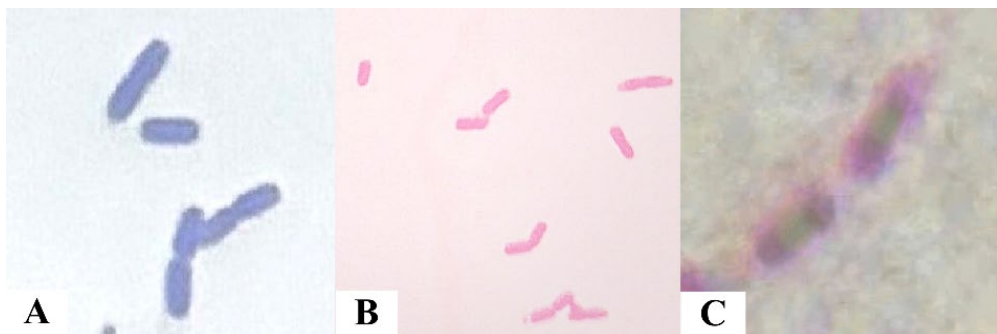
Từ 30 mẫu bã nhờn da mặt thu thập tại vùng trán, má và cằm, 260 dòng vi khuẩn thuần nhất được phân lập. Các dòng phân lập thể hiện sự đa dạng về hình thái khuẩn lạc, trong đó khuẩn lạc dạng tròn chiếm

ưu thế với 216 dòng, chiếm 83,7%, với màu sắc chủ đạo từ trắng sữa đến vàng nhạt. Kích thước khuẩn lạc dao động từ 2 đến 10 mm sau 24 giờ nuôi cấy trên môi trường NA. Kết quả nhuộm Gram cho thấy có 191 dòng (chiếm 73,46%) thuộc nhóm Gram dương và 69 dòng (chiếm 26,54%) còn lại thuộc nhóm Gram âm. Hình thái khuẩn lạc của một số dòng đại diện được trình bày ở Hình 1. Bên cạnh đó, hình thái tế bào sau nhuộm Gram và nhuộm nội bào tử của một số dòng vi khuẩn đại diện được minh họa ở Hình 2. Việc quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 40x cho thấy dòng M7 và M66 đều có dạng trực khuẩn, phân bố đơn lẻ hoặc tạo chuỗi ngắn. Dòng M7 bắt màu tím đặc trưng của vi khuẩn Gram dương (Hình 2A), trong khi dòng M66 bắt màu hồng đặc trưng của vi khuẩn Gram âm (Hình 2B). Kết quả nhuộm nội bào tử bào tử quan sát ở vật kính dầu 100x cho thấy dòng M7 có khả năng hình thành nội bào tử, với cấu trúc bào tử bắt màu xanh nằm bên trong tế bào sinh dưỡng bắt màu hồng (Hình 2C).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc đại diện của các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường NA

Ghi chú: A: M144, B: M148, C: M124, D: M66, E: M168, F: M214, G: M22, H: M7, I: M98, J: M246. Thanh thước đo tỉ lệ trong mỗi ảnh tương ứng với 2 mm.



Hình 2. Hình thái tế bào sau nhuộm Gram và nhuộm nội bào tử của một số dòng vi khuẩn đại diện

Ghi chú: (A) tế bào Gram dương của dòng M7, (B) tế bào Gram âm của dòng M66, (C) nội bào tử của dòng M7.

Tỷ lệ các dòng vi khuẩn Gram dương chiếm ưu thế trong nghiên cứu này, phù hợp với các công bố trước đây về hệ vi sinh vật da người. Byrd et al. (2018) cho rằng các phương pháp nuôi cấy truyền thống thường ưu tiên phân lập các vi khuẩn có khả năng thích nghi tốt với điều kiện *in vitro*, đặc biệt là các nhóm Gram dương như *Staphylococcus*. Tương tự, kết quả nghiên cứu phân lập thực nghiệm của Timm et al. (2020) ghi nhận sự hiện diện phổ biến của các chi thuộc Firmicutes và Actinobacteria như *Staphylococcus*, *Micrococcus* và *Bacillus* trong tập hợp các vi khuẩn có khả năng nuôi cấy từ da người khỏe mạnh. Gần đây, Le et al. (2025) cũng cho thấy phần lớn các chủng vi khuẩn phân lập từ da người khỏe mạnh thuộc các chi Gram dương dễ nuôi cấy như *Staphylococcus* và *Bacillus*. Những kết quả này cho thấy các vi khuẩn Gram dương có khả năng thích nghi và phát triển tốt trong điều kiện nuôi cấy thông thường, qua đó góp phần giải thích sự chiếm ưu thế của nhóm vi khuẩn này trong nghiên cứu hiện tại. Bên cạnh đó, sự khác biệt về kích thước, màu sắc và hình dạng khuẩn lạc giữa các dòng phân lập cũng cho thấy hệ vi sinh vật da mặt người có thành phần tương đối đa dạng, phản ánh sự hiện diện của nhiều nhóm vi khuẩn khác nhau trên bề mặt da.

