

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.137

TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI PROTEIN VÀ ỨC CHẾ VI KHUẨN *Vibrio* SPP. TỪ NƯỚC MẮM TRUYỀN THỐNG

Trần Hữu Hậu¹, Nguyễn Anh Việt¹, Hoàng Ngọc Khánh², Trương Thị Bích Vân¹ và Nguyễn Phạm Anh Thi^{1*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Phạm Anh Thi (email: npathi@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 22/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 24/06/2022

Ngày duyệt đăng: 29/06/2022

Title:

Selection of bacteria capable of proteolytic and inhibitory *Vibrio* spp. from traditional fish sauce

Từ khóa:

Bacillus sp., nước mắm, phân giải protein, *Vibrio* spp.

Keywords:

Bacillus sp., fish sauce, proteolysis, *Vibrio* spp.

ABSTRACT

The study was carried out with the aim of isolating and selecting bacterial strains capable of proteolytic and inhibiting *Vibrio* spp. The ability to resolve proteins is done by the bacterial drop method, and the ability to inhibit *Vibrio* spp. performed by the well-diffusion method. The study isolated 10 bacterial strains from traditional fish sauce, including 7 strains capable of proteolysis and 4 strains capable of inhibiting *Vibrio* spp. The selected bacterial strain is NM2.1 with large resolution ring diameter and inhibition of *Vibrio* spp. strongest among the studied strains. Through observing colony morphology, cell morphology and 16S rDNA gene sequence, the bacteria strain NM2.1 was identified as *Bacillus* sp. with 99.71% similarity.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng phân giải protein và ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. Khả năng phân giải protein được thực hiện bằng phương pháp nhỏ giọt vi khuẩn và khả năng ức chế *Vibrio* spp. được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán qua giếng. Nghiên cứu đã phân lập được 10 dòng vi khuẩn từ nước mắm truyền thống, trong đó có 7 dòng có khả năng phân giải protein và 4 dòng có khả năng ức chế *Vibrio* spp. Dòng vi khuẩn được tuyển chọn là NM2.1 có đường kính vòng phân giải lớn và ức chế *Vibrio* spp. mạnh nhất trong những dòng vi khuẩn nghiên cứu. Qua quan sát hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào và giải trình tự đoạn gene 16S rDNA đã xác định được dòng NM2.1 là *Bacillus* sp. với độ tương đồng là 99,71% và có khả năng chịu mặn đến 25 ‰.

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, mô hình nuôi tôm công nghệ cao đã mang lại nhiều lợi ích cho nông dân, giúp tăng sản lượng tôm thương phẩm, rút ngắn thời gian nuôi và chủ động trong phòng và điều trị bệnh trên tôm. Tuy nhiên vẫn tồn tại hai vấn đề lớn cần phải giải quyết trong quá trình nuôi tôm đó là lượng thức ăn dư thừa

trong ao và sự phát triển của nhóm vi khuẩn gây bệnh. Vì trong mô hình nuôi tôm công nghệ cao, mật độ tôm có thể đạt 150-300 con/m², nếu có 1 con tôm nhiễm bệnh, khả năng cả ao cùng nhiễm bệnh là rất cao. Để tôm sinh trưởng và phát triển khỏe mạnh, điều kiện tiên quyết là chất lượng nước ao nuôi và mật độ vi khuẩn gây bệnh trong ao. Lượng thức ăn

du thừa trong ao nuôi là nguồn protein dồi dào cho các vi sinh vật phát triển, đặc biệt là nhóm vi khuẩn gây bệnh trong thủy sản. Do đó, chế phẩm vi sinh đã được ứng dụng để phân giải protein từ thức ăn thừa và mầm bệnh *Vibrio* spp. có trong nước ao nuôi.

Nguồn vi khuẩn có trong quá trình sản xuất nước mắm truyền thống đã được quan tâm nghiên cứu để ứng dụng làm nguồn probiotics tiềm năng cho ngành nuôi trồng thủy sản. Hệ vi sinh vật có trong nước mắm chủ yếu là nhóm vi khuẩn *Bacillus* và *Lactobacillus*. Một số dòng vi khuẩn đã được xác định: *Lactobacillus farciminis*; *Lactobacillus fermentum* có khả năng kháng lại *Escherichia coli* và *Salmonella* (Thủy & Hương, 2018; Thủy et al., 2019), *Bacillus subtilis* (Mohd Isa et al., 2020). *Bacillus* và *Lactobacillus* được ứng dụng rất nhiều trong nuôi trồng thủy sản giúp tăng cường hệ miễn dịch, hỗ trợ tiêu hóa và phân giải các chất hữu cơ (Gisbert et al., 2013; NavinChandran et al., 2014; Tamilarasu et al., 2021). Bên cạnh đó, chúng còn được ứng dụng để ức chế nhóm vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh cho thủy sản (Feliatra et al., 2021).

