

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHẤT KHÁNG KHUẨN TỪ TÔM NƯỚC MẶN VÙNG BIỂN NAM ĐỊNH

Hồ Tuấn Anh^{1,*}, Bùi Thị Hương Giang²,

Ngô Thu Thủy², Vũ Văn Hạnh³

TÓM TẮT

Nghiên cứu có mục tiêu tuyển chọn chủng vi khuẩn bản địa từ vùng biển tỉnh Nam Định với khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn ức chế một số vi khuẩn gây bệnh trên tôm và khả năng sinh tổng hợp enzym ngoại bào nhằm định hướng sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản. Từ 10 mẫu tôm thu thập tại các ao nuôi tôm nước mặn và cảng biển thủy sản của huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định đã phân lập được 50 khuẩn lạc đặc trưng, thuần khiết. Bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, quá trình tuyển chọn đã xác định được chủng N1.4 có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất kháng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio harveyi* CN18, *Vibrio parahaemolyticus* VTCC 910192 với đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 12, 11, 12 mm. Chủng N1.4 cũng được chứng minh là có khả năng sinh tổng hợp enzym ngoại bào cao nhất gồm amylase, cellulase, protease với vòng thủy phân tương ứng là 30, 29 và 24 mm. Đánh giá một số đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của chủng tuyển chọn kết hợp sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để định danh đã xác định được rằng, chủng chọn lọc N1.4 có độ tương đồng cao (99,85%) so với loài *Bacillus subtilis*.

Từ khóa: *Bacillus*, chất kháng khuẩn, phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, tôm, vi sinh vật kiểm định.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, toàn tỉnh Nam Định có 75 vùng nuôi trồng thủy sản tập trung với diện tích khoảng 7.000 ha và có trên 6.000 hộ chăn nuôi ở cả khu vực nước mặn, nước lợ và nước ngọt. Phương thức nuôi chuyển từ quảng canh sang thâm canh và siêu thâm canh, áp dụng theo quy trình VietGAP, nuôi công nghệ cao. Bên cạnh các thủy sản nuôi trồng truyền thống, những năm qua tỉnh đặc biệt coi trọng phát triển một số loại hải sản, trong đó có tôm thẻ chân trắng [1]. Trong đầm nuôi tôm tồn tại nhiều loài vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*. Trong khoảng thời gian gần đây

ngành nuôi tôm đang đối mặt với nhiều dịch bệnh. Đáng quan tâm nhất là hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính hay còn gọi là hội chứng chết sớm (early mortality syndrome - EMS) do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* [2]. Trong ngành nuôi trồng thủy sản, việc lạm dụng thuốc kháng sinh nhằm kiểm soát các vi khuẩn gây bệnh đã gây ra hiện tượng kháng thuốc và tích tụ dư lượng thuốc kháng sinh trong tôm thành phẩm, gây nguy hại cho sức khỏe động vật và người tiêu dùng [3]. Các nước thuộc Liên minh châu Âu đã cấm hoàn toàn việc sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi [4]. Việc tìm kiếm các sản phẩm sinh học với tính kháng sinh và tăng cường miễn dịch có nguồn gốc tự nhiên đang trở nên rất cần thiết.

Một số chất kháng khuẩn có nguồn gốc từ một số vi khuẩn được gọi là bacteriocin - các peptide hoặc protein được tổng hợp từ riboxom của vi khuẩn, có khả năng ức chế các vi sinh vật khác. Với đặc tính có nguồn gốc tự nhiên, đa dạng về cấu trúc, chức năng và bền nhiệt, bacteriocin

¹ Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp

* Email: htanh@uneti.edu.vn

² Viện Khoa học Sức khỏe Động vật và Môi trường (IAES)

³ Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

trở thành một trong những vũ khí giúp chống lại vi sinh vật gây bệnh. Mặt khác, một số bacteriocin còn có khả năng ức chế đặc hiệu các vi khuẩn đa kháng thuốc kháng sinh giúp chúng trở thành một sự lựa chọn vô cùng tiềm năng để phát triển thành chất kháng sinh thế hệ mới [5]. Trên thực tế, bacteriocin được vi khuẩn sinh tổng hợp khi gặp các bất lợi về điều kiện sống hoặc khi bị cạnh tranh nguồn thức ăn và không gian sống bởi các vi sinh vật khác trong cùng ổ sinh thái [6]. Phần lớn bacteriocin được tổng hợp bởi vi khuẩn Gram dương, tập trung ở các chi *Bacillus* và vi khuẩn lactic, một số lượng bacteriocin nhỏ hơn được thu nhận từ vi khuẩn Gram âm, chủ yếu thuộc các chi *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* [7]. Một số chủng vi khuẩn biển sinh chất kháng khuẩn có thể thay thế kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản, chẳng hạn các chủng sinh bacteriocin thuộc chi *Bacillus* không những ức chế được vi khuẩn Gram dương mà còn ức chế được rất nhiều vi khuẩn Gram âm là các tác nhân gây bệnh chính trên thủy sản [8].

Trong thủy sản, vi sinh vật có khả năng tạo ra các enzym ngoại bào hỗ trợ tiêu hóa có thể được ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học chứa probiotics hoặc sản xuất các chế phẩm phân bón vi sinh và các chế phẩm khác trong xử lý ô nhiễm môi trường [9, 10]. Phân lập chủng vi khuẩn bản địa có khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn và enzym ngoại bào, an toàn sinh học (Generally regarded as safe – GRAS) có nhiều ý nghĩa ứng dụng nhằm nâng cao sản lượng và chất lượng tôm của địa phương.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Các mẫu ruột tôm từ vùng biển và ao nuôi của huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định được sử dụng để phân lập chủng vi khuẩn cho nghiên cứu.

- Các chủng vi sinh vật kiểm định được lấy từ bộ sưu tập các chủng của Phòng Các chất chức năng sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, bao gồm: *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio harveyi* CN18, *Vibrio parahaemolyticus* VTCC 910192.

2.2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

- Môi trường phân lập: Môi trường Luria - Bertani (LB - agar): peptone 10 g, cao nấm men 5 g, NaCl 5 g, agar 20 g, pH 7, nước cất vừa đủ 1 lít.

- Môi trường LB - agar có bổ sung các cơ chất tinh bột (0,2%, w/v), hoặc carboxymethyl cellulose (CMC) (0,2%, w/v) hoặc casein (0,2%, w/v) được sử dụng trong nghiên cứu hoạt tính của các enzym ngoại bào tương ứng là amylase, cellulase, protease.

- Hoá chất: Kit E.Z.N.A.® Bacterial của Hãng OMEGA, Master Mix (Invitrogen, Mỹ).

2.3. Phương pháp nghiên cứu và kỹ thuật sử dụng

2.3.1. Phương pháp phân lập, làm thuần chủng và tuyển chọn vi sinh vật

- Phân lập và làm thuần chủng vi khuẩn từ các mẫu tôm

Tiến hành mổ tách lấy ruột của tôm nước mặn, nghiền nhỏ mẫu và cho vào ống falcon có chứa nước muối sinh lý 0,9%. Mẫu được pha loãng theo dãy tới hạn đến 10^6 , hút 100 μ l dịch ở 3 hệ số pha loãng 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} cấy trang trên môi trường LB - agar và bọc kín, ủ ở 37°C . Sau 48 giờ tiến hành quan sát các khuẩn lạc, chọn khuẩn lạc đặc trưng của vi khuẩn và tiếp tục làm thuần bằng cách cấy ria trên môi trường LB - agar cho tới khi quan sát thấy chỉ có một dạng khuẩn lạc đồng nhất. Các khuẩn lạc riêng rẽ được nhặt ra để kiểm tra hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh kiểm định và khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào.