3.2. Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn được phân lập

Từ 260 dòng vi khuẩn phân lập được từ bã nhờn da mặt người, quá trình sàng lọc trên môi trường Casein agar và Skim milk agar đã xác định 21 dòng có khả năng phân giải protein. Trong đó có 19 dòng có hoạt tính protease thuộc nhóm Gram dương, chiếm 90,48% và chỉ ghi nhận 2 dòng Gram âm (M66, M168), chiếm 9,52%. Trong số 21 dòng có khả năng phân giải protein, 16 dòng có đường kính vòng phân giải lớn hơn 25 mm sau 72 giờ nuôi cấy được trình bày chi tiết ở Bảng 1 và Bảng 2. Năm dòng còn lại gồm M66, M109, M144, M168 và M253 vẫn thể hiện hoạt tính protease nhưng có đường kính vòng phân giải nhỏ hơn 25 mm sau 72 giờ nuôi cấy, do đó không được trình bày trong Bảng 1 và Bảng 2.

Kết quả ở Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy đường kính vòng phân giải của các dòng vi khuẩn có xu hướng tăng theo thời gian nuôi cấy trên cả hai môi trường khảo sát. Trên môi trường Casein agar, đường kính vòng phân giải của các dòng tuyển chọn dao động

từ 6,00 đến 12,00 mm sau 24 giờ, từ 15,00 đến 25,00 mm sau 48 giờ và từ 26,00 đến 40,67 mm sau 72 giờ. Tương tự, trên môi trường Skim milk agar, các giá trị tương ứng lần lượt là 6,00 - 11,00 mm sau 24 giờ, 15,33 - 24,00 mm sau 48 giờ và 25,00 - 37,33 mm sau 72 giờ.

Bảng 1. Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường Casein agar

Vi khuẩn	Đường kính vòng phân giải theo thời gian (mm)		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
M7	12,00 ^a	25,00 ^a	40,67 ^a
M22	10,00 ^c	20,67 ^{de}	29,00 ^c
M78	8,00 ^c	21,00 ^d	28,33 ^{cd}
M98	7,00 ^{fg}	17,00 ^{hi}	28,33 ^{cd}
M103	9,00 ^d	19,00 ^g	28,00 ^{cde}
M115	6,00 ^{hi}	16,00 ^j	27,00 ^{ef}
M124	8,00 ^c	17,33 ^h	28,33 ^{cd}
M125	7,67 ^{ef}	15,00 ^k	27,67 ^{de}
M148	7,33 ^{efg}	16,67 ^{hij}	26,00 ^f
M211	10,33 ^{bc}	22,00 ^c	29,33 ^c
M214	9,00 ^d	20,00 ^{ef}	29,00 ^c
M216	6,67 ^{gh}	16,67 ^{hij}	26,00 ^f
M218	8,00 ^c	17,00 ^{hi}	27,00 ^{ef}
M242	9,00 ^d	19,67 ^{fg}	28,00 ^{cde}
M246	9,67 ^{cd}	17,00 ^{hi}	28,00 ^{cde}
M260	11,00 ^b	23,00 ^b	36,00 ^b
ĐC	0,00 ^k	0,00 ^p	0,00 ^j
TB	8,67	18,94	29,17
CV%	18,94	14,92	13,04

Ghi chú: ĐC: đối chứng âm, TB: trung bình, CV: hệ số biến động (%). Các giá trị trong cùng một cột có các ký tự đi kèm khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; Tukey).

Trong số các dòng khảo sát, dòng M7 thể hiện hoạt tính protease cao nhất trên cả hai môi trường ở tất cả các thời điểm nghiên cứu. Sau 72 giờ nuôi cấy, đường kính vòng phân giải của dòng M7 đạt 40,67 mm trên môi trường Casein agar và 37,33 mm trên môi trường Skim milk agar, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với phần lớn các dòng còn lại ($p < 0,05$). Ngoài ra, dòng M260 cũng ghi nhận hoạt tính protease cao với đường kính vòng phân giải đạt 36,00 mm trên môi trường Casein agar và 32,00 mm trên môi trường Skim milk agar. Đối chứng âm không ghi nhận vòng phân giải trong suốt thời gian thí nghiệm (Bảng 1, Bảng 2 và Hình 3).