Trong nghiên cứu này, các dòng vi khuẩn phân lập từ nước mắm được khảo sát khả năng phân giải protein và ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. nhằm tuyển chọn dòng vi khuẩn có tiềm năng phát triển thành sản phẩm probiotic ứng dụng trong tương lai.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Ba mẫu nước mắm được sử dụng phân lập vi khuẩn thu từ các hộ gia đình tại thị trấn Tân Quới, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Nước mắm được làm từ các loại cá khác nhau (cá rô, cá sặc, cá bóng, cá linh) và được sản xuất theo phương pháp gài nén. Mẫu được thu ở giai đoạn nước mắm đã ủ được 8 tháng.

Nguồn vi khuẩn *Vibrio* spp. được nhận từ phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn gồm: LB- Luria Broth, LA- Luria Agar, Skimmilk agar, MRS- *Lactobacillus* Mrs Agar.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn từ nước mắm

Mẫu nước mắm được cho vào ống falcon và vận chuyển đến phòng thí nghiệm. Mười mL mẫu được nuôi tăng sinh vi khuẩn trong 90 mL môi trường LB (pepton 10 g/L, Yeast extract 5g/L và natriclorua 15 g/L) ở nhiệt độ phòng (28°C ±2) và lắc (120 vòng/phút) trong 24 giờ. Vi khuẩn được phân lập

theo qui trình của Alnahdi (2012) và Zhou et al. (2018). Sau khi ủ, dịch nuôi được trải trên môi trường LA (pepton 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, natriclorua 15 g/L và agar 20 g/L) và ủ ở nhiệt độ phòng, sau 24 giờ tiến hành quan sát và cấy để tách riêng.

Quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn

Hình thái khuẩn lạc như: hình dạng, màu sắc, kích thước, độ nổi và dạng bìa được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (A.KRÜSS Optronic GmbH) dựa trên mô tả của Bộ Y tế (2017) và hình thái vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 100X sau 24 giờ cấy vi khuẩn trên môi trường LA.

Các dòng vi khuẩn được kiểm tra Gram bằng bộ nhuộm Gram của công ty Nam Khoa và thực hiện theo hướng dẫn nhà sản xuất. Kết quả được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 100X.

Khả năng chuyển động được kiểm tra trên môi trường bán rắn (pepton 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, natriclorua 15 g/L và agar 5 g/L), vi khuẩn được ghi nhận là có khả năng chuyển động khi mọc lan rộng quanh vết cấy, không có khả năng di động khi chỉ mọc theo vết cấy (Dũng, 2005).

Kiểm tra phản ứng catalase và oxidase

Kiểm tra phản ứng catalase (phân hủy H₂O₂) của các dòng vi khuẩn phân lập được bằng cách cho một lượng sinh khối vi khuẩn lên lam kính và sau đó cho dung dịch H₂O₂ 3% lên sinh khối vi khuẩn. Ghi nhận kết quả, nếu thấy sủi bọt là dương tính, không sủi bọt là âm tính (Dũng, 2005).

Kiểm tra phản ứng oxidase được thực hiện với các đĩa giấy của công ty Nam Khoa, ghi nhận kết quả dương tính nếu đĩa giấy chuyển sang màu tím đen và âm tính sẽ không có hiện tượng chuyển màu tím đen.

2.2.2. Khảo sát khả năng phân giải protein

Những dòng vi khuẩn được kiểm tra khả năng phân giải protein trên môi trường Skimmilk agar theo mô tả của Kazanas (1968), Thanh et al. (2020) và Han et al. (2021). Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB sau 24 giờ, hút 3 µL dịch nuôi có sinh khối nhỏ vào môi trường Skimmilk agar, ủ ở nhiệt độ phòng, sau 3 ngày quan sát đường kính vòng phân giải (nếu có).

2.2.3. Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn

Vibrio spp.

Các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải protein ở thí nghiệm trên sẽ được tuyển chọn và tiến hành

khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch (Çadirici & Çitak, 2005; Minh et al., 2020; Thi et al., 2022). Sau 48 giờ, vi khuẩn được nuôi trên môi trường MRS lỏng, dịch nuôi được ly tâm lạnh với tốc độ quay 12.000 rpm trong 15 phút, loại bỏ sinh khối. Sau đó, dịch nuôi sẽ được bơm 50 µL vào mỗi giếng trên đĩa Petri đã được trải khuẩn *Vibrio* spp. Khả năng ức chế được thể hiện qua đường kính vòng ức chế (nếu có).