- Phương pháp xác định hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn kiểm định

Khả năng ức chế các chủng vi khuẩn gây bệnh *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio harveyi* CN18, *Vibrio parahaemolyticus* VTCC 910192 của chủng vi khuẩn phân lập được thực hiện theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy trong môi trường cơ bản LB, nuôi lắc 200 vòng/phút, pH = 7, 37°C , 48 giờ. Hút dịch nuôi vi khuẩn ra ống ependoff đem đi ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút để thu dịch nổi.

Các vi khuẩn gây bệnh kiểm định được nuôi trong môi trường LB lỏng 24 giờ, 37°C, lắc 200 vòng/phút, đạt mật độ khoảng 10^8 CFU/ml. Sau đó tiến hành hút 100 μ l và cấy trang trên môi trường LB-agar. Để khô tự nhiên, tiến hành khoan lỗ thạch, kích thước lỗ thạch ($d = 6$ mm).

Nhỏ 30 μ l dịch nổi vào mỗi giếng. Đặt đĩa thạch trong tủ lạnh ở 4°C khoảng 2 giờ để dịch nổi khuếch tán đều vào trong thạch và sau đó ủ ở 37°C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá bằng hiệu số D - d (mm). Trong đó: D là đường kính vòng kháng khuẩn, d là đường kính lỗ thạch (mm). Đối chứng dương (Positive control - PC) là giếng có bổ sung 30 μ l 0,1 g/L Streptomycin.

- *Phương pháp thử hoạt tính enzym ngoại bào (amylase, cellulase, protease)*

Hoạt tính enzym ngoại bào được đánh giá bằng phương pháp đục lỗ thạch trên nền môi trường LB-agar có chứa cơ chất đặc hiệu như tinh bột, CMC và casein tương ứng với các enzym amylase, cellulase, protease. Dịch nổi (30 μ l) được cho vào giếng đục trên đĩa thạch, đặt đĩa thạch trong tủ lạnh ở 40°C khoảng 2 giờ để khuếch tán đều vào trong thạch, sau đó ủ qua đêm ở 37°C và nhuộm màu bề mặt đĩa petri, đo kích thước $\Delta = D - d$ (mm), trong đó D là đường kính vòng thủy phân cơ chất của enzyme, d là đường kính giếng đục trên đĩa thạch (6 mm).

2.3.2. Xác định các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa

Khuẩn lạc vi khuẩn được quan sát bằng mắt thường, hình thái tế bào vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X. Hình dạng rìa mép của khuẩn lạc phản ánh khả năng di động của tế bào. Đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram, khả năng hình thành bào tử được xác định theo cách quan sát trên kính hiển vi sau sốc nhiệt ở 60°C, hoạt tính catalase được xác định dựa trên khả năng phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 (làm sủi bọt khuẩn lạc).

2.3.3. Định danh chủng vi sinh vật

Phương pháp tách ADN thực hiện theo hướng dẫn trong Kit E.Z.N.A.® Bacterial của Hãng OMEGA, Master Mix (Invitrogen, Mỹ). Chủng vi

khuẩn được hoạt hóa trên môi trường thạch LB, sau đó được nuôi ở 37°C trong 48 giờ, thu được các khuẩn lạc riêng rẽ. Các khuẩn lạc được lên men lỏng trong bình tam giác 250 ml có chứa 50 ml môi trường LB lỏng ở 37°C, lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ, ly tâm thu tế bào và tiến hành tách chiết ADN theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) [11]. Khuếch đại gen 16S rRNA sử dụng cặp mồi 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', gen đích vùng V1 và 1492R 5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3', gen đích vùng V9 và đọc trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn chọn lọc. Trình tự ADN vùng ITS được đọc trực tiếp trên thiết bị đọc trình tự tự động ABI 3100 Avant (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự nucleotid của các chủng nghiên cứu được so sánh với các trình tự đã công bố trên GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Quá trình so sánh trình tự gen và xử lý số liệu sử dụng phần mềm CLUSTAL X ver. 1.83.

