VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology

Journal homepage: https://js.vnu.edu.vn/NST

Original Article

# Influencing Factors to Biodispersant Biosynthesis of *Bacillus subtilis* S343

Phan Thi Hong Thao[1], Le Thi Tra[1], Tran Thi Huong[1], Dang Thi Nhung[1], Nguyen Thi Hong Lien[1], Nguyen Thi Thanh Ngoc[2], Dao Thi Hong Van[3,*]

[1]*Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Nghia Do, Hanoi, Vietnam*
[2]*East Asia University of Technology, Polyco Tower, Trinh Van Bo, Xuan Phuong, Hanoi, Vietnam*
[3]*Institute of Biotechnology and Food Technology, Hanoi Open University, Nguyen Hien, Bach Mai, Hanoi, Vietnam*

Received 05th June 2024
Revised 26th June 2025; Accepted 17th July 2025

**Abstract:** Biodispersants are a group of compounds containing surface-active molecules (hydrophilic and hydrophobic radicals). They are widely researched and applied in many industries, biological control agents in agriculture and environmental remediation. *Bacillus subtilis* strain S343, isolated from ferns, is one of the most effective biodispersant producers. Nutritional factors and fermentation conditions affecting the yield of biodispersants were studied. The fermentation medium contains carbon source which is soluble starch (1% w/v), nitrogen source which is yeast extract (0.5% w/v), some minerals and Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) (0.05 g/L), pH 7, 0 and incubation under shaking conditions at 35 °C for 6 days was found to maximize biodispersant production. The crude biodispersants produced reached the highest level of 18.9 g/L, oil spreading activity reached 75 mm, and the ability to collapse in just 1 second after contact. In particular, the $E_{24}$ emulsification index is high at 60% and the surface tension of the crude biodispersant can be reduced to 30.92 ± 2.0 compared to the water sample of 71.2 mN/m. The study shows that *Bacillus subtilis* S343 strain is a potential source for producing biodispersants for application in the fields of environment, biomedicine, agriculture and industry.

*Keywords:* Biosurfactant, Biodispersant, Emulsification index, Oil spreading, *Bacillus subtilis.*

* Corresponding author.
*E-mail address:* hongvancnsh@hou.edu.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5746

# Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học của *Bacillus subtilis* S343

Phan Thị Hồng Thảo[1], Lê Thị Trà[1], Trần Thị Hương[1], Đặng Thị Nhung[1], Nguyễn Thị Hồng Liên[1], Nguyễn Thị Thanh Ngọc[2], Đào Thị Hồng Vân[3,*]

[1]*Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Hà Nội, Việt Nam*

[2]*Trường Đại học Công nghệ Đông Á, Toà nhà Polyco, Trịnh Văn Bô, Xuân Phương, Hà Nội, Việt Nam*

[3]*Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Mở Hà Nội, Nguyễn Hiền, Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 05 tháng 6 năm 2024
Chỉnh sửa ngày 26 tháng 6 năm 2025; Chấp nhận đăng ngày 17 tháng 7 năm 2025

**Tóm tắt:** Chất phân tán sinh học là nhóm hợp chất có chứa các phân tử hoạt động bề mặt (các gốc ưa nước và kỵ nước). Chúng được nghiên cứu rộng rãi và ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp, tác nhân kiểm soát sinh học trong nông nghiệp và xử lý môi trường, y dược. Chủng *Bacillus subtilis* S343, được phân lập từ cây dương xỉ, là một trong những chủng sản xuất chất phân tán sinh học được chúng tôi lựa chọn nghiên cứu. Các yếu tố dinh dưỡng và điều kiện lên men ảnh hưởng đến sinh tổng hợp chất phân tán sinh học đã được nghiên cứu. Môi trường lên men phù hợp có chứa nguồn carbon là tinh bột tan (1% w/v), nguồn nitrogen là cao nấm men (0,5% w/v), một số khoáng chất và Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) (0,05 g/L), pH 7,0 và ủ trong điều kiện lắc ở 35 °C trong 6 ngày được cho là tối đa hóa việc sản xuất chất phân tán sinh học. Các chất phân tán sinh học thô tạo ra đạt cao nhất 18,9 g/L, hoạt tính phân tán dầu đạt 75 mm, khả năng tan dầu chỉ 1s sau khi tiếp xúc. Đặc biệt chỉ số nhũ hóa $E_{24}$ cao đạt 60% và sức căng bề mặt của chất phân tán sinh học thô có thể giảm xuống 30,92 ± 2,0 so với mẫu nước là 71,2 mN/m. Nghiên cứu cho thấy chủng *Bacillus subtilis* S343 là một nguồn tiềm năng để sản xuất chất phân tán sinh học ứng dụng trong các lĩnh vực môi trường, y sinh, nông nghiệp và công nghiệp.

*Từ khóa:* Chất hoạt động bề mặt sinh học, Chất phân tán sinh học, Chỉ số nhũ hóa, Phân tán dầu, *Bacillus subtilis*.

## 1. Mở đầu

Chất phân tán sinh học là chất hoạt động bề mặt sinh học có chứa các nhóm phân tử lưỡng tính gồm các gốc ưa nước và kị nước và không đồng nhất về mặt cấu trúc. Chúng có khả năng làm giảm sức căng bề mặt và có nhiều ứng dụng trong công nghiệp và môi trường [1]. Chất hoạt động bề mặt sinh học được sản xuất chủ yếu bởi các vi sinh vật khác nhau (vi khuẩn, nấm men hoặc nấm) trên bề mặt tế bào hoặc có thể được tiết ra ngoại bào [2, 3]. Chúng thuộc các nhóm khác nhau bao gồm glycolipids, phospholipids lipopeptide, acid béo, phức hợp polysaccharide-protein với lipid trung tính. Những phân tử này có thể thực hiện các vai trò tự nhiên khác nhau trong sự phát triển và sinh sản của vi sinh vật [2]. Chúng có thể tích tụ giữa các pha chất lỏng và giúp giảm sức căng bề mặt, điều này làm cho chúng trở thành ứng cử viên tiềm năng để tăng cường thu hồi dầu, phân hủy và xử lý sinh học [4].

Có rất nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng chủng *Bacillus subtilis* có khả năng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học [5, 7, 10, 11, 13]. Theo báo cáo của Mendoza và cộng sự [5] việc sản xuất

* Tác giả liên hệ.
*Địa chỉ email:* hongvancnsh@hou.edu.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5746

chất hoạt động bề mặt từ *Bacillus subtilis* DS03 sử dụng môi trường có rỉ đường làm giảm sức căng bề mặt nước từ 72 mN/m xuống còn 34 mN/m, đạt được nồng độ mixen tới hạn ở mức 24,66 ppm. Chất hoạt động bề mặt cho thấy khả năng ức chế sự phát triển màng sinh học của vi khuẩn *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* và *Listeria monocytogenes* hơn 90% ở nồng độ trên 2000 ppm. Thử nghiệm tiếp tục sử dụng chất hoạt động bề mặt để loại bỏ màng sinh học, kết quả cho thấy giảm đáng kể 50,10% *Escherichia coli*, 55,77% *Staphylococcus* và 59,44% *Listeria monocytogenes* ở nồng độ cao hơn 250 ppm.