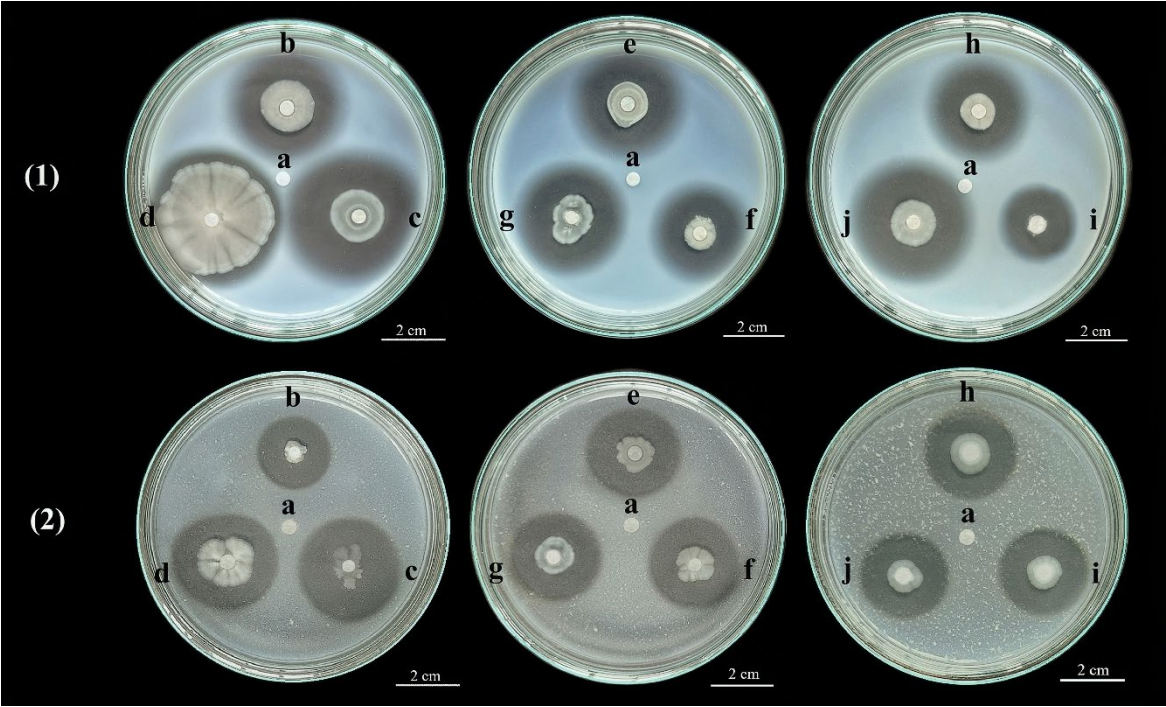
Bảng 2. Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường Skim milk agar

Vi khuẩn	Đường kính vòng phân giải theo thời gian (mm)		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
M7	11,00 ^a	24,00 ^a	37,33 ^a
M22	10,00 ^b	21,00 ^c	31,00 ^b
M78	8,00 ^c	18,00 ^h	27,33 ^{de}
M98	8,00 ^c	16,00 ⁱ	26,33 ^{ef}
M103	8,00 ^c	18,00 ^h	25,00 ^g
M115	9,00 ^{cd}	16,00 ⁱ	25,00 ^g
M124	9,00 ^{cd}	19,00 ^{fg}	27,00 ^{de}
M125	7,67 ^c	17,00 ⁱ	28,00 ^d
M148	7,00 ^f	15,33 ^{jk}	26,67 ^e
M211	9,33 ^c	20,33 ^{cd}	29,00 ^c
M214	9,00 ^{cd}	20,00 ^{de}	29,00 ^c
M216	6,00 ^g	15,33 ^{jk}	25,33 ^{fg}
M218	9,00 ^{cd}	19,33 ^{ef}	29,00 ^c
M242	8,00 ^c	18,33 ^{gh}	28,00 ^d
M246	8,67 ^d	17,67 ^{hi}	27,33 ^{de}
M260	10,00 ^b	22,00 ^b	32,00 ^b
ĐC	0,00 ⁱ	0,00 ^o	0,00 ^k
TB	8,60	18,58	28,33
CV%	14,23	13,27	10,97

Ghi chú: ĐC: đối chứng âm, TB: trung bình, CV: hệ số biến động (%). Các giá trị trong cùng một cột có các ký tự đi kèm khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; Tukey).