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Minitab 18.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn

Mẫu tôm được thu thập tại khu vực cập cảng đánh bắt cá của huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định và các ao nuôi nước mặn. Từ 10 mẫu ruột tôm đã phân lập được 50 khuẩn lạc đặc trưng, thuần khiết. Khả năng kháng khuẩn của các chủng phân lập được từ ruột tôm được xác định dựa trên kích thước vòng ức chế đối với các vi sinh vật gây bệnh. Kết quả thu được cho thấy, sau 48 giờ nuôi cấy trong môi trường cơ bản LB, không có chủng phân lập nào cho khả năng kháng vi khuẩn *E. coli*. Có 31/50 chủng không có khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn, 19/50 chủng phân lập cho khả năng kháng từ 1 - 3 chủng vi khuẩn kiểm định. Không có chủng nào cho khả năng kháng cả 4 chủng vi khuẩn kiểm định. Có 7/50 chủng có khả năng ức chế *Vibrio parahaemolyticus* và 19/50 chủng có khả năng kháng *S. aureus*. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của một số chủng điển hình nhất từ các thí nghiệm đã tiến hành được trình bày trong bảng 1 và hình 1.

Khả năng sinh tổng hợp enzym ngoại bào phân lập điển hình được trình bày trong bảng 2. amylase, cellulase, protease của một số chủng

Bảng 2. Khả năng sinh tổng hợp enzym ngoại bào của một số chủng phân lập

TT	Kí hiệu chủng	Nguồn phân lập	Khả năng sinh tổng hợp enzym ngoại bào $\Delta = D - d$ (mm)		
			Amylase	Cellulase	Protease
1	N1.4	Ao nuôi tôm nước mặn, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định	30±0,71 ^a	29±0,71 ^a	24±0,71 ^a
2	N1.5	Ao nuôi tôm nước mặn, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định	13±0,00 ^d	27±0,71 ^{ab}	5±0,00 ^{bc}
3	N3.5	Ao nuôi tôm nước mặn, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định	23±0,71 ^b	25±0,71 ^{bc}	3±0,71 ^c
4	N3.6	Ao nuôi tôm nước mặn, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định	17±0,00 ^c	25±0,00 ^{bc}	3±0,00 ^c
5	BN4.5	Biển, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định	23±0,71 ^b	23±0,00 ^c	6±0,71 ^b

Ghi chú: a, b, c... là các ký tự khác nhau ở cùng một cột thể hiện sự khác biệt với độ tin cậy $p < 0,05$

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, chủng N1.4 có khả năng sinh tổng hợp 3 loại enzym ngoại bào nổi trội hơn so với các chủng còn lại. Đường kính vòng thủy phân cơ chất tinh bột, CMC, casein của chủng N1.4 tương ứng là 30, 29 và 24 mm. Kết quả đạt được trong nghiên cứu của Huỳnh Thị Cẩm Tiên và Hồ Viết Thế (2019) [9] cho thấy, một số chủng vi sinh vật đất nổi trội hơn so với chủng tuyển chọn N1.4 về hoạt tính phân giải CMC, casein. Trong một nghiên cứu về khả năng sinh enzym ngoại bào trên một số chủng vi khuẩn lactic, Vũ Quỳnh Hương và cs (2022) [12] đã xác định được đường kính vòng phân giải ở mức 5,0 - 7,2 mm, chủng N1.4 có $\Delta = D - d$ vượt trội hơn đáng kể.