Các chất hoạt động bề mặt sinh học đã được quan tâm hơn do tính đa dạng, độc tính thấp, khả năng phân hủy sinh học và an toàn sinh thái, được sản xuất thông qua quá trình lên men và ứng dụng rộng rãi. Ngày nay, các chất hoạt động bề mặt sinh học được ứng dụng nhiều trong nông nghiệp, công nghiệp, y học và lĩnh vực dầu khí, xử lý sinh học các chất ô nhiễm dầu mỏ, quản lý và tăng cường thu hồi dầu thô. Ngoài ra, các chất hoạt động bề mặt sinh học đã được phát hiện có tác dụng phá vỡ sự hình thành màng sinh học [4]. Màng sinh học (biofilm) là tập hợp quần xã vi sinh vật bám trên một bề mặt của vật thể rắn hoặc bề mặt chất lỏng, chúng sản sinh lớp polyme ngoại bào (EPS) bao phủ lên bề mặt. Các EPS này được cấu thành bởi các polyme có tính kết dính cao, kéo theo việc bám dính của nhiều chất hữu cơ, dầu mỡ hay các chất rắn lơ lửng trong các đường ống thoát nước sinh hoạt. Đây là nguyên chính gây ra mùi hôi và gây tắc các đường ống thoát nước.

Tại Việt Nam, hiện nay nghiên cứu sử dụng các chất phân tán sinh học trong lĩnh vực công nghiệp sản xuất giấy còn chưa được thực hiện. Tại nhà máy sản xuất giấy bao bì công nghiệp, việc kiểm soát sự tạo mảng bám hữu cơ (do vi sinh vật và một số chất hữu cơ) trong các thiết bị và đường ống sản xuất là một trong những vấn đề khó khăn nhất mà chưa được giải quyết thỏa đáng. Hiện nay các nhà máy đang sử dụng chất diệt khuẩn hóa học để làm giảm sự tạp nhiễm của vi sinh vật và dừng máy định kỳ xử lý với kiềm nóng để loại bỏ các mảng bám vi sinh trong đường ống thiết bị. Tuy nhiên, các biện pháp này chưa thực sự hiệu quả, có thể ảnh hưởng tới quá trình xử lý nước thải do hóa chất gây chết vi sinh vật trong bùn hoạt tính. Chất phân tán sinh học được xem như một giải pháp sinh thái, thân thiện môi trường, ngăn cản sự tái thiết lập màng sinh học bằng cách hòa tan và phân tán cặn lắng, nó hoạt động như chất thẩm thấu, mở màng sinh học và cho phép các chất diệt khuẩn xâm nhập vào exopolysaccharides. Bổ sung định kỳ chất phân tán sinh học vào hệ thống nước tuần hoàn có thể kiểm soát được việc hình thành mảng bám vi sinh trong dây chuyền sản xuất giấy. Lợi thế lớn nhất của chất phân tán sinh học so với chất phân tán hóa học là độ an toàn, dễ bị phân hủy sinh học và không gây độc hại đối với môi trường [34, 35].

Đặc tính của chất hoạt động bề mặt sinh học không chỉ phụ thuộc vào vi sinh vật sản xuất mà còn phụ thuộc vào điều kiện sinh trưởng. Nghiên cứu các điều kiện lên men và tăng sản lượng có thể góp phần mở rộng ứng dụng của chất hoạt động bề mặt sinh học. Vì vậy, cần phải đánh giá các chủng khác nhau về tiềm năng hoạt động bề mặt sinh học, chất dinh dưỡng phù hợp và điều kiện nuôi cấy cần thiết để đạt năng suất cao [6, 7]. Các yếu tố bao gồm dinh dưỡng môi trường (nguồn carbon, nitrogen và độ mặn) và điều kiện lên men (pH, nhiệt độ, tốc độ khuấy trộn, tỷ lệ giống) có thể ảnh hưởng đến việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học [8]. Cho đến nay, chỉ có một số chất hoạt động bề mặt sinh học được sản xuất ở quy mô lớn cho các ứng dụng thương mại, chủ yếu là do chi phí sản xuất và thu hồi đáng kể [9]. Các thông số kiểm soát quá trình sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học cần phải được duy trì trong một phạm vi điều kiện hoạt động nhất định, nhờ đó hoạt động của vi khuẩn với khả năng sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học tối đa có thể được tối ưu hóa. Về vấn đề này, nhiệt độ, độ pH, thành phần môi trường và độ mặn có tầm quan trọng hàng đầu để kiểm soát và tối ưu hóa việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học [10].

Trong nghiên cứu này, chủng *Bacillus subtilis* S343 được phân lập từ cây dương xỉ nơi có nồng độ ô nhiễm As trong đất phân tích cao

nhất 1606 mg/kg đất, chủng S343 có khả năng chống chịu As (V), MIC và MBC là 160 mM và MBC > 320 mM. Điều này chứng tỏ tại các địa bàn có mức độ ô nhiễm nghiêm trọng, các chủng vi khuẩn nội sinh (VKNS) trong cây dương xỉ cũng có thể tồn tại và phát triển. Khả năng chống chịu As của chủng S343 có vai trò quan trọng trong nghiên cứu này, do trong nước thải ở các nhà máy sản xuất công nghiệp có thể có chứa các kim loại nặng, trong đó có thể có As. Nên bên cạnh vai trò sinh tổng hợp chất phân tán sinh học để làm giảm khả năng tạo mảng bám, nếu chủng S343 có khả năng chịu As sẽ có thể sinh trưởng và xử lý As trong nước thải của các nhà máy công nghiệp [11]. Mục tiêu của nghiên cứu này là: i) Xác định các yếu tố vật lý và hóa học ảnh hưởng đến việc sản xuất chất phân tán sinh học từ chủng S343; và iii) Tìm ra thành phần thích hợp của môi trường tăng trưởng để sản xuất chất phân tán sinh học. Các kết quả có thể cung cấp gợi ý về các ứng dụng tiềm năng của chất phân tán sinh học từ *Bacillus subtilis* trong các lĩnh vực môi trường, y sinh, nông nghiệp và công nghiệp.

## 2. Vật liệu và phương pháp

### *2.1. Vật liệu*

Chủng *Bacillus subtilis* S343 được phân lập từ cây dương xỉ tại Đại Từ, Thái Nguyên, được lưu giữ trong bộ sưu tập giống tại phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ Sinh học. Chủng S343 sinh trưởng tốt trong khoảng 20 đến 55 ºC, pH từ 5 đến 9, chịu mặn lên đến 10% (w/v), có khả năng sử dụng đa dạng các nguồn carbon như D-glucose, D-maltose, D- fructose, L-arabinose, sucrose, D-manitolse, D-xylose, có khả năng phân hủy đa dạng các cơ chất như: CMC (carboxymethyl cellulose), tinh thể cellulose, xylan, tinh bột tan, casein [11].

### *2.2. Phương pháp nghiên cứu*

*Phương pháp thu nhận chất phân tán sinh học từ vi sinh vật*

Để sản xuất chất phân tán sinh học, môi trường có thành phần sau được sử dụng (g/L): $NH_4Cl$ 2, $KH_2PO_4$ 5, $Na_2HPO_4$ 4, $MnSO_4$ 0,2, $MgSO_4$ 0,2, $FeCl_3$ 0,05, $CaCl_2$ 0,001, dầu oliu 1% (v/v); pH 7 và hấp khử trùng ở 121ºC trong 20 phút. Chủng *Bacillus subtilis* S343 được nhân giống trên môi trường LB ((g/L): peptone 10, cao nấm men 5, NaCl 10, pH 7) trong 24 giờ ở 37 ºC, tốc độ lắc 180 vòng/phút ($OD_{600}$ = 1,0) chứa $4,7x10^9$ CFU/mL. Sau đó dịch vi khuẩn được điều chỉnh về mật độ $10^7$ CFU/mL và cấy vào môi trường lên men với tỷ lệ tiếp giống là 1% (v/v) và lắc ở 30 ºC, 180 vòng/phút trong 5 ngày. Sau 5 ngày ủ, mẫu môi trường lên men được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút. Môi trường không chứa tế bào thu được đóng vai trò là chất phân tán sinh học thô, được xử lý bằng cách acid hóa đến độ pH 2,0 sử dụng HCl 6 N và để qua đêm ở 4 ºC để kết tủa hoàn toàn [12, 13]. Các mẫu kết tủa được ly tâm, rửa lại hai lần với đệm phosphate pH 7,2 và cân xác định khối lượng chất phân tán thô thu được.