2.2.4. Nhận diện dòng vi khuẩn đã tuyển chọn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Dòng vi khuẩn có khả năng phân giải protein và ức chế vi khuẩn *Vibrio* sp. sẽ được tuyển chọn định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Vùng trình tự 16S rDNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Ren et al., 2015). Thành phần phản ứng với thể tích 50 µL gồm 25 µL nước khử ion, 20 µL Mytaq mix (Bioline, Anh), 1 µL mỗi mồi 27F và 1492R (20 µM), 3 µL DNA khuôn. Chu kỳ nhiệt gồm các giai đoạn: tiền biến tính ở 95°C trong 3 phút; sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước sau: biến tính ở 95°C trong 1 phút, bắt cặp ở nhiệt độ 56°C trong thời gian 1 phút, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 2 phút; giai đoạn ổn định được duy trì ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 10 phút.

Sản phẩm PCR với kích thước khoảng 1500 bp được điện di trên gel agarose 2%. Các băng DNA sáng, rõ và không có băng phụ được chọn giải trình tự tại công ty Genlab. Kết quả trình tự được kiểm tra bằng phần mềm Bioedit. Trình tự DNA được so sánh với cơ sở dữ liệu của Ngân hàng gen thông qua công cụ BLASTN (NCBI) để định danh đến mức độ loài.

2.2.5. Khảo sát khả năng chịu mặn của dòng vi khuẩn được tuyển chọn

Dòng vi khuẩn sau khi định danh sẽ được kiểm tra khả năng chịu mặn (muối NaCl) theo mô tả của Nhựt et al. (2019) có hiệu chỉnh. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB, sau 24 giờ chuyển 100 µL dịch nuôi bao gồm sinh khối vi khuẩn vào 10 mL môi trường LB có độ mặn khác nhau (0, 5, 10, 15, 20 và

25‰), ủ lắc (120 vòng/phút) ở nhiệt độ phòng. Tiến hành trải khuẩn ở 3 mốc thời gian 0,24 và 48 giờ sau khi nuôi khuẩn. Ở các mốc thời gian, hút 50 µL dịch nuôi trải trên môi trường LA để kiểm tra mật độ vi khuẩn, thí nghiệm được lặp lại ba lần.

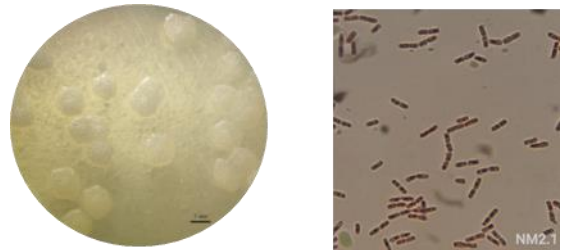
2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và được ghi nhận bằng phần mềm excel. Kết quả thí nghiệm được phân tích ANOVA một nhân tố ($P < 0,05$) phần mềm Minitab 16.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và một số đặc tính của vi khuẩn phân lập từ nước mắm

Kết quả quan sát hình thái, khả năng chuyển động và các kiểm tra sinh hóa của 10 dòng vi khuẩn phân lập từ nước mắm được trình bày ở Bảng 1, Bảng 2 và Hình 1. Nhìn chung các dòng khuẩn có kiểu hình khuẩn lạc và tế bào có nét tương đồng với nhau (hình tròn, phẳng, bề mặt nhám/bóng, bìa nguyên, màu trắng sữa, kích thước nhỏ hơn 3 mm). Bên cạnh đó, một số dòng vi khuẩn có hình dạng khuẩn lạc đặc biệt hơn so với các dòng còn lại (Bảng 1). Dòng khuẩn NM1.1 có bìa gợn sóng và khuẩn lạc dạng vòm trũng, về màu sắc dòng NM1.2 màu hồng cam, NM2.2 màu vàng cam và NM3.1 màu vàng. Điểm nổi bật về kích thước khuẩn lạc của dòng NM2.2 và NM3.2 với đường kính đến 4 mm. Về đặc điểm tế bào và kiểm tra sinh hóa, các dòng vi khuẩn đa số là hình que (NM3.1 và NM3.3 hình cầu), có 7/10 dòng khuẩn Gram âm (NM2.1, NM2.2 và NM3.5 Gram dương), các dòng khuẩn đều có khả năng di động trừ NM2.2. Tất cả đều dương tính với catalase; 4 dòng dương tính và 6 dòng âm tính với oxidase (Bảng 2).