Đánh giá theo các tiêu chí về khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn và enzym ngoại bào, chủng N1.4 được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Nghiên cứu xác định một số đặc tính sinh học của chủng N1.4

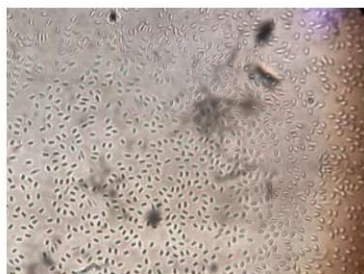
Hình thái khuẩn lạc, hình dạng và kích thước tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi và một số đặc điểm sinh học khác của chủng N1.4 được trình bày trên hình 2 và bảng 3.

Hình dạng rìa mép khuẩn lạc có răng cưa là đặc điểm để nhận biết khả năng di động của tế bào. Kết quả quan sát được trên kính hiển vi khi nhuộm Gram cho thấy, tế bào bắt màu tím là đặc điểm của vi khuẩn Gram dương.

Khuẩn lạc



Tế bào



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng N1.4

Bảng 3. Một số đặc điểm sinh học của chủng N1.4

Đặc điểm	Chủng vi khuẩn N1.4
Hình dạng tế bào	Tế bào hình que ngắn
Sắp xếp tế bào	Đơn lẻ
Nhuộm màu Gram	Gram dương (+)
Hình dạng khuẩn lạc	Khuẩn lạc màu trắng sữa, mép răng cưa không đều, đường kính 3-5 mm
Khả năng di động	+
Khả năng hình thành bào tử	+
Hoạt tính catalase	+

Kết quả thu nhận được trong bảng 3 cho thấy, chủng N1.4 có những đặc điểm hình thái, đặc tính sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*.

3.3. Định danh đến loài chủng vi sinh vật được tuyển chọn

Tiếp tục định danh đến loài chủng vi khuẩn tuyển chọn thông qua kỹ thuật tách dòng và giải trình tự 16S-rRNA, trình tự đoạn gen của chủng vi khuẩn chọn lọc N1.4 được trình bày trên hình 3.

```
ACGATGATCGCGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGG
GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTAC
CACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGATTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGA
CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG
CCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCAGGCTAACTACGTGCAGCAGCCGCGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTAAAGCCCCGG
CTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGGGAACCTGAGTGCGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAT
GCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGC
TGACAGCTAACCGATTAAGCACTCGGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCTGACAATCTAGAGA
TAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGTGACTGCCGGTGACAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCA
GCGAAACCGCGAGGTTAAGCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATACACACCGCCGTCACACCACGAG
AGTTTGTAACCTCCGAAGTC (N1.4)
```

Hình 3. Trình tự đoạn gen của rARN 16S của chủng vi khuẩn chọn lọc N1.4

Từ đoạn trình tự được giải mã của chủng N1.4 trên, tiến hành tìm kiếm những trình tự nucleotide của các chủng tương đồng với trình tự của chủng N1.4 trên website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> để xây dựng cây phân loại, nhằm so sánh và tìm ra nguồn gốc của chủng chọn lọc N1.4. Cây phân loại được lập dựa vào phần mềm là Mega và FlnchTV.

Sự tương đồng về trình tự nucleotide của N1.4 và 13 trình tự nucleotide được tải về từ Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) và mối quan hệ về mặt nguồn gốc phát sinh của N1.4 với 13 chủng vi khuẩn đó được thể hiện trong hình 4.

Căn cứ vào cây phân loại và bảng so sánh mức độ tương đồng về trình tự nucleotide của chủng vi sinh vật N1.4 và trình tự gen của 13 chủng vi khuẩn *Bacillus* (trên Genbank) đã được biết trình tự sau:

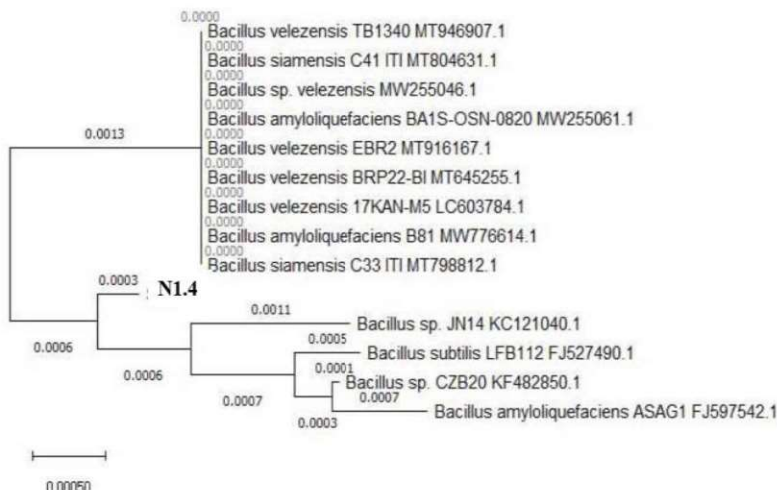
- Chủng N1.4 có chung nguồn gốc phát sinh với 13 chủng vi khuẩn *Bacillus* có trình tự xác định trên Genbank, do đó có thể khẳng định chủng N1.4 là một chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*.

- Trong 13 chủng *Bacillus* này, có 2 chủng *Bacillus* sp. JN14 và *Bacillus* sp. CZB20 là chưa được xác định rõ thuộc loài nào, tuy nhiên căn cứ vào mức độ tương đồng về nucleotide và cây phân

loại có thể dự đoán N1.4 thuộc loài *Bacillus subtilis*.

- Chủng N1.4 có hệ số tương đồng cao với 13 chủng so sánh. Trên hình vẽ cây phân loại chỉ ra

rằng, N1.4 có mối quan hệ gần gũi nhất về mặt di truyền với chủng *B. subtilis* LFB112 (tỷ lệ tương đồng 99,85%).



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn chọn lọc N1.4 với các trình tự gen trên GenBank có mức độ tương đồng cao nhất

Kết quả định danh đã xác định được rằng, chủng vi khuẩn N1.4 thuộc loài *Bacillus subtilis* dựa trên trình tự rDNA 16S là phù hợp với một số đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa đã được xác định. Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* N1.4 này có khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn ức chế mạnh các vi khuẩn kiểm định (*S. aureus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*) và có khả năng sinh tổng hợp enzym ngoại bào (amylase, cellulase, protease). Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Đào và cs (2015) [10] cũng cho thấy, 2 chủng phân lập của loài *Bacillus subtilis* đã được tuyển chọn dựa trên khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh chết sớm trên tôm.

4. KẾT LUẬN

Từ 50 chủng vi khuẩn đã phân lập được từ ruột tôm nước mặn tại huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định đã tuyển chọn được chủng N1.4 kháng mạnh các vi khuẩn kiểm định *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, chủng cũng có khả năng sinh tổng hợp các enzym ngoại bào amylase, cellulase, protease. Kết quả phân tích một số đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa, kết hợp với phân tích một phần trình tự nucleotide vùng V1-V9 của 16S RNA ribosomal của chủng chọn lọc N1.4 cho thấy, mức

độ tương đồng cao (99,85%) so với loài *Bacillus subtilis*. Với những đặc điểm đã xác định, chủng tuyển chọn *Bacillus subtilis* N1.4 có thể được sử dụng để tạo thành chế phẩm sinh học ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản hướng đến sự phát triển bền vững tại tỉnh Nam Định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hồng Minh (2021). Phát triển vùng nuôi thủy sản tập trung. *Báo Nam Định điện tử*. <https://baonamdinh.vn/channel/5085/202105/phat-trien-vung-nuoi-thuy-san-tap-trung-2544163/>. Cập nhật ngày 20/5/2021.
- Nguyễn Xuân Cảnh, Hồ Tú Cường, Nguyễn Thị Định, Phạm Thị Hiếu (2016). Nghiên cứu chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, tập 14, số 11: 1809 - 1816.
- Pepi M. & Focardi S. (2021). Antibiotic-Resistant Bacteria in Aquaculture and Climate Change: A Challenge for Health in the Mediterranean Area. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (11): 5723.