Sự gia tăng của đường kính vòng phân giải theo thời gian nuôi cấy phản ánh sự tích lũy protease ngoại bào cùng với quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. Xu hướng này phù hợp với các nghiên cứu trước đây khi hoạt tính protease thường tăng mạnh ở cuối pha lũy thừa và pha ổn định trong điều kiện nuôi cấy in vitro. Han et al. (2017) đã ghi nhận sự tăng biểu hiện các gene mã hóa protease ngoại bào ở *Bacillus pumilus* BA06 trong pha ổn định. Shaikh et al. (2023) ghi nhận hoạt tính protease của *Bacillus nakamurai* PL4 đạt cao nhất sau khoảng 72 giờ và sau đó giảm dần.

Khả năng biểu hiện hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn phân lập từ da mặt người có thể liên quan đến đặc điểm sinh thái của vùng lấy mẫu. Các vị trí như trán, má và cằm là những vùng da giàu tuyến bã nhờn, chứa nhiều lipid và protein từ bã nhờn và tế bào biểu bì bong tróc (Byrd et al., 2018). Việc tiết protease giúp vi khuẩn khai thác các nguồn cơ chất này để phục vụ quá trình sinh trưởng và thích nghi với môi trường da (Chua et al., 2022).



Hình 3. Vòng phân giải protein của một số dòng vi khuẩn đại diện trên môi trường Casein agar và Skim milk agar sau 72 giờ nuôi cấy

Ghi chú: (1): Casein agar, (2): Skim milk agar, a: đối chứng âm, b: M124, c: M7, d: M260, e: M22, f: M242, g: M214, h: M218, i: M125, j: M211. Thanh thước tỉ lệ ở mỗi đĩa tương ứng với 2 cm.

Sự khác biệt về đường kính vòng phân giải giữa môi trường Casein agar và Skim milk agar ở một số dòng vi khuẩn cho thấy thành phần cơ chất có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện protease. Nhìn chung, vòng phân giải trên Casein agar có xu hướng lớn hơn so với Skim milk agar. Kết quả này có thể liên quan đến sự khác biệt về thành phần protein của hai môi trường, đồng thời phù hợp với nhận định của Shaikh et al. (2023) khi casein được ghi nhận là cơ chất thuận lợi cho quá trình sản xuất protease.

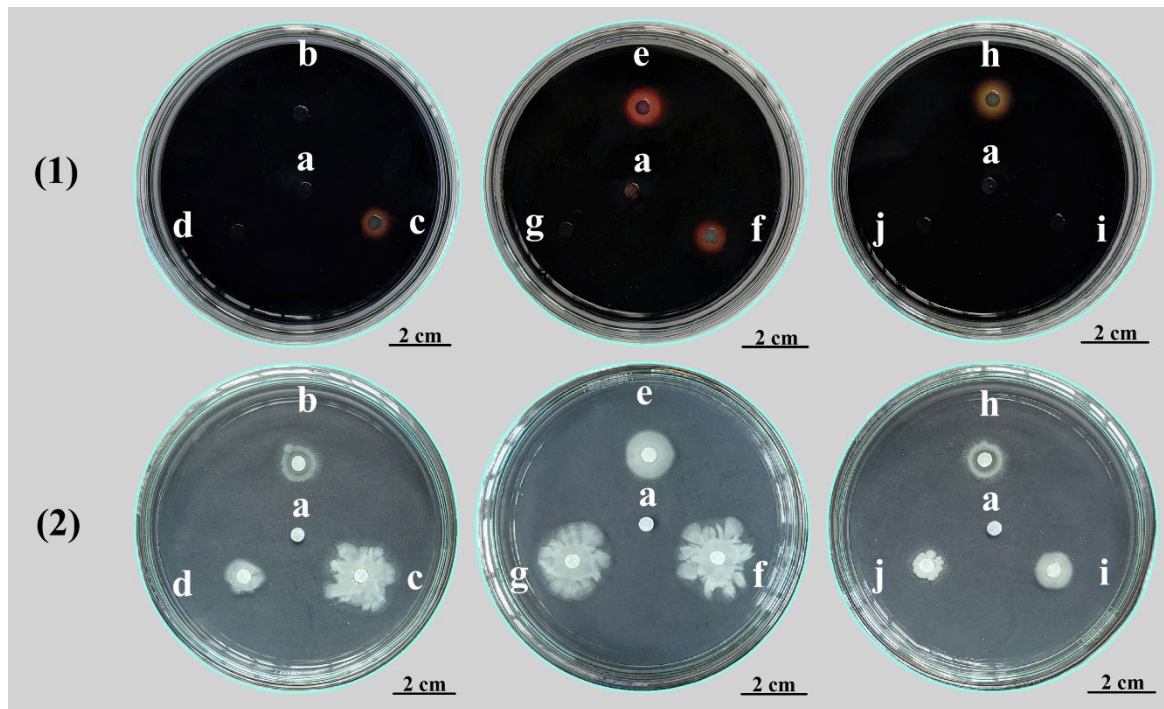
Trong số các dòng khảo sát, M7 thể hiện hoạt tính protease cao nhất và ổn định trên cả hai môi trường (Hình 3). Kết quả này cho thấy M7 là chủng tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo về đặc điểm enzyme và định danh phân tử. Việc sử dụng kích thước vòng phân giải làm tiêu chí tuyển chọn ban đầu cũng đã được áp dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sàng lọc vi khuẩn sinh protease (Masi et al., 2021; Shaikh et al., 2023; Shad et al., 2024).