*Phương pháp xác định hoạt tính phân tán dầu của chất phân tán sinh học*

Phương pháp được mô tả theo Nayarisseri và cộng sự [7] có cải tiến. 20 mL nước cất được thêm vào đĩa Petri, sau đó thêm 40 µL dầu thô lên bề mặt nước. Sau đó, nhỏ 20 µL môi trường không có tế bào lên bề mặt dầu thô. Đường kính của vùng trong trên bề mặt dầu được đo và so sánh với 20 µL nước cất làm đối chứng âm.

*Phương pháp đánh giá hoạt tính tan dầu của chất phân tán sinh học*

2 µL dầu thô được thêm vào các vùng giếng được phân định trên nắp của các đĩa 96 giếng và giữ cân bằng trong 1 giờ. Sau đó, thêm 5 µL môi trường không có tế bào vào bề mặt dầu. Hình thái giọt dầu được kiểm tra sau 1 phút. Kết quả được coi là dương tính đối với việc sản xuất chất phân tán sinh học khi giọt nước phẳng và những mẫu có giọt tròn được cho là âm tính, cho thấy không sản xuất chất phân tán sinh học [14].

*Phương pháp xác định chỉ số nhũ hóa ($E_{24}$) của chất phân tán sinh học*

Hoạt độ nhũ hóa được thực hiện theo Putri và cộng sự có sửa đổi [15]. 2 mL n-hexadecane và 2 mL môi trường không chứa tế bào được thêm vào ống nghiệm và xoáy ở tốc độ cao trong 2 phút. Hỗn hợp được đo sau 24 giờ. Hoạt độ nhũ hóa được tính toán bằng công thức sau:

$$E_{24}(\%) = \frac{\text{chiều cao của lớp nhũ hóa}}{\text{tổng chiều cao của lớp chất lỏng}} \times 100$$

*Phương pháp đo sức căng bề mặt*

Sức căng bề mặt được xác định ở nhiệt độ phòng bằng máy đo độ căng sử dụng phương pháp vòng bạch kim Du Noüy. Trước khi đo, máy đo độ căng phải được hiệu chuẩn bằng nước cất (71,20 mN/m). Khoảng 20 mL môi trường không chứa tế bào được chuyển vào cốc thủy tinh sạch và đặt lên bàn mẫu. Chiều cao của bể chứa mẫu được điều chỉnh sao cho vòng bạch kim treo trên móc cân bằng được ngâm dưới bề mặt chất lỏng của mẫu trong 15 phút để cân bằng rồi cẩn thận kéo lên. Cân vi lượng ghi lại lực tác dụng lên vòng trong khi kéo qua bề mặt chất lỏng. Khi vòng bạch kim rời khỏi mức chất lỏng, giá trị được hiển thị dưới dạng sức căng bề mặt của mẫu đó [4].

*Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sự hình thành mảng bám thông qua định lượng màng sinh học*

Định lượng khả năng sản sinh màng sinh học được thực hiện trên đĩa 96 giếng [16]. Vi khuẩn mảng bám được nuôi trên đĩa nhựa vô trùng 96 giếng ở 37 ºC, mỗi giếng chứa 250 µL dịch nuôi lỏng. Sau 24 giờ nuôi cấy, bổ sung thêm 50 µL chất phân tán thô thu nhận từ chủng S343 (nồng độ 0,25 g/mL được pha trong dung dịch đệm phosphate pH 7,2) và ủ ở 37 ºC trong vòng 48 giờ. Vi khuẩn không bám vào thành/đáy đĩa được rửa trôi bằng PBS 1X và màng sinh học được nhuộm bằng 300 µL dung dịch tím kết tinh 1% (w/v) trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Dung dịch tím kết tinh dư được rửa bằng nước, sau đó bổ sung 300 µL methanol và đo mật độ quang ở bước sóng 600 nm. Mẫu đối chứng không bổ sung chất phân tán sinh học. Sự ức chế khả năng hình thành mảng bám được đánh giá thông qua tỷ lệ % giá trị OD giảm so với mẫu đối chứng.

*Nghiên cứu các điều kiện sinh tổng hợp chất phân tán sinh học*

*Xác định thời gian lên men*

Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong 7 ngày ở 37 ºC, 180 vòng/phút, các mẫu nuôi cấy được lấy theo thời gian từ 2 ngày đến 7 ngày. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút. Môi trường nuôi cấy không chứa tế bào được sử dụng để kiểm tra một số hoạt tính chất phân tán thu nhận.

*Xác định pH và nhiệt độ*

Mức độ pH khác nhau được thực hiện bằng cách điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy thành các giá trị khác nhau từ pH 5 đến pH 9 bằng cách thêm acid hydrochloric (HCl) hoặc natri hydroxide (NaOH) ở nhiệt độ phòng. Nhiệt độ lên men được điều chỉnh theo 25, 30, 35, 40 ºC. Đặc tính chất phân tán sinh học tạo ra được xác định như mô tả trước đó.

*Xác định nguồn carbon và nitrogen*

Nguồn carbon 1% (w/v) (glucose, sucrose, glycerol, tinh bột tan, rỉ đường) và nguồn nitrogen 0,5% (w/v) (peptone, cao nấm men, khô đậu tương, urea) với tỷ lệ 1% (v/v) giống được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau lên men, đặc tính chất phân tán sinh học tạo ra được xác định như mô tả trước đó.

*Xác định chất cảm ứng*

Chất cảm ứng 1% (v/v) (dầu ăn, dầu oliu, tween 80) hoặc 0,05 g/L EDTA với tỷ lệ 1% (v/v) giống được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau lên men, đặc tính chất phân tán sinh học tạo ra được xác định như mô tả trước đó.

Các yếu tố khảo sát được chỉ ra trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Các yếu tố được xem xét để khảo sát khả năng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học

| Yếu tố khảo sát | | Phạm vi khảo sát |
|---|---|---|
| Thông số vật lý | Thời gian | 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày |
| | pH | 5, 6, 7, 8, 9 |
| | Nhiệt độ | 25, 30, 35, 40 ºC |
| Thông số hóa học | Nguồn Carbon (1% w/v) | Glucose, sucrose, glycerol, tinh bột tan, rỉ đường |
| | Nguồn Nitrogen (0,5% w/v) | Pepton, cao nấm men, khô đậu tương, urê |
| | Chất cảm ứng (1% v/v) | Dầu ăn, dầu oliu, tween 80, EDTA (0,05 g/L) |

## 3. Kết quả và thảo luận

### *3.1. Sinh tổng hợp chất phân tán sinh học từ chủng Bacillus subtilis S343*

Chủng *Bacillus subtilis* S343 ban đầu được nuôi cấy cho đánh giá sinh trưởng và sinh tổng hợp chất phân tán sinh học trên môi trường lên men chứa (g/L): $NH_4Cl$ 2, $KH_2PO_4$ 5, $Na_2HPO_4$ 4, $MnSO_4$ 0,2, $MgSO_4$ 0,2, $FeCl_3$ 0,05, $CaCl_2$ 0,001, dầu oliu 1% (v/v). Kết quả cho thấy, chất phân tán sinh học thu được với hàm lượng tủa là 6,07 g/L với khả năng phân tán dầu 18 - 24 mm. Dịch lên men bước đầu cho thấy khả năng nhũ hóa 26,67%, khả năng giảm biofilm đạt 25,17%. Điều này chứng tỏ chất phân tán sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* S343 bước đầu có tiềm năng ứng dụng trong xử lý mảng bám vi sinh tại các nhà máy sản xuất giấy bao bì công nghiệp. Kết quả phân tích của Sumiardi và cộng sự [3] cho thấy giá trị cao nhất của chỉ số nhũ hóa được tìm thấy trong tập đoàn vi khuẩn lên tới 95,75%. Kết quả khác cho thấy khả năng phân tán dầu của chất hoạt động bề mặt từ chủng *Pseudomonas guguanensis* Iraqi ZG.K.M với đường kính vòng tròn dịch chuyển dao động đến 77,66 ± 0,33 mm, khả năng nhũ hóa đến 64,66 ± 0,33% [4]. Để nâng cao hiệu quả sinh tổng hợp chất phân tán sinh học, nghiên cứu tiến hành tối ưu điều kiện và thành phần môi trường lên men phù hợp với chủng *Bacillus subtilis* S343.