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc và hình dạng tế bào của vi khuẩn NM2.1

Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phân lập

STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc					
		Bề mặt	Hình dạng	Bìa	Độ nổi	Màu sắc	Kích thước (mm)
1	NM1.1	Nhám	không đều	Gợn sóng	Vòm trũng	Trắng sữa	3
2	NM1.2	Bóng	Tròn	Nguyên	Phẳng	Hồng cam	2
3	NM1.3	Nhám	Không đều	Nguyên	Phẳng	Trắng sữa	2,5
4	NM2.1	Nhám	không đều	Gợn sóng	Phẳng	Trắng sữa	2
5	NM2.2	Bóng	không đều	Nguyên	Phẳng	Vàng cam	4
6	NM3.1	Bóng	Tròn	Nguyên	Vòng	Vàng	1
7	NM3.2	Nhám	không đều	Nguyên	Phẳng	Trắng sữa	4
8	NM3.3	Bóng	Tròn	Nguyên	Vòng	Trắng	1
9	NM3.4	Bóng	Tròn	Nguyên	Phẳng	Trắng trong	1
10	NM3.5	Nhám	Tròn	Nguyên	Phẳng	Trắng sữa	2,5

Ghi chú: hình thái khuẩn lạc được quan sát dưới kính nhìn nổi

Bảng 2. Đặc điểm tế bào, sinh hóa và khả năng phân giải protein của các dòng vi khuẩn phân lập

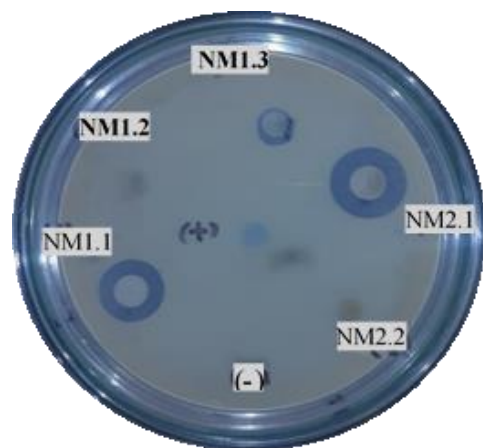
TT	Vi khuẩn	Đặc điểm tế bào			Đặc điểm sinh hóa		
		Hình dạng	Gram	Chuyển động	Oxidase	Catalase	Phân giải protein (mm)
1	NM1.1	Que dài	-	+	-	+	7,7 ^b ±0,58
2	NM1.2	Que dài	-	+	+	+	-
3	NM1.3	Que dài	-	+	+	+	5,0 ^{cd} ±1,0
4	NM2.1	Que ngắn	+	+	+	+	10,7 ^a ±0,58
5	NM2.2	Que dài	+	-	+	+	-
6	NM3.1	Cầu	-	+	-	+	6,0 ^{bcd} ±1,0
7	NM3.2	Que ngắn	-	+	-	+	7,7 ^b ±0,58
8	NM3.3	Cầu	-	+	-	+	4,0 ^d ±2,0
9	NM3.4	Que ngắn	-	+	-	+	-
10	NM3.5	Que dài	+	+	-	+	3,7 ^d ±0,58

ĐC: 6,7^{bc} ±0,58

Ghi chú: Dấu “+” dương tính, “-” âm tính/không phân giải, “ĐC” đối chứng dương bromelain; trong cùng một cột, các giá trị có các ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2. Kết quả khả năng phân giải protein của các dòng vi khuẩn

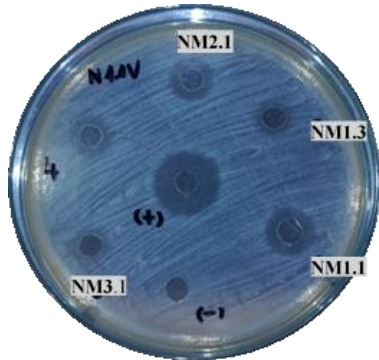
Khả năng phân giải protein trên môi trường SMA của 10 dòng vi khuẩn được trình bày trong Bảng 2 và Hình 2. Trong 10 dòng vi khuẩn phân lập có 7 dòng (NM1.1, NM1.3, NM2.1, NM3.1, NM3.2, NM3.3, NM3.5) có khả năng phân giải protein thể hiện qua vòng phân giải. Dòng NM2.1 có khả năng phân giải protein mạnh nhất (khác biệt có ý nghĩa 5%) trong 10 dòng vi khuẩn khảo sát với đường kính vòng phân giải là 10,7 mm (Bảng 2, Hình 2). Dòng NM3.5 phân giải yếu nhất (3,7 mm) và dòng NM1.2, NM2.2, NM3.4 không thể hiện khả năng phân giải. Nghiên cứu của Mohd Isa et al. (2020) đã phân lập được *B. thuringiensis* có khả năng phân giải protein trong ruột cá. Trong nghiên cứu của Li et al. (2022) cũng đã phân lập được 6 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải protein từ mắm ruốc (shrimp paste).