3.3. Hoạt tính lipase và amylase của các dòng vi khuẩn tuyển chọn

Toàn bộ 21 dòng vi khuẩn có hoạt tính protease tiếp tục được khảo sát hoạt tính lipase và amylase.

Kết quả ghi nhận 8 dòng đồng thời biểu hiện khả năng tổng hợp lipase trên môi trường Tween 80 agar, bao gồm M7, M78, M98, M115, M144, M148, M211 và M218. Ngoài ra, 6 dòng có khả năng thủy phân tinh bột trên môi trường Starch agar, gồm M78, M98, M125, M144, M115 và M242. Sự xuất hiện vùng phân giải xung quanh khuẩn lạc cho thấy các dòng vi khuẩn này có khả năng tiết enzyme ngoại bào tương ứng. Trong khi đó, đối chứng âm không ghi nhận vùng phân giải trên các môi trường khảo sát (Hình 4).

Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ một phần các dòng vi khuẩn có hoạt tính protease tiếp tục biểu hiện hoạt tính lipase và amylase. Sự khác biệt về khả năng biểu hiện enzyme ngoại bào giữa các chủng vi khuẩn cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đây về hệ vi sinh vật da người. Tu et al. (2025) cho thấy phần lớn các chủng phân lập từ hệ vi sinh vùng nang lông - tuyến bã (pilosebaceous) của da khỏe có hoạt tính protease (gelatinase), trong khi chỉ một tỷ lệ nhỏ biểu hiện hoạt tính lipase, phản ánh tính đa dạng về năng lực chuyển hóa giữa các chủng vi khuẩn cư trú trên da.



Hình 4. Khả năng biểu hiện hoạt tính lipase và amylase của một số dòng vi khuẩn đại diện

Ghi chú: (1): khảo sát hoạt tính amylase trên môi trường Starch agar sau khi nhuộm Lugol, (2): khảo sát hoạt tính lipase trên môi trường Tween 80 agar; a: đối chứng âm, b: M7, c: M78, d: M216, e: M125, f: M98, g: M218, h: M115, i: M148, j: M211. Thanh thước đo tỉ lệ ở mỗi đĩa tương ứng với 2 cm.

Các enzyme ngoại bào như protease và lipase được cho là có vai trò hỗ trợ vi khuẩn thích nghi với môi trường da mặt giàu bã nhờn thông qua khả năng phân giải protein và lipid để thu nhận nguồn dinh dưỡng (Byrd et al., 2018). Hoạt tính amylase nhìn chung thấp hơn so với hoạt tính protease và lipase. Sự khác biệt này có thể liên quan đến đặc điểm của môi trường da mặt, nơi lipid và protein được xem là những nguồn cơ chất phổ biến hơn so với các carbohydrate phức tạp.

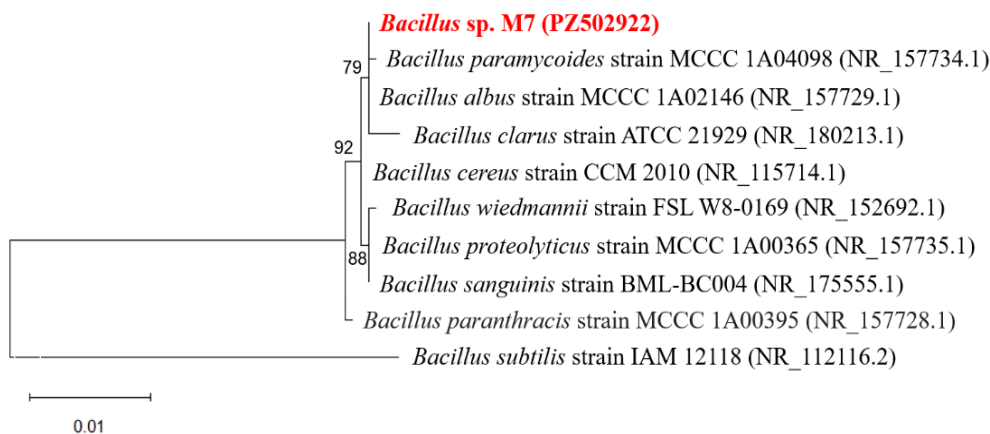
Kết quả này cho thấy khả năng biểu hiện enzyme ngoại bào giữa các dòng vi khuẩn không hoàn toàn đồng nhất và có thể phản ánh tính đặc hiệu chuyển hóa đối với từng loại cơ chất trong điều kiện *in vitro*. Nhận định này phù hợp với quan điểm của Swaney and Kalan (2021), cho rằng sự khác biệt ở cấp độ chủng là một yếu tố quan trọng chi phối khả năng thích nghi chức năng và chuyển hóa của vi khuẩn trong hệ vi sinh vật da người. Đồng thời, Alkema et al. (2021) cũng ghi nhận sự phân bố mang tính đặc hiệu theo nhóm phát sinh loài đối với các con đường chuyển hóa liên quan đến quá trình phân giải protein (proteolysis) và lipid, cho thấy khả năng biểu hiện các enzyme ngoại bào không phân bố đồng đều giữa các nhóm vi khuẩn cư trú trên da.