### *3.2. Điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp chất phân tán sinh học*

*Ảnh hưởng của thời gian lên men*

Thời gian lên men cũng ảnh hưởng đáng kể đến quá trình sinh tổng hợp chất phân tán sinh học. Các vi sinh vật khác nhau tạo ra các chất phân tán sinh học trong các khoảng thời gian khác nhau. Chủng *Bacillus subtilis* S343 được khảo sát thời gian lên men trong 7 ngày để đánh giá khả năng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học (Bảng 2).

Bảng 2. Hoạt tính chất phân tán sinh học thu nhận theo thời gian

| Thời gian | pH sau lên men | Sinh khối ướt (g/L) | Khối lượng tủa (g/L) | Hoạt tính nhũ hóa (%) | Khả năng giảm biofilm (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 ngày | 6,69 | 5,15 ± 0,08 | 0 | - | 0 |
| 3 ngày | 6,78 | 5,27 ± 0,03 | 3,63 ± 0,13 | - | 0 |
| 4 ngày | 6,55 | 5,28 ± 0,05 | 4,39 ± 0,13 | - | 0 |
| 5 ngày | 6,77 | 5,38 ± 0,02 | 5,45 ± 0,09 | 26,67 ± 0,01 | 25,10 ± 0,33 |
| 6 ngày | 6,54 | 5,89 ± 0,10 | 6,37 ± 0,03 | 56,67 ± 0,22 | 46,17 ± 0,30 |
| 7 ngày | 5,58 | 5,76 ± 0,06 | 5,67 ± 0,05 | 50,00 ± 0,67 | 32,53 ± 0,74 |

*Ghi chú:* (-) không có hoạt tính.

Sau 6 ngày lên men, chất phân tán sinh học thu nhận từ chủng *Bacillus subtilis* S343 là 6,37 ± 0,03 g/L, có khả năng tạo vòng phân tán dầu dao động trong khoảng từ 19 đến 57,5 ± 0,33 mm, chỉ số nhũ hóa đạt 56,67 ± 0,22% và khả năng giảm mảng bám lên đến 46,17 ± 0,30%. Vì vậy, 6 ngày là thời gian thích hợp để sản xuất chất phân tán sinh học từ chủng *Bacillus subtilis* S343. Chủng S343 cũng sinh trưởng tốt nhất ở ngày thứ 6 với sinh khối ướt đạt 5,89 ± 0,10 g/L. Sản xuất chất phân tán sinh học tối đa bởi *Aspergillus ustus* đã được tìm thấy sau 5 ngày lên men, trong khi thời gian lên men của *C. bomicola* là 7, 8 và 11 ngày. Sản xuất chất phân tán sinh học tối đa bởi *C. bomicola* nuôi cấy trong mỡ động vật đã được tìm thấy sau 68 giờ lên men [17].

*Ảnh hưởng của nguồn carbon*

Các vi sinh vật tạo ra chất phân tán sinh học/chất hoạt động bề mặt sinh học thường là các vi sinh vật dị dưỡng, nhờ đó chúng tiêu thụ thành phần hữu cơ của nguồn carbon để phát

triển và tạo ra các chất chuyển hóa của chúng. Khoảng 30 – 40% tổng chi phí chỉ đến từ việc chuẩn bị môi trường tăng trưởng và sản xuất [18] để sản xuất chất phân tán sinh học, do đó đảm bảo nhu cầu về loại nguyên liệu rẻ hơn. Sinh khối và sự hình thành sản phẩm thường được kiểm soát bởi tốc độ tiêu thụ carbon của vi sinh vật trong quá trình canh tác [19]. Có ba loại nguồn carbon thường được sử dụng trong sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học: carbohydrate, dầu và chất béo, và các nhóm hydrocarbon [20]. Glucose, glycerol, saccarose, tinh bột tan, rỉ đường là những nguồn carbon được lựa chọn bổ sung vào môi trường để đánh giá khả năng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học của chủng *Bacillus subtilis* S343 (Bảng 3).

Bảng 3. Hoạt tính chất phân tán sinh học thu nhận từ các nguồn carbon khác nhau

| Nguồn carbon | pH sau lên men | Sinh khối ướt (g/L) | Khối lượng tủa (g/L) | Hoạt tính phân tán dầu (mm) | Hoạt tính tan dầu (s) | Hoạt tính nhũ hóa (%) | Khả năng giảm biofilm (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Không bổ sung | 6,13 | 5,86 ± 0,09 | 6,08 ± 0,81 | 21,0 ± 0,01 | - | 26,67 ± 0,02 | 25,18 ± 0,41 |
| Glucose | 4,68 | 8,62 ± 0,12 | 5,49 ± 0,23 | 33,0 ± 0,33 | - | 0 | 52,91 ± 0,52 |
| Glycerol | 4,67 | 8,64 ± 0,08 | 10,61± 0,05 | 32,5 ± 0,35 | 180 ± 0,02 | 0 | 44,81 ± 0,02 |
| Sucrose | 4,29 | 4,50 ± 0,02 | 8,55 ± 0,10 | 28,0 ± 0,33 | - | 0 | 28,21 ± 0,01 |
| Tinh bột tan | 5,82 | 13,34 ± 0,13 | 7,11 ± 0,69 | 56,0 ± 0,67 | - | 30,00 ± 0,11 | 58,72 ± 0,80 |
| Rỉ đường | 5,71 | 12,76 ± 0,13 | 4,17 ± 0,31 | 60,5 ± 0,23 | 180 ± 0,01 | 0 | 59,75 ± 0,83 |

*Ghi chú:* (-) không có hoạt tính.

Chủng S343 sinh trưởng tốt nhất trên môi trường bổ sung tinh bột tan và rỉ đường đạt sinh khối lướt lần lượt là 13,34 ± 0,13 g/L và 12,76 ± 0,13 g/L nhưng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học tốt nhất trên môi trường có bổ sung glycerol với hàm lượng tủa thô đạt 10,61 ± 0,05 g/L. Tuy nhiên, với môi trường bổ sung tinh bột tan, chất phân tán thu nhận có khả năng làm giảm biofilm đến 58,72 ± 0,80%, khả năng tạo vòng phân tán dầu có đường kính đạt 56,0 ± 0,67 mm và hoạt tính nhũ hóa đạt 30,00 ± 0,11%, hàm lượng chất phân tán sinh học đạt 7,11 ± 0,69 g/L. Trong một nghiên cứu khác, Ilori và cộng sự (2005) [21] đã xác định dầu diesel và dầu thô là nguồn carbon tốt nhất để sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học. Pepi và cộng sự [22] đã báo cáo một loài *Halomonas* sp. ANT-3b tạo ra các hợp chất nhũ hóa khi nuôi cấy trên n-hexadecane, nhưng không tạo ra trên môi trường khoáng bổ sung D-fructose. John và cộng sự [23] nghiên cứu chất hoạt động bề mặt sinh học của *Lysinibacillus fusiformis* trên các nồng độ nguồn carbon khác nhau. Trong số các nguồn carbon, tinh bột tan 40 g là thích hợp nhất cho *Lysinibacillus fusiformis* ($E_{24}$ 77,70 ± 0,50%, sức căng bề mặt 30,99 ± 0,18 mN/m và trọng lượng khô của tế bào 1,06 ± 0,05 g/L). Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng chủng *Bacillus subtilis* S343 có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học sử dụng tinh bột tan làm nguồn carbon.