4. Andi, M. A., M. Hashemi and F. Ahmadi (2011). Effects of feed type with/without nanosil on cumulative performance, relative organ weight and some blood parameters on broilers. *Global Veterinaria*. 7 (6): 605 - 609.
5. Ninh Thị Thảo, Nông Thị Huệ, Đinh Trường Sơn, Nguyễn Xuân Cảnh (2022). Tổng quan - Bacteriocin: Phân loại, hoạt tính kháng khuẩn và ứng dụng. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 20 (10): 1427 - 1440.
6. Desriac F., Defer D., Bourgougnon N., Brillet B., Le Chevalier P. & Fleury Y. (2010). Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal - Associated Bacteria Warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Marine Drugs*. 8 (4): 1153 - 1177.
7. Simons A., Alhanout K. & Duval R. E. (2020). Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*. 8 (5): 639.
8. Kim Y. K., Park I. S., Kim D. J., Nam B. H., Kim D. G., Jee Y. J. & An C. M. (2014). Identification and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus* sp. SW1-1 that exhibits antibacterial activity against fish pathogens. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57: 605 - 612.
9. Huỳnh Thị Cẩm Tiên, Hồ Việt Thế (2019). Phân lập và định danh một số chủng *Bacillus* spp. có hoạt tính cao trong tăng đất mặt được thu thập từ tỉnh Bình Thuận. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 18 (2): 48 - 62.
10. Nguyễn Thị Bích Đào, Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Văn Khanh, Nguyễn Quang Linh (2015). Phân lập và tuyển chọn các chủng *Bacillus* ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh tôm chết sớm ở tỉnh Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học (Đại học Huế)*, 100 (1), 15 - 28.
11. Sambrook and Russell (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed., Vol. 1, 2 and 3.
12. Vũ Quỳnh Hương, Vũ Thị Yên, Nguyễn Thị Thanh Thủy (2022). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn lactic để ứng dụng trong sản xuất đồ uống probiotic từ gừng. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 20 (12): 1581 - 1590.

ISOLATION AND SELECTION OF MICROBIAL STRAINS CAPABLE TO BIOSYNTHESIZE ANTIMICROBIAL COMPOUNDS FROM SALTWATER SHRIMPS IN NAM DINH PROVINCE

Ho Tuan Anh, Bui Thi Huong Giang,
Ngo Thu Thuy, Vu Van Hanh

Summary

The study aimed to select indigenous bacterial strains from the saltwater of Nam Dinh province with the ability to biosynthesize antibacterial agents against some pathogenic bacteria in shrimp and to biosynthesize extracellular enzymes in order to produce biological preparation for aquaculture application. From 10 shrimp samples received in saltwater ponds and seaports of Hai Hau district, Nam Dinh province were isolated 50 pure and characterized colonies. By the diffusion method on agar plate was determined that the strain N1.4 has the highest antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio harveyi* CN18, *Vibrio parahaemolyticus* VTCC 910192 with antibacterial diameters 12, 11, 12 mm, respectively. The strain N1.4 was also shown to have the highest ability to biosynthesize extracellular enzymes amylase, cellulase, protease with corresponding hydrolysis diameter of 30, 29 and 24 mm. Evaluation of some described morphological, physiological and biochemical characteristics of the selected strain combined with using the molecular biology techniques was determined that the selected strain N1.4 has high similarity (99.85%) compared to species *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Antibacterial compounds, Bacillus, control microorganism, diffusion method on agar plate, shrimp.*

Người phản biện: TS. Bùi Kim Thúy

Ngày nhận bài: 01/3/2023

Ngày thông qua phản biện: 28/3/2023

Ngày duyệt đăng: 4/4/2023