Hình 2. Khả năng phân giải protein của các dòng vi khuẩn

3.3. Kết quả khả năng ức chế *Vibrio* spp. của các dòng vi khuẩn

Các dòng vi khuẩn được kiểm tra khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. trên môi trường MRS được trình bày ở Bảng 4 và Hình 3. Có 4/7 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio* spp. Dòng NM2.1 cho khả năng ức chế mạnh trong 7 dòng khuẩn được khảo sát và ức chế được 3/4 dòng *Vibrio* với đường kính vòng ức chế lớn nhất có thể đạt được là 5,7 mm (ức chế *Vibrio* sp. N1.1V). Bên cạnh đó chỉ có dòng NM2.1 có thể ức chế được *Vibrio* sp. T2X. Tuy nhiên không có dòng vi khuẩn phân lập nào có thể ức chế được sự phát triển của *Vibrio* sp. N2.2X (Hình 3). Kết quả nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Amenyogete et al. (2021), Nurliana et al. (2021) và Thi et al. (2022), chỉ có một số vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* sp.



Hình 3. Khả năng ức chế *Vibrio* sp. N1.1V của các dòng vi khuẩn

3.4. Kết quả nhận diện dòng vi khuẩn đã tuyển chọn

Qua hai thí nghiệm phân giải protein và ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. đã tuyển chọn được dòng vi khuẩn NM2.1 để nhận diện ở mức độ chi/loài. Sản phẩm PCR được kiểm tra chất lượng trên gel agarose 2% và kết quả giải trình tự được kiểm tra bằng phần mềm Bioedit (Hình 4). So sánh trình tự nucleotide vùng gene 16S rDNA của NM2.1 với ngân hàng gene bằng chương trình BLASTN

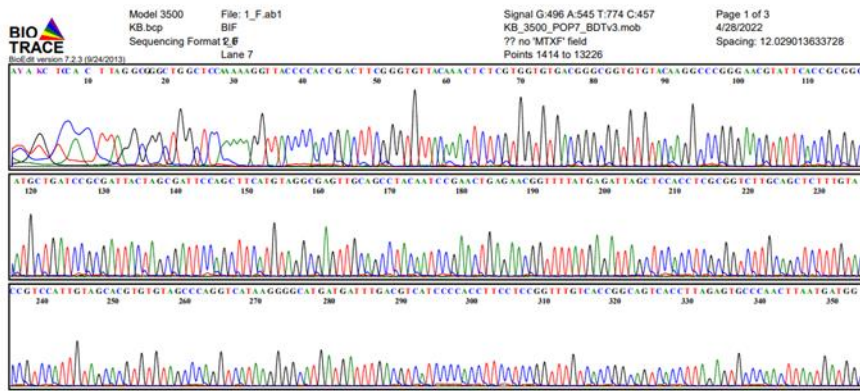
(NCBI) cho cùng giá trị độ bao phủ (100%) và độ tương đồng (99,71%) với các loài thuộc chi *Bacillus* trên ngân hàng dữ liệu (Hình 5) như là *Bacillus cereus*, *B. proteolyticus*, *B. paranthracis*. Tuy nhiên, để xác định đến mức phân loại loài cần có thêm các nghiên cứu về phân tử và hình thái chi tiết hơn. Trong phạm vi nghiên cứu này, chỉ xác định đến *Bacillus* sp.

Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đó về khả năng ức chế một số dòng vi khuẩn gây bệnh của các loài thuộc chi *Bacillus*. Cụ thể, *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *Bacillus* spp. được phân lập từ ruột tôm có khả năng tăng các chỉ số miễn dịch (số lượng bạch cầu, lysozyme, phenoloxidase, ...) khi bổ sung vào thức ăn của tôm sú (*Penaeus monodon*) (NavinChandran et al., 2014); Phụng et al., 2018; Tâm & Thịnh, 2020). Đối với hải sâm (*Apostichopus japonicus*) *B. cereus* có khả năng ức chế nguồn bệnh *Vibrio splendidus* (Zhao et al., 2016). Theo nghiên cứu của Li et al. (2015) hỗn hợp *Bacillus subtilis* YB-1 và *Bacillus cereus* YB-2) bổ sung vào chế độ ăn đã kích thích các phản ứng miễn dịch không đặc hiệu và nâng cao hiệu suất sinh trưởng của hải sâm, và có hiệu quả trong việc kiểm soát các bệnh nhiễm trùng do *V. alginolyticus* gây ra. Đối với cá Tambaqui (*Colossoma macropomum*) *B. cereus* đã cải thiện mức tăng cân nặng và chiều dài, đồng thời tăng số lượng bạch cầu trung tính và tiểu cầu và dẫn đến tăng cường khả năng sống sót (Dias et al., 2018). Sử dụng *B. cereus* như probiotic giúp tăng cường khả năng miễn dịch và chống oxy hóa thông qua việc tăng acid phosphatase, alkaline phosphatase, glutathione peroxidase, giảm glutathione và catalase, đồng thời làm giảm đáng kể malondialdehyde. Hơn nữa, chế độ ăn bao gồm *B. cereus* ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động của các enzym tiêu hóa về các hoạt động lipase và trypase cao hơn. Kết luận, bổ sung *B. cereus* trong chế độ ăn có thể thúc đẩy sự phát triển, nâng cao khả năng miễn dịch và tình trạng chống oxy hóa của động vật thủy sản (NavinChandran et al., 2014; Dias et al., 2018; Yang et al., 2019).