*Ảnh hưởng của nguồn nitrogen*

Nitrogen cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật và sản xuất một số chất chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp. Amonia, muối amoni và urea là những nguồn nitrogen được sử dụng phổ biến nhất trong quá trình lên men. Amonia phục vụ mục đích kiểm soát độ pH. Các chất khác được sử dụng làm nguồn nitrogen là rượu ngâm ngô, bột đậu nành, bột đậu phộng, bột hạt bông, acid amin và protein [20]. Loại nitrogen tồn tại trong môi trường sản xuất sẽ ảnh hưởng đến chất phân tán sinh học bởi vi sinh vật. Chủng *Bacillus subtilis* S343 được lên men trong môi trường thích hợp có bổ sung 0,5% (w/v) nguồn nitrogen như peptone, cao nấm men, khô đậu tương và urea để đánh giá khả năng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học (Bảng 4).

Bảng 4. Hoạt tính chất phân tán sinh học thu nhận từ các nguồn nitrogen khác nhau

| Nguồn nitrogen | pH sau lên men | Sinh khối ướt (g/L) | Khối lượng tủa (g/L) | Hoạt tính phân tán dầu (mm) | Hoạt tính tan dầu (s) | Hoạt tính nhũ hóa (%) | Khả năng giảm biofilm (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MT (TBT) | 6,54 | 13,39 ± 0,14 | 7,11 ± 0,69 | 56,0 ± 0,67 | - | 30,00 ± 0,11 | 58,72 ± 0,80 |
| Peptone | 6,14 | 12,38 ± 0,13 | 6,62 ± 0,95 | 78,0 ± 1,00 | 20 ± 0,02 | 36,67 ± 0,97 | 44,06 ± 0,13 |
| Cao nấm men | 6,90 | 19,19 ± 0,05 | 18,48 ± 0,43 | 78,5 ± 0,33 | 10 ± 0,01 | 46,67 ± 0,33 | 65,95 ± 0,87 |
| Khô đậu tương | 5,79 | 19,99 ± 0,16 | 3,73 ± 0,29 | 73,5 ± 0,33 | - | 0 | 61,02 ± 0,06 |
| Urea | 8,42 | 12,07 ± 0,10 | 5,77 ± 0,94 | 71,5 ± 0,90 | - | 33,33 ± 0,22 | 25,80 ± 0,97 |

*Ghi chú:* (-) không có hoạt tính.

Chủng S343 sinh trưởng tốt trên môi trường có chứa khô đậu tương với hàm lượng sinh khối ướt đạt 19,99 ± 0,16 g/L, pH môi trường sau lên men dao động 5,36 - 8,42. Tuy nhiên, môi trường có bổ sung nguồn cao nấm men là môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp chất phân tán sinh học và giảm mảng bám của chủng *Bacillus subtilis* S343, với hàm lượng tủa 18,48 ± 0,43 g/L. Chủng *Bacillus subtilis* S343 có khả năng làm giảm mảng bám đạt 65,95 ± 0,87%, khả năng tạo vòng phân tán dầu có đường kính 78,5 ± 0,33 mm, khả năng làm tan dầu sau 10 giây tiếp xúc và có chỉ số nhũ hóa đạt 46,67 ± 1,33%. Cao nấm men đã được lựa chọn rộng rãi trong nhiều nghiên cứu. Ví dụ, *L. paracaseissp. paracasei* A20 ưu tiên sử dụng cao nấm men là yếu tố quan trọng nhất cho sự phát triển của vi khuẩn và tiếp theo là cao thịt, trong khi peptone dường như là yếu tố ít quan trọng nhất khi môi trường chứa hỗn hợp hai nguồn nitrogen khác nhau được sử dụng để sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học [24]. Ảnh hưởng của nồng độ nguồn nitrogen khác nhau đến việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học của *Lysinibacillus fusiformis* được trình bày trong nghiên cứu của John và cộng sự [23]. Trong số 3 nguồn nitrogen, 1,5 g urea cho giá trị cao nhất ($E_{24}$ 78,31 ± 0,87%, sức căng bề mặt 29,07 ± 1,42 mN/m và trọng lượng khô tế bào 0,95 ± 0,06 g/L), tiếp theo là chiết xuất nấm men [23].

*Ảnh hưởng của chất cảm ứng*

Chất cảm ứng là một hợp chất thúc đẩy quá trình tổng hợp sản phẩm mong muốn khi được thêm vào môi trường lên men sản xuất hoạt chất. Chất cảm ứng cho quá trình lên men chuyển hoá chất hoạt động bề mặt sinh học (chất phân tán) thường là các chất có chứa nhóm phân tử kỵ nước, như: dầu oliu - acid béo bão hòa và không bão hòa, protein và vitamin [25]. Trong nghiên cứu này, chủng *Bacillus subtilis* S343 được lên men trong môi trường thích hợp nguồn carbon là tinh bột tan và nitrogen là cao nấm men, có bổ sung các chất cảm ứng như dầu oliu, dầu ăn, EDTA và Tween 80 để đánh giá khả năng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học (Bảng 5).

Bảng 5. Hoạt tính chất phân tán sinh học thu nhận từ các chất cảm ứng khác nhau

| Chất cảm ứng | pH sau lên men | Sinh khối ướt (g/L) | Khối lượng tủa (g/L) | Hoạt tính phân tán dầu (mm) | Hoạt tính tan dầu (s) | Hoạt tính nhũ hóa (%) | Khả năng giảm biofilm (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Không bổ sung | 7,40 | 14,35 ± 0,22 | 16,82 ± 0,67 | 78,5 ± 0,33 | 4 ± 0,01 | 53,33 ± 0,89 | 37,61 ± 0,24 |
| Dầu oliu | 6,91 | 19,19 ± 0,05 | 18,48 ± 0,43 | 78,5 ± 0,33 | 10 ± 0,02 | 46,67 ± 0,33 | 65,95 ± 0,87 |
| Dầu ăn | 6,23 | 17,64 ± 0,18 | 18,38 ± 0,53 | 68,0 ± 0,67 | 3,5 ± 0,02 | 40,00 ± 0,01 | 31,80 ± 0,01 |
| EDTA | 6,95 | 19,08 ± 0,23 | 16,32 ± 0,12 | 83,0 ± 0,33 | 0 | 66,67 ± 0,02 | 59,33 ± 0,12 |
| Tween 80 | 6,62 | 19,42 ± 0,31 | 13,82 ± 0,64 | 73,5 ± 0,80 | 1 | 79,41 ± 0,96 | 24,47 ± 0,15 |

