

PHÂN LẬP, NHẬN DẠNG VÀ SÀNG LỌC CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP BACTERIOCIN TỪ MẪU THỰC PHẨM LÊN MEN VÀ RUỘT CÁ

Đinh Thị Hiền^{1,✉}, Vũ Văn Hạnh²

¹ Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phân lập và tuyển chọn chủng *Bacillus* có khả năng kháng khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh trên động vật như *E. coli*, *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*, *Salmonella typhi* nhằm mục đích sản xuất chế phẩm được ứng dụng trong thực phẩm và chăn nuôi.

Phương pháp: Từ nguồn nguyên liệu là các loại ruột cá thu, rau cải muối, nem chua thu thập trên thị trường Hà Nội đã phân lập được 70 chủng vi sinh vật. Sử dụng phương pháp đục lỗ thạch để kiểm tra khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh trên động vật của chủng tuyển chọn.

Kết quả: Thu được: 26/70 chủng kháng *S. aureus* kích thước vòng kháng khuẩn 8 – 17 mm, có 20/70 chủng kháng *V. harveyi*, có 10/70 chủng kháng *V. paraheamolyticus* và có 26/70 chủng kháng *Salmonella typhi*. Chủng RP1 là dòng vi khuẩn có khả năng kháng *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*, *Salmonella typhi* tốt nhất trong 70 dòng đã khảo sát. Theo hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào bước đầu nhận định chủng vi khuẩn RP1 thuộc họ *Bacillus*, hệ số tương đồng với các chủng thuộc loài *Bacillus licheniformis* rất cao với giá trị bootstrap trên 80, mức độ tương đồng 99% – 100% theo căn trình tự nucleotide 16S rARN.

Kết luận: Đã phân lập, nhận dạng và sàng lọc được chủng RP1 từ ruột cá rô phi. Kết hợp các đặc điểm sinh học và phương pháp sinh học phân tử đã xác định chủng RP1 có quan hệ họ hàng gần gũi với loài *Bacillus licheniformis*. Chủng vi khuẩn tiềm năng *Bacillus licheniformis* RP1 này có khả năng sinh Bacteriocin ức chế mạnh vi khuẩn kiểm định *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*. Vì vậy chủng *Bacillus licheniformis* RP1 có thể là chủng lợi khuẩn trong sản xuất chế phẩm sinh học kiểm soát vi khuẩn gây bệnh trong chăn nuôi và thực phẩm.

Từ khóa: Bacteriocin, *Bacillus*, vi sinh vật, tuyển chọn.

ISOLATION, IDENTIFICATION, AND SCREENING OF MICROORGANISMS CAPABLE OF PRODUCING BACTERIOCIN FROM FERMENTED FOOD AND FISH GUT

ABSTRACT

Aims: This study aimed to isolate and characterize *Bacillus* strains capable of producing bacteriocin to inhibit key pathogenic bacteria in livestock - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Salmonella typhi* - for potential application in the production of preparations used in food and animal husbandry.

✉ Tác giả liên hệ: Đinh Thị Hiền
Email: hienhd2001@gmail.com
Doi: 10.56283/1859-0381/944

Nhận bài: 8/4/2025 Chỉnh sửa: 24/8/2025
Chấp nhận đăng: 26/8/2025
Công bố online: 27/8/2025

Methods: Seventy microbial strains were isolated from mackerel gut, pickled mustard greens, and fermented pork (*nem chua*) collected from local markets in Hanoi. Antibacterial activity was evaluated using the agar well diffusion method against the target pathogens.

Results: Among the isolates, 26 inhibited *S. aureus* (8–17 mm inhibition zones), 20 inhibited *V. harveyi*, 10 inhibited *V. parahaemolyticus*, and 26 inhibited *S. typhi*. Strain RP1 exhibited the broadest and strongest inhibitory spectrum. Morphological observation and 16S rRNA gene sequencing identified RP1 as *Bacillus licheniformis* with 99–100% sequence similarity and bootstrap support above 80%.

Conclusion: *Bacillus licheniformis* RP1, isolated from tilapia gut, produces bacteriocin with strong inhibitory activity against *S. aureus*, *V. harveyi*, and *V. parahaemolyticus*. Therefore, this strain could be a promising probiotic for the development of biological preparations aimed at controlling pathogenic bacteria in livestock production and food applications.

Keywords: Bacteriocin, *Bacillus*, microorganisms, selection.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bacteriocin có cấu tạo từ các phân tử peptide hay protein được sinh tổng hợp trên ribosome ở cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm, tích điện dương, có khối lượng phân tử thấp, bền nhiệt và các hợp chất này được coi là chất kháng khuẩn có bản chất protein do một cá thể đặc biệt của vi khuẩn tiết ra để cản trở sự nuôi dưỡng các chủng vi khuẩn tương tự hoặc có quan hệ gần [1]. Bacteriocin hoạt động bằng cách tương tác và phá hủy các tế bào có thụ thể bề mặt [2].

Bacteriocin được thu nhận chủ yếu từ vi khuẩn Gram dương tập trung ở hai chi *Lactobacillus*, *Bacillus* phân lập từ ruột động vật, đất, nước... nhưng cũng đã được ghi nhận ở vi khuẩn Gram âm (*E. coli*, *Vibrio spp.*, *Pseudomonas spp.*) [3]. Tiềm năng Bacteriocin từ môi trường biển vô cùng phong phú, tuy nhiên còn chưa được khai thác nhiều [4].

Ở EU năm 2006 ban bố lệnh cấm sử dụng kháng sinh làm chất kích thích tăng trưởng đã làm tăng sự quan tâm đến việc sử dụng chế phẩm sinh học từ Bacteriocin

thay thế kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi [5]. Một số *Bacillus spp.* cũng đã được sử dụng như probiotic [6