Bảng 4. Khả năng ức chế *Vibrio* spp. của các dòng vi khuẩn phân lập

Vi khuẩn	NM1.1	NM1.3	NM2.1	NM3.1	NM3.2	NM3.3	NM3.5	ĐC (+)
<i>Vibrio</i> sp. N1.1V	4,3 ^{bc} ±1,5	-	5,7 ^b ±0,6	-	3,3 ^c ±0,6	2,7 ^c ±1,2	-	8,3 ^a ±0,6
<i>Vibrio</i> sp. N1.2X	-	-	2,7 ^b ±0,6	-	-	1,3 ^b ±0,6	-	19,0 ^a ±1,0
<i>Vibrio</i> sp. N2.2X	-	-	-	-	-	-	-	3,7
<i>Vibrio</i> sp. T2X	-	-	1,3 ^b ±0,6	-	-	-	-	4,3 ^a ±0,6

Trong cùng một hàng, các giá trị có các kí tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). ĐC (+): kháng sinh oxytetracycline (5 mg/mL), (-): không ức chế.



Hình 4. Kiểm tra kết quả giải trình tự bằng phần mềm Bioedit

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

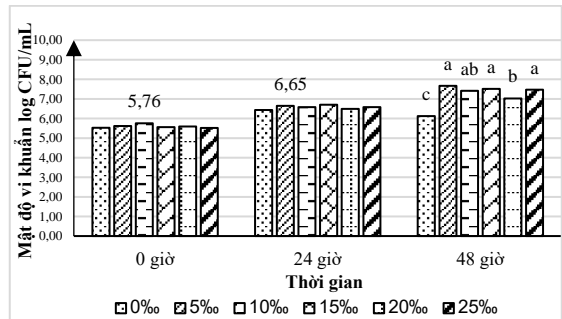
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus cereus strain IAM 12605 16S ribosomal RNA, partial sequence	Bacillus cereus	1884	1884	100%	0.0	99.71%	1486	NR_115526.1
<input type="checkbox"/> Bacillus proteolyticus strain MCCC 1A00365 16S ribosomal RNA, partial sequence	Bacillus proteolyticus	1884	1884	100%	0.0	99.71%	1509	NR_157735.1
<input type="checkbox"/> Bacillus paranthracis strain MCCC 1A00395 16S ribosomal RNA, partial sequence	Bacillus paranthracis	1884	1884	100%	0.0	99.71%	1509	NR_157728.1

Hình 5. So sánh trình tự của dòng vi khuẩn MN2.1 với ngân hàng dữ liệu NCBI

3.5. Kết quả khả năng chịu mặn của Bacillus sp. NM2.1

Vi khuẩn *Bacillus* sp. NM2.1 có khả năng sống và phát triển trong môi trường LB ở các độ mặn khác nhau từ 0 đến 25‰ (Hình 6). Cụ thể sau 24 giờ mật độ vi khuẩn ở tất cả các nghiệm thức đều tăng và khác biệt không ý nghĩa thống kê (dao động từ 6,44 đến 6,70 log CFU/mL). Khi kéo dài thời gian nuôi đến 48 giờ mật số có sự thay đổi, ở nghiệm thức có độ mặn 0‰ mật độ vi khuẩn đạt 6,13 log CFU/mL thấp nhất so với các nghiệm thức còn lại và thấp hơn mật độ lúc 24 giờ. *Bacillus* sp. NM2.1 được phân lập trong nước mắm nên có khả năng chịu được độ mặn cao lên đến 25‰. Trong nhiều nghiên cứu trước đây cũng đã phân lập được *Bacillus* có khả năng chịu mặn cao lên đến 50-70‰ (Nhựt et al., 2019; Tâm & Thịnh, 2020). Trong nghiên cứu này, dòng *Bacillus* sp. NM2.1 đã được khảo sát khả năng phân giải protein, ức chế *Vibrio* spp. và chịu mặn và cho thấy có tiềm năng ứng dụng làm probiotic cho tôm nói riêng và động vật thủy sản nói chung.