Chủng S343 sinh trưởng tốt trên môi trường bổ sung các chất cảm ứng, sinh khối đạt 17,64 ± 0,18 g/L đến 19,42 ± 0,31 g/L, pH dao động từ 6,23 đến 6,95. EDTA được xem chất cảm ứng thích hợp cho sinh tổng hợp chất phân tán sinh học của chủng *Bacillus subtilis* S343 trên môi trường có nguồn nitrogen là cao nấm men và nguồn carbon là tinh bột tan. Trên môi trường bổ sung nguồn cơ chất thích hợp, chủng *Bacillus subtilis* S343 có khả năng làm giảm mảng bám đạt 59,33 ± 0,12%, khả năng tạo vòng phân tán dầu có đường kính 83 ± 0,33 mm, có khả năng làm tan dầu ngay sau khi tiếp xúc và chỉ số nhũ hoá đạt 66,67 ± 0,02%. Chất cảm ứng sẽ được thêm vào cùng với nguồn carbon chính trong môi trường sản xuất, với lượng nhỏ hơn so với nguồn carbon được sử dụng, vừa đủ làm năng lượng ban đầu để thúc đẩy sự phát triển của vi sinh vật trong giai đoạn trễ. Trong nghiên cứu của Salam và cộng sự [26], chất cảm ứng hiệu quả nhất trong sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học là dầu oliu. Ví dụ, việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học được tăng cường thông qua quá trình phân hủy sinh học lindane (nguồn carbon) bởi nấm men *Basidiomycetes, Rhodotorula* sp. VITJzN03 với việc bổ sung 2% (v/v) dầu ô liu (chỉ số $E_{24}$ 78%) so với chỉ sử dụng lindane làm nguồn carbon (chỉ số $E_{24}$ 29%). Việc bổ sung dầu oliu làm tăng hiệu suất của chất hoạt động bề mặt sinh học lên 7 g/L. Trong nghiên cứu này, việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học đã được tăng cường do dầu oliu làm tăng tính kỵ nước của môi trường khoáng chất có chứa lindane [26]. Đối với nấm men *Aureobasidium thailandense* LB01, sản lượng chất hoạt động bề mặt sinh học cao nhất (139 mg/L) đạt được khi môi trường nuôi cấy chứa glucose (6 g/L) làm nguồn carbon và nước thải nhà máy dầu oliu (1,5% w/w) làm chất cảm ứng, cùng với chiết xuất nấm men (2 g/L) làm nguồn nitrogen được sử dụng sau 48 giờ canh tác khi so sánh với môi trường chứa glucose làm nguồn carbon duy nhất [27]. Wei và cộng sự [28] đã bổ sung muối kim loại vào môi trường nuôi cấy ($CuSO_4$, $MnSO_4$, $MgSO_4$, $CoSO_4$ và $NiSO_4$). $Mn^{2+}$ (0,01 mM) đã tăng cường sản xuất surfactin từ 0,33 lên 2,6 g/L. Sau đó, nhóm nghiên cứu tương tự đã sử dụng sắt để kích thích sự phát triển của *Bacillus subtilis* để sản xuất surfactin. Việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường muối khoáng chứa glucose (40 g/L) làm nguồn carbon chính, bổ sung $FeSO_4.7H_2O$ (thay đổi 0, 2, 5 và 10 mM) và phát hiện ra rằng sắt là chất cảm ứng ưa nước [28].

*Ảnh hưởng của pH*

Điều kiện pH môi trường có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình chuyển hóa các chất hoạt động bề mặt sinh học. Trong nghiên cứu này, chủng *Bacillus subtilis* S343 được lên men trong môi trường thích hợp có nguồn nitrogen là cao nấm men nguồn carbon là tinh bột tan, chất cảm ứng là EDTA ở các pH khác nhau từ 5 đến 9 (Bảng 6).

Bảng 6. Hoạt tính chất phân tán sinh học thu nhận từ pH môi trường khác nhau

| pH môi trường | pH sau lên men | Sinh khối ướt (g/L) | Khối lượng tủa (g/L) | Hoạt tính phân tán dầu (mm) | Hoạt tính tan dầu (s) | Hoạt tính nhũ hóa (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 5,99 | 14,16 ± 0,25 | 18,04 ± 0,24 | 70 ± 0,02 | 0 | 0 |
| 6 | 6,30 | 14,37 ± 0,32 | 23,29 ± 0,05 | 90 ± 0,04 | 0 | 0 |
| 7 | 7,26 | 14,53 ± 0,14 | 18,53 ± 0,06 | 80 ± 0,01 | 0 | 60 ± 0,01 |
| 8 | 7,68 | 13,17 ± 0,38 | 11,87 ± 0,56 | 80 ± 0,01 | 0 | 56,67 ± 0,22 |
| 9 | 7,81 | 12,07 ± 0,21 | 9,84 ± 0,11 | 75 ± 0,03 | 1 | 50 ± 0,66 |

Chủng S343 sinh trưởng khá đồng đều giữa các pH môi trường khác nhau. Hiệu suất chất phân tán sinh học cao nhất (23,29 ± 0,05 g/L) từ chủng *Bacillus subtilis* S343 xuất hiện ở pH 6 tương ứng với hoạt tính phân tán dầu đạt 90 ± 0,04 mm. Tuy nhiên, khi độ pH là 7, sản lượng chất phân tán sinh học giảm xuống 18,53 ± 0,06 g/L nhưng giá trị $E_{24}$ đạt 60 ± 0,01%. Khi độ pH là 5, 8 và 9, sản lượng chất phân tán sinh học giảm xuống lần lượt là 18,04 ± 0,24 g/L, 11,87 ± 0,56 g/L

và 9,84 ± 0,11 g/L. Hiệu suất cao hơn của các chất hoạt động bề mặt ở điều kiện trung tính có thể là do ảnh hưởng của quá trình ion hóa lên tính thấm của tế bào và số lượng hạt nhân điện tử của màng. Đã có báo cáo rằng việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học của *Streptomyces* sp. B3 cao nhất khi thiết lập độ pH lên men ban đầu ở mức 7–8, phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đó [29]. Trong nghiên cứu của Faisal và cộng sự [4], hoạt động phát triển tốt của vi khuẩn được ghi nhận ở các giá trị pH (6–10), nhưng việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học tốt nhất được ghi nhận ở các giá trị pH (6–8), sau đó là giảm năng suất chất hoạt động bề mặt sinh học. $E_{24}$ cao nhất (60 ± 0,33%) và sức căng bề mặt thấp nhất (49 ± 0,33 mN/m) được ghi nhận ở pH 7. Ở pH 5, vi khuẩn phát triển yếu, trong khi bị ức chế ở pH 4. Do đó, các thành phần của chất hoạt động bề mặt sinh học có thể được kết tủa ở giá trị pH thấp, điều này góp phần làm tăng kết quả đo sức căng bề mặt và giảm lượng $E_{24}$ [4]. Một kết quả tương tự cũng thu được đối với *P. guguanensis* D30 tạo ra chất hoạt động bề mặt sinh học cao nhất ở pH 7 [30]. Tuy nhiên, Fouda và cộng sự phát hiện ra rằng việc sản xuất rhamnolipid ở *P. aeruginosa* 4.2 được ghi nhận ở phạm vi pH 7-8 [31].