3.4. Định danh phân tử bằng 16S rDNA

Trình tự 16S rDNA của dòng vi khuẩn M7 thu được có chiều dài 1492 bp và đã được đăng ký trên

cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập (accession number) PZ502922. Kết quả phân tích BLASTN trên cơ sở dữ liệu NCBI GenBank cho thấy trình tự này có độ tương đồng cao với các thành viên thuộc nhóm *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus* group). Trong đó, mức độ tương đồng cao nhất ghi nhận với *Bacillus albus* strain MCCC 1A02146 (NR_157729.1) đạt 99,80%. Đồng thời, dòng nghiên cứu cũng có độ tương đồng cao với lần lượt các loài như *Bacillus wiedmannii* strain FSL W8-0169 (NR_152692.1), *Bacillus paramycooides* strain MCCC 1A04098 (NR_157734.1), *Bacillus proteolyticus* strain MCCC 1A00365 (NR_157735.1), *Bacillus sanguinis* strain BML-BC004 (NR_175555.1) và *Bacillus cereus* ATCC 14579 (NR_074540.1), với mức tương đồng đều đạt khoảng 99,73%.

Kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA 12 (Hình 5) cho thấy dòng M7 nằm trong cụm *Bacillus cereus* group và có quan hệ phát sinh loài gần gũi với các thành viên thuộc nhóm này. Trên cây phát sinh loài, M7 tạo thành một nhánh cùng với *Bacillus paramycooides* với giá trị bootstrap 79%, đồng thời nằm trong nhóm gồm *Bacillus albus* và các loài khác thuộc *Bacillus cereus* group với giá trị bootstrap 92%. Chủng *Bacillus subtilis* strain IAM 12118 (NR_112116.2) được sử dụng làm nhóm ngoại (outgroup) và tách biệt rõ rệt khỏi cụm *Bacillus cereus* group.



Hình 5. Cây phát sinh loài của dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. M7 dựa trên trình tự 16S rDNA với giá trị bootstrap được tính trên 1000 lần lặp

Kết quả giải trình tự 16S rDNA cho thấy dòng M7 có quan hệ di truyền gần với các thành viên thuộc *Bacillus cereus* group, đặc biệt là *B. albus* và *Bacillus paramycooides*. Theo Liu et al. (2017), *Bacillus albus*, *Bacillus paramycooides* và *Bacillus*

proteolyticus là những loài mới được mô tả trong *Bacillus cereus* group dựa trên các phân tích phân loại học và hệ gene. Điều này phản ánh sự đa dạng về phân loại cũng như mối quan hệ tiến hóa gần gũi giữa các thành viên trong nhóm vi khuẩn này. Tuy

nhiên, các loài thuộc *Bacillus cereus* group thường có trình tự 16S rDNA rất tương đồng, làm hạn chế khả năng phân biệt chính xác ở cấp độ loài (Liu et al., 2015). Do đó, chúng nghiên cứu được định danh ở mức *Bacillus* sp. M7.

Kết quả định danh cũng phù hợp với đặc điểm hoạt tính enzyme đã ghi nhận ở dòng *Bacillus* sp. M7. Kết quả của nhiều nghiên cứu cho thấy các loài thuộc chi *Bacillus*, đặc biệt là các thành viên của *Bacillus cereus* group, có khả năng tiết các enzyme ngoại bào như protease và lipase với hoạt tính cao (Contesini et al., 2018; Demirkan et al., 2021; Akhter et al., 2022). Trong nghiên cứu này, M7 là dòng có hoạt tính protease mạnh nhất trên cả môi trường Casein agar và Skim milk agar, đồng thời còn biểu hiện hoạt tính lipase, cho thấy tiềm năng sinh enzyme ngoại bào của dòng được phân lập từ hệ vi sinh vật da mặt người.