Hình 6. Khả năng chịu mặn của *Bacillus* sp. NM2.1

Chú thích: mốc thời gian 0 giờ và 24 giờ mật độ vi khuẩn không có khác biệt giữa các nghiệm thức. Ở từng mốc thời gian có kí tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

4. KẾT LUẬN

Phân lập được 10 dòng vi khuẩn trong nước mắm truyền thống và tuyển chọn được *Bacillus* sp. NM2.1 có khả năng phân giải protein, khả năng ức chế sự phát triển của *Vibrio* sp. và khả năng chịu mặn. Dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. NM2.1 nên tiếp tục được nghiên cứu để đánh giá thêm tiềm năng ứng dụng như một probiotic trong phòng bệnh nuôi trồng thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alnahdi, H. S. (2012). Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated bacillus sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(9), 071–074.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2915>
- Amenyogbe, E., Huang, J., Chen, G., & Wang, W. (2021). Probiotic Potential of Indigenous (*Bacillus* sp. RCS1, *Pantoea agglomerans* RCS2, and *Bacillus cereus* strain RCS3) Isolated From Cobia Fish (*Rachycentron canadum*) and Their Antagonistic Effects on the Growth of Pathogenic *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harvey*. *Frontiers in Marine Science*, 8, 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2021.672213>
- Bộ Y tế. (2017). *Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng*. Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 36–37.
- Çadirci, B. H., & Çitak, S. (2005). A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(4), 237–241.
<http://www.pjbs.org/pjnonline/fin329.pdf>
- Dias, J. A. R., Abe, H. A., Sousa, N. C., Couto, M. V. S., Cordeiro, C. A. M., Meneses, J. O., Cunha, F. S., Mourinho, J. L. P., Martins, M. L., Barbas, L. A. L., Carneiro, P. C. F., Maria, A. N., & Fujimoto, R. Y. (2018). Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture Research*, 49(9), 3063–3070.
<https://doi.org/10.1111/are.13767>
- Dũng, N. L. (2005). Giáo trình Vi sinh vật học. *Các đặc điểm sinh hóa*, 208–210.
<https://voer.edu.vn/c/giao-trinh-vi-sinh-vat-hoc/9b2ffb8d>
- Feliatra, F., Batubara, U. M., Nurulita, Y., Lukistyowati, I., & Setiaji, J. (2021). The potentials of secondary metabolites from *Bacillus cereus* SN7 and *Vagococcus fluvialis* CT21 against fish pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 158, 105062.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105062>
- Gisbert, E., Castillo, M., Skalli, A., Andree, K. B., & Badiola, I. (2013). *Bacillus cereus* var. toyoi promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2766–2774.
<https://doi.org/10.2527/jas2012-5414>
- Han, L. T. N., Diep, V. T. N., Hoa, T. T. T., & Thanh, N. V. (2021). Isolation and selection of *Bacillus* sp. with the potential biosynthesis of protease from fermented soybean products. *Ministry of Science and Technology, Vietnam*, 63(8), 49–54.
[https://doi.org/10.31276/vjst.63\(8\).49-54](https://doi.org/10.31276/vjst.63(8).49-54)
- Kazanas, N. (1968). Proteolytic Activity of Microorganisms Isolated from Freshwater Fish. *Applied Microbiology*, 16(1), 128–132.
<https://doi.org/10.1128/am.16.1.128-132.1968>
- Li, J., Xu, Y., Jin, L., & Li, X. (2015). Effects of a probiotic mixture (*Bacillus subtilis* YB-1 and *Bacillus cereus* YB-2) on disease resistance and non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture Research*, 46(12), 3008–3019.
<https://doi.org/10.1111/are.12453>
- Li, Y., Qianqian, Z., Zhiying, Z., Jing, Z., Yixin, C., & Wengang, J. (2022). Isolation of Protease-Producing Bacteria from Shrimp Paste and the Characteristics of Fermenting Catfish Paste. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 31(4).
<https://doi.org/10.1080/10498850.2022.2048154>
- Minh, N. V., Tuấn, L. A., Lợi, P. Q., Linh, D. N., Đức, T. K., Nhi, V. N. Y., Ni, T. T. Á., & Tình, N. T. N. (2020). Khả năng kiểm soát sinh học *Vibrio parahaemolyticus* NT7 phân lập từ tôm thẻ bệnh hoại tử gan tụy (AHPND) của chủng *Bacillus polyfermenticus* F27 phân lập từ giun quế. *Kỹ Thuật Và Công Nghệ*, 14(1), 71–83.
<https://doi.org/10.46223/hcmcoujst.tech.vi.14.1.435.2019>
- Mohd Isa, M. H., Shamsudin, N. H., Al-Shorgani, N. K. N., Alsharjabi, F. A., & Kalil, M. S. (2020). Evaluation of antibacterial potential of biosurfactant produced by surfactin-producing *Bacillus* isolated from selected Malaysian fermented foods. *Food Biotechnology*, 34(1), 1–24.
<https://doi.org/10.1080/08905436.2019.1710843>
- NavinChandran, M., Iyapparaj, P., Moovendhan, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2014). Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1), 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.004>
- Nhứt, P. M., Hương, V. L., & Trinh, Đ. N. P. (2019). Phân lập, sàng lọc và khảo sát hoạt tính sinh học của vi khuẩn keo tụ sinh học trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại tỉnh Trà Vinh. *Cần Thơ University Journal of Science*, 55, 270.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2019.035>
- Nurliana, Sutriana, A., Azhar, A., Erina, Jalaluddin, M., & Andista, B. K. (2021). The effect of yeast and lactic acid bacteria as probiotic on the total of *Vibrio* spp. In rearing water of post larvae

- tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 711(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/711/1/012030>
- Phượng, V. H., Hậu, V. T., Ngọc, N. T. H., Phước, L. H., Tuấn, N. H., Lộc, N. H., & Thủy, L. T. B. (2018). Khảo sát đặc tính đối kháng của *Bacillus licheniformis* (B1) đối với trên tôm (AHPND) trong điều kiện phòng thí nghiệm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(thủy sản), 91-100. <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2018.041>
- Ren, Y., Liu, W., & Zhang, H. (2015). Identification of coccoidal bacteria in traditional fermented milk products from Mongolia, and the fermentation properties of the predominant species, *Streptococcus thermophilus*. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(5), 683–691. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.5.683>
- Tâm, H. N. T., & Thịnh, H. V. (2020). Đặc điểm của các dòng lợi khuẩn *Bacillus* spp. từ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở tỉnh Kiên Giang. *Can Tho University Journal of Science*, 56(2), 44. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.029>
- Tamilarasu, A., Ahilan, B., Gopalakannan, A., & Somu, S. L. R. (2021). Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* strains on growth performance and physiological responses in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 52(7), 3124–3136. <https://doi.org/10.1111/are.15159>
- Thanh, Đ. T. N., KimXuyến, C., & Son, H. B. (2020). Khả năng phân giải protein, lipid, tinh bột, chitin và ức chế nấm của vi khuẩn vùng rễ được phân lập từ cây tiêu (*Piper nigrum* L.) trồng ở huyện Chơn Thành, tỉnh Bình Phước. *Can Tho University Journal of Science*, 56(1), 95. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.010>
- Thi, N. P. A., Hau, T. H., Huynh, N. T. N., Liem, H. Van, Van, T. T. B., & Khang, D. T. (2022). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Vietnamese sour-fermented fish product. *Malaysian Journal of Microbiology*, 18(2). <https://doi.org/10.21161/mjm.211255>
- Thủy, Đ. T. B., & Hương, N. T. D. (2018). Định danh và khảo sát một số tính chất của *Lactobacillus farciminis* NM6 phân lập từ nước mắm. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 127(1C), 119. <https://doi.org/10.26459/hueuni-jns.v127i1c.4911>
- Thủy, Đ. T. B., Hương, N. T. T., & Thanh, Đ. T. T. (2019). Xác định một số tính chất có lợi của các chủng vi khuẩn lactic phân lập được từ mắm ruốc Huế. *Tạp Chí Khoa Học và Công Nghệ Nông Nghiệp*, 3(3), 1458–1467.
- Yang, G., Cao, H., Jiang, W., Hu, B., Jian, S., Wen, C., Kajbaf, K., Kumar, V., Tao, Z., & Peng, M. (2019). Dietary supplementation of *Bacillus cereus* as probiotics in Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze): Effects on growth performance, fillet quality, serum biochemical parameters and intestinal histology. *Aquaculture Research*, 50(8), 2207–2217. <https://doi.org/10.1111/are.14102>
- Zhao, Y., Yuan, L., Wan, J., Sun, Z., Wang, Y., & Sun, H. (2016). Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 49, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.035>
- Zhou, S., Xia, Y., Zhu, C., & Chu, W. (2018). Isolation of marine *Bacillus* sp. With antagonistic and organic-substances-degrading activities and its potential application as a fish probiotic. *Marine Drugs*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/md16060196>