*Ảnh hưởng của nhiệt độ*

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển và sinh sản của vi sinh vật. Nhiệt độ lên men có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính enzyme và tốc độ phản ứng của chủng, từ đó ảnh hưởng đến khả năng trao đổi chất [8]. Nhiệt độ là thông số quan trọng nhất ảnh hưởng đến việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học, vì chỉ có thể đạt được hoạt tính enzyme tối đa ở nhiệt độ tối ưu [31]. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến việc sản xuất chất phân tán sinh học từ chủng *Bacillus subtilis* S343 được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Hoạt tính chất phân tán sinh học thu nhận từ nhiệt độ khác nhau

| Nhiệt độ (°C) | pH sau lên men | Sinh khối ướt (g/L) | Khối lượng tủa (g/L) | Hoạt tính phân tán dầu (mm) | Hoạt tính tan dầu (s) | Hoạt tính nhũ hóa (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 25 | 7,14 | 13,16 ± 0,15 | 12,55 ± 0,44 | 67,5 ± 0,16 | 1 | 60 ± 0,02 |
| 30 | 7,24 | 14,16 ± 0,23 | 13,59 ± 0,17 | 75,0 ± 0,01 | 1 | 60 ± 0,01 |
| 35 | 7,25 | 14,67 ± 0,04 | 18,95 ± 0,12 | 75,0 ± 0,01 | 1 | 60 ± 0,01 |
| 40 | 7,27 | 13,71 ± 0,18 | 18,48 ± 0,56 | 75,0 ± 0,33 | 1 | 60 ± 0,03 |

Các kết quả được trình bày trong Bảng 7 cho thấy khả năng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học của chủng *Bacillus subtilis* S343 ở phạm vi nhiệt độ rộng, bao gồm 25, 30, 35 và 40°C. Nhiệt độ thích hợp để sinh tổng hợp chất phân tán sinh học là 35 °C với hàm lượng chất phân tán thu được cao nhất 18,95 ± 0,12 g/L. Nhiệt độ tối ưu để sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học bởi *Pseudomonas* sp. CQ2 ở nhiệt độ 35 °C, thu được hiệu suất cao là 10,67 g/L và $E_{24}$ là 88,9%. Bởi vì tốc độ phản ứng nhanh nhất của *Pseudomonas* sp. CQ2 ở 35 °C, hiệu suất hoạt động bề mặt sinh học ở nhiệt độ trên hoặc dưới 35 °C giảm [8]. Tương tự, một nghiên cứu khác với một chủng khác có tên *Nocardiopsis* sp. B4 cho hiệu suất hoạt động bề mặt sinh học cao nhất ở 35 °C [32]. Pardhi và cộng sự phát hiện ra rằng 35 ± 2 °C là nhiệt độ tốt nhất cần thiết để sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học từ *P. guguanensis* D30 [30]. Tuy nhiên, chủng *P. guguanensis* ZG.K.M ở Iraq phát triển và sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học tối ưu ở 30 °C với $E_{24}$ cao nhất (60 ± 0,33%) và sức căng bề mặt thấp nhất 50 ± 0,33 mN/m. Vi khuẩn không thể phát triển ở nhiệt độ 10, 15, 45 và 50 °C [4]. Những kết quả này phù hợp với Ramya Devi và cộng sự [33], họ đã sử dụng 30 °C làm nhiệt độ tối ưu để sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học bởi *P. guganensis*.

Trong môi trường lên men thích hợp (pH 7) chứa tinh bột tan (1% w/v), cao nấm men (0,5% w/v) và EDTA (0,05 g/L) và ủ trong điều kiện lắc ở 35 °C trong 6 ngày, chất phân tán sinh học tạo ra từ chủng *Bacillus subtilis* S343 là 18,90 g/L với hoạt tính phân tán dầu là

75 mm; hoạt tính tan dầu là 1 giây và hoạt tính nhũ hoá đạt 60%. Chất phân tán có khả năng giảm sức căng bề mặt xuống 30,92 ± 2,0 so với mẫu nước là 71,2 mN/m. Trong nghiên cứu của Faisal và cộng sự [4], sau khi tối ưu hóa các điều kiện tăng trưởng, môi trường MSM (pH 7) chứa dầu mè (4% v/v), $NH_4NO_3$ (1% w/v) và NaCl (1% w/v) và ủ trong điều kiện lắc ở 35 °C trong 96 giờ có thể tối đa hóa việc sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học. Các chất hoạt động bề mặt sinh học được chiết xuất có hoạt tính bề mặt cao (38 ± 0,33 mN/m) và hoạt động nhũ hóa (52 ± 0,33%) [4]. Hình ảnh về hoạt tính chất phân tán sinh học từ *Bacillus subtilis* S343 trong môi trường và điều kiện lên men thích hợp được thể hiện trong Hình 1.

Hình 1. Hoạt tính chất phân tán sinh học từ *Bacillus subtilis* S343 trong môi trường và điều kiện lên men thích hợp. (a) Hoạt tính phân tán dầu; (b) Hoạt tính tan dầu; (c) Chỉ số nhũ hóa $E_{24}$.

## 4. Kết luận

Chủng *Bacillus subtilis* S343, được phân lập từ cây dương xỉ, là một trong những chủng sinh tổng hợp chất phân tán sinh học hiệu quả được lựa chọn để nghiên cứu. Các yếu tố dinh dưỡng và điều kiện tăng trưởng có ảnh hưởng đáng kể đến năng suất của chất phân tán sinh học. Do đó, lựa chọn các điều kiện tăng trưởng, môi trường lên men (pH 7) chứa tinh bột tan (1% w/v), cao nấm men (0,5% w/v) và EDTA (0,05 g/L) và ủ trong điều kiện lắc ở 35 °C trong 6 ngày có thể tối đa việc sinh tổng hợp chất phân tán sinh học. Với kết quả trên, chủng *Bacillus subtilis* S343 có tiềm năng sự dụng để sản xuất chất phân tán bề mặt sinh học thân thiện với môi trường ở quy mô lớn hơn để áp dụng vào thực tiễn.

## Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài "Nghiên cứu tạo chế phẩm phân tán sinh học ứng dụng cho xử lý mảng bám vi sinh trong dây chuyền sản xuất giấy bao bì công nghiệp". Mã số: ĐTKHCN.016/22.

## Tài liệu tham khảo

[1] A. K. Mukherjee, K. Das, Microbial Surfactants and Their Potential Applications: An Overview, in: R. Sen (Eds.), Biosurfactants, Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 672, 2010, pp. 54-64, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_4.

[2] E. M. D. Oliveira, V. H. G. Sales, M. S. Andrade, J. E. Zilli, W. L. Borges, T. M. D. Souza, Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria from Amapaense Amazon soils, International Journal of Microbiology, 2021, pp. 11, https://doi.org/10.1155/2021/9959550.

[3] A. Sumiardi, E. S. Soetarto, D. Susilaningsih, Screening and Characterization of Biosurfactant Produced by Bacterial Consortium in Degrading Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compound, AIP Conference Proceedings, AIP Publishing, 2018, https://doi.org/10.1063/1.5050097.

[4] Z. G. Faisal, M. S. Mahdi, K. H. Alobaidi, Optimization and Chemical Characterization of Biosurfactant Produced from a

Novel *Pseudomonas guguanensis* Strain Iraqi ZG.K.M, International Journal of Microbiology, 2023, pp. 16, https://doi.org/10.1155/2023/1571991.

[5] I. C. Mendoza, M. V. Vasquez, P. Aguayo, D. C. Montoya, L. Plaza, M. R. Peña, A. M. Marqués, J. C. León, Biosurfactant from *Bacillus subtilis* DS03: Properties and Application in Cleaning Out Place System in a Pilot Sausages Processing, Microorganisms, Vol. 10, No. 8, 2022, pp. 1518, https://doi.org/10.3390/microorganisms10081518.

[6] A. De Giani, J. Zampolli, P. Di Gennaro, Recent Trends on Biosurfactants with Antimicrobial Activity Produced by Bacteria Associated with Human Health: Different Perspectives on Their Properties, Challenges, and Potential Applications, Frontiers in Microbiology, Vol. 12, 2021, pp. 665150, https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655150.

[7] A. Nayarisseri, P. Singh, S. K. Singh, Screening, Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing *Bacillus tequilensis* Strain ANSKLAB04 from Brackish River Water, International Journal of Environmental Science and Technology, Vol. 16, No. 11, 2019, pp. 7103-7112, https://doi.org/10.1007/s13762-018-2089-9.

[8] W. Sun, B. Zhu, F. Yang, M. Dai, S. Sehar, C. Peng, I. Ali, I. Naz, Optimization of Biosurfactant Production from *Pseudomonas* sp. CQ2 and Its Application for Remediation of Heavy Metal Contaminated Soil, Chemosphere, Vol. 265, 2020, pp.129090, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129090.