Ngoài ra, sự hiện diện của các loài thuộc chi *Bacillus* trên da người đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đây. Mukherjee et al. (2016) đã phát hiện chi *Bacillus* trong hệ vi sinh vật da mặt người bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA; trong khi đó, Timm et al. (2020) đã phân lập được các chủng *Bacillus* sống từ da của người khỏe mạnh. Những kết quả này cho thấy việc phân lập được một chủng thuộc chi *Bacillus* từ bã nhờn da mặt người khỏe mạnh là phù hợp với các nghiên cứu trước đây về hệ vi sinh vật da người, mặc dù nhóm vi khuẩn này thường không chiếm ưu thế trong cộng đồng vi sinh vật da.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy hệ vi sinh vật cư trú trên da mặt người khỏe mạnh là nguồn phân lập tiềm năng các vi khuẩn có khả năng sinh protease. Từ 260 dòng vi khuẩn phân lập được, có

21 dòng thể hiện hoạt tính protease, trong đó dòng M7 có hoạt tính cao nhất trên cả môi trường Casein agar và Skim milk agar. Ngoài hoạt tính protease, một số dòng còn biểu hiện hoạt tính lipase và amylase, phản ánh sự đa dạng về khả năng sinh enzyme ngoại bào của hệ vi sinh vật da mặt người.

Kết quả định danh dựa trên trình tự 16S rDNA cho thấy dòng M7 thuộc *Bacillus cereus* group và có quan hệ di truyền gần với *Bacillus albus* và *Bacillus paramycoides*. Bên cạnh hoạt tính protease nổi trội, dòng M7 còn thể hiện hoạt tính lipase, gợi ý khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme ngoại bào của dòng này.

Các dòng vi khuẩn sinh protease phân lập từ da mặt người, đặc biệt là dòng M7, có thể là đối tượng tiềm năng cho các nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực mỹ phẩm và chăm sóc cá nhân, nơi các protease sinh học đang được quan tâm nhờ khả năng tham gia vào quá trình làm sạch bề mặt da và phân giải các hợp chất protein. Kết quả nghiên cứu góp phần mở rộng nguồn vi sinh vật tiềm năng phục vụ cho các nghiên cứu về enzyme có nguồn gốc sinh học trong tương lai.

Tuy nhiên, để làm rõ hơn tiềm năng ứng dụng này, việc định danh chính xác dòng M7 cần tiếp tục được thực hiện bằng các chỉ thị phân tử có độ phân giải cao hơn hoặc dữ liệu hệ gene toàn phần; đồng thời, đặc tính enzyme, mức độ an toàn sinh học và các đặc tính liên quan đến ứng dụng thực tiễn cũng cần được đánh giá sâu hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi đề tài mã số SPD2025.02.120.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Afrin, S., Tamanna, T., Shahajadi, U. F., Bhowmik, B., Jui, A. H., Miah, M. A. S., & Bhuiyan, M. N. I. (2024). Characterization of protease-producing bacteria from garden soil and antagonistic activity against pathogenic bacteria. *The Microbe*, 4, 100123.
<https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100123>
- Akhter, K., Karim, I., Aziz, B., Bibi, A., Khan, J., & Akhtar, T. (2022). Optimization and characterization of alkaliphilic lipase from a novel *Bacillus cereus* NC7401 strain isolated from diesel fuel polluted soil. *PLoS ONE*, 17(8), e0273368.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273368>

- Alkema, W., Boekhorst, J., Eijlander, R. T., Schnittger, S., De Gruyter, F., Lukovac, S., Schilling, K., & Kortman, G. A. M. (2021). Charting host-microbe co-metabolism in skin aging and application to metagenomics data. *PloS one*, 16(11), e0258960.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258960>
- Bích, D. T. (2019). *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng kháng vi sinh vật gây bội nhiễm mụn trứng cá do sử dụng sản phẩm bôi chứa corticoid* (Luận án tiến sĩ). Đại học Cần Thơ.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews*