[9] A. M. Shete, G. Wadhawa, I. M. Banat, B. A. Chopade, Mapping of Patents on Bioemulsifier and Biosurfactant: A Review, Journal of Scientific and Industrial Research, Vol. 65, No. 2, 2006, pp. 91-115.

[10] A. R. Najafi, M. R. Rahimpour, A. H. Jahanmiri, R. Roostaazad, D. Arabian, Z. Ghobadi, Enhancing Biosurfactant Production from an Indigenous Strain of *Bacillus mycoides* by Optimizing The Growth Conditions Using a Response Surface Methodology, Chemical Engineering Journal, Vol. 163, No. 3, 2010, pp. 188-194, https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.06.044.

[11] L. T. Tra, D. T. Nhung, P. T. H. Thao, T. T. Huong, N. T. H. Lien, N. V. Hieu, N. K. B. Tam, Study on the Ability to Produce Biodispersant by Bacterial Strain S343 Isolated from Fern, Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology, Vol. 01, No. 152, 2024, pp. 70-77 (in Vietnamese).

[12] S. O. Adebajo, P. O. Akintokun, A. E. Ojo, A. K. Akintokun, O. A. Badmos, Recovery of Biosurfactant Using Different Extraction Solvent by Rhizospheric Bacteria Isolated from Rice-Husk and Poultry Waste Biochar-Amended Soil, Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences, Vol. 7, No. 1, 2020, pp. 252-266, https://doi.org/10.1080/2314808X.2020.1797377.

[13] F. Nazari, N. Safaie, B. M. Soltani, M. S. Bakhsh, M. Sharifi, The Effect of Environmental Factors on Surfactin Production of *Bacillus subtilis*, Journal of Crop Protection, Vol. 6, No. 1, 2017, pp. 89-97.

[14] N. H. Youssef, K. E. Duncan, D. P. Nagle, K. N. Savage, R. M. Knapp, M. J. McInerney, Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms, Journal of Microbiological Methods, Vol. 56, No. 3, 2004, pp. 339-347, https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001.

[15] M. Putri, R. Hertadi, Effect of Glycerol as Carbon Source for Biosurfactant Production by Halophilic Bacteria *Pseudomonas stutzeri* BK-AB12. Procedia Chemistry, Vol. 16, 2015, pp. 321-327, https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.059.

[16] S. Stepanović, D. Vuković, V. Hola, G. D. Bonaventura, S. Djukić, I. Ćirković, F. Ruzicka, Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by *Staphylococci*, Apmis, Vol. 115, No. 8, 2007, pp. 891-899, https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.

[17] D. K. F. Santos, R. D. Rufino, J. M. Luna, V. A. Santos, L. A. Sarubbo, Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century, International Journal of Molecular Sciences, Vol. 17, No. 3, 2016, pp. 401, https://doi.org/10.3390/ijms17030401.

[18] S. George, K. Jayachandran, Production and Characterization of Rhamnolipid Biosurfactant from Waste Frying Coconut Oil Using a Novel *Pseudomonas aeruginosad* D. Journal of Applied Microbiology, Vol. 114, No. 2, 2013, pp. 373-383, https://doi.org/10.1111/jam.12069.

[19] V. Singh, S. Haque, R. Niwas, A. Srivastava, M. Pasupuleti, C. K. M. Tripathi, Strategies for Fermentation Medium Optimization: an In-Depth Review, Frontiers in Microbiology, Vol. 7, 2017, pp. 1-16, https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087.

[20] P. S. Bisen, A. Sharma, Fermentation, in: Introduction to Instrumentation in Life Sciences. Crc Press, 2012, pp. 249-306.

[21] M. O. Ilori, C. J. Amobi, A. C. Odocha, Factors Affecting Biosurfactant Production by Oil Degrading *Aeromonas* spp. Isolated from a Tropical Environment, Chemosphere, Vol. 61, No. 7, 2005, pp. 985-992, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.066.

[22] M. Pepi, A. Cesàro, G. Liut, F. Baldi, An Antarctic Psychrotrophic Bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, Growing on n-Hexadecane, Produces a New Emulsyfying Glycolipid. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 53, No. 1, 2005, pp. 157-166, https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.09.013.

[23] W. C. John, I. O. Ogbonna, G. M. Gberikon, C. C. Iheukwumere, Evaluation of Biosurfactant Production Potential of *Lysinibacillus fusiformis* MK559526 Isolated from Automobile-Mechanic-Workshop Soil, Brazilian Journal of Microbiology, Vol. 52, No. 2, 2021, pp. 663-674. https://doi.org/10.1007/s42770-021-00432-3.

[24] E. J. Gudiña, J. A. Teixeira, L. R. Rodrigues, Biosurfactant-Producing *Lactobacilli*: Screening, Production Profiles, and Effect of Medium Composition, Applied and Environmental Soil Science, Vol. 2011, 2011, pp. 1-9, https://doi.org/10.1155/2011/201254.

[25] V. K. de O. Schmidt, J. de S. Carvalho, D. de Oliveira, C. J. de Andrade, Biosurfactant Inducers for Enhanced Production of Surfactin and Rhamnolipids: An Overview, World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 37, No. 21, 2021, https://doi.org/10.1007/s11274-020-02970-8.

[26] J. A. Salam, N. D. Nilanjana Das, Induced Biosurfactant Production and Degradation of Lindane by Soil Basidiomycetes Yeast, *Rhodotorula* sp. VITJzN03, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, Vol. 4, No. 4, 2013, pp. 664-670.

[27] D. P. Meneses, E. J. Gudiña, F. Fernandes, L. R. B. Gonçalves, L. R. Rodrigues, S. Rodrigues, The Yeast-Like Fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 Produces a New Biosurfactant Using Olive Oil Mill Wastewater as an Inducer, Microbiological Research, Vol. 204, 2017, pp. 40-47, https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.07.004.

[28] Y. H. Wei, L. F. Wang, J. S. Changy, S. S. Kung, Identification of Induced Acidification in Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* During Biosurfactant Fermentation, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 96, No. 2, 2003, pp. 174-178, https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90121-6.

[29] A. Khopade, B. Ren, X. Y. Liu, K. Mahadik, L. Zhang, C. Kokare, Production and Characterization of Biosurfactant from Marine *Streptomyces* Species B3, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 367, No. 1, 2012, pp. 311-318, https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.009.

[30] D. Pardhi, R. Panchal, K. Rajput, Screening of Biosurfactant Producing Bacteria and Optimization of Production Conditions for *Pseudomonas guguanensis* D30. Bioscience Biotechnology Research Communications, Vol. 13, No. 1, 2020, pp. 170-179.

[31] A. Fouda, M. S. E. Gamal, E. H. A. Shakour, A. A. Radwan, Optimization and Improvement of Biosurfactant Production for *Pseudomonas aeruginosa* 4.2 and *Bacillus cereus* 2.3 Strains Isolated from Oily Polluted Soil Sample, International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, Vol. 3, No. 1, 2016, pp. 76-87.

[32] A. Khopade, R. Biao, X. Liu, K. Mahadik, L. Zhang, C. Kokare, Production and Stability Studies of the Biosurfactant Isolated from Marine *Nocardiopsis* sp. B4. Desalination, Vol. 285, 2012, pp. 198-204, https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.10.002.

[33] K. C. Ramya Devi, R. L. Sundaram, S. Vajiravelu, V. Vasudevan, G. K. Mary Elizabeth, Structure Elucidation and Proposed De Novo Synthesis of an Unusual Mono-Rhamnolipid by *Pseudomonas guguanensis* from Chennai Port Area, Scientific Reports, Vol. 9, No. 1, 2019, pp. 1-11, https://doi.org/10.1038/s41598-019-42045-9.