- Microbiology*, 16(3), 143–155.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Chua, W., Poh, S. E., & Li, H. (2022). Secretory proteases of the human skin microbiome. *Infection and Immunity*, 90(1), e00397-21.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00397-21>
- Contesini, F. J., Melo, R. R. D., & Sato, H. H. (2018). An overview of Bacillus proteases: from production to application. *Critical reviews in biotechnology*, 38(3), 321-334.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
- Danilova, I., & Sharipova, M. (2020). The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1782.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>
- Demirkan, E., Çetinkaya, A., & Abdou, M. (2021). Lipase from new isolate Bacillus cereus ATA179: optimization of production conditions, partial purification, characterization and its potential in the detergent industry. *Turkish Journal of Biology*, 45(3), 287 - 300.
<https://doi.org/10.3906/biy-2101-22>
- Flowers, L., & Grice, E. A. (2020). The skin microbiota: balancing risk and reward. *Cell host & microbe*, 28(2), 190-200.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.017>
- Han, L. L., Shao, H. H., Liu, Y. C., Liu, G., Xie, C. Y., Cheng, X. J., Wang, H. Y., Tan, X. M., & Feng, H. (2017). Transcriptome profiling analysis reveals metabolic changes across various growth phases in Bacillus pumilus BA06. *BMC microbiology*, 17(1), 156.
<https://doi.org/10.1186/s12866-017-1066-7>
- Hằng, M. T., Nhung, Đ. T. K., & Hào, V. T. (2011). *Thực hành vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Đại học Sư phạm.
- Le, V. H., King, T., Wuerzberger, B., Bauer, O. R., Carver, M. N., Chan, T. S., Henson, A. L., Hubbard, G. K., Kopadze, T., Patterson, C. F., McGraw, S. M., O'Hara, A., Yarkosky, E. J., LaMontagne, M. G., Hotze, E. M., & Ferreira, R. B. (2025). Metabolites derived from bacterial isolates of the human skin microbiome inhibit Staphylococcus aureus biofilm formation. *Microbiology Spectrum*, 13(9), e01306-25.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01306-25>
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., & Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the Bacillus cereus group. *Scientific reports*, 5(1), 14082.
<https://doi.org/10.1038/srep14082>
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., & Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the Bacillus cereus group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2499–2508.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>
- Mai, Đ. S., Nam, T. N., Quân, B. H., Thía, L. H., & Hà, Đ. H. (2011). *Thực tập vi sinh vật học*. NXB Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.
- Masi, C., Gemechu, G., & Tafesse, M. (2021). Isolation, screening, characterization, and identification of alkaline protease-producing bacteria from leather industry effluent. *Annals of Microbiology*, 71(1), 24.
<https://doi.org/10.1186/s13213-021-01631-x>
- Mukherjee, S., Mitra, R., Maitra, A., Gupta, S., Kumaran, S., Chakraborty, A., & Majumder, P. (2016). Sebum and Hydration Levels in Specific Regions of Human Face Significantly Predict the Nature and Diversity of Facial Skin Microbiome. *Scientific Reports*, 6(1), 36062.
<https://doi.org/10.1038/srep36062>
- Shad, A. A., Ahmad, T., Iqbal, M. F., Asad, M. J., Nazir, S., Mahmood, R. T., & Wajeheha, A. W. (2024). Production, partial purification and characterization of protease through response surface methodology by Bacillus subtilis K-5. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67, e24210355.
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024210355>
- Shaikh, I. A., Turakani, B., Malpani, J., Goudar, S. V., Mahnashi, M. H., Al-Serwi, R. H., Ghoneim, M. M., El-Sherbiny, M., Mannasaheb, B. A., Alsaikhani, F., Sindagimath, V., Khan, A. A., Muddapur, U. M., Azzouz, S., Mohammed, T., & Iqbal, S. M. S. (2023). Extracellular protease production, optimization, and partial purification from Bacillus nakamurai PL4 and its applications. *Journal of King Saud University-Science*, 35(1), 102429.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102429>
- Swaney, M. H., & Kalan, L. R. (2021). Living in your skin: microbes, molecules, and mechanisms. *Infection and Immunity*, 89(4), 10-1128.
<https://doi.org/10.1128/iai.00695-20>
- Thi, M., Ngử, C. M., & Hiệp, N. H. (2019). Phân lập, nhận diện vi khuẩn phân hủy tinh bột từ rác hữu cơ, ruột sùng (Holotrichia parallela) và trùn đất (Lubricus terrestris). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 55, 57-64.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2019.044>
- Timm, C. M., Loomis, K., Stone, W., Mehoke, T., Brensinger, B., Pellicore, M., Staniczenko, P. P. A., Charles, C., Nayak, S., & Karig, D. K. (2020). Isolation and characterization of diverse microbial representatives from the human skin microbiome. *Microbiome*, 8(1), 58.
<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00831-y>
- Tu, X. M., Le, M. B. N., Tran, H. H., Nguyen, T. N., Bui, L. D. H., Tran, D. N., Ho, S. N., & Huynh,

P. X. (2025). Characterization of the Pilosebaceous Microbiota and Biofilm-Forming Capacity of Bacteria Isolated from Healthy Individuals. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 19(4), 244-253.
<https://doi.org/10.30699/ijmm.19.4.244>

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.
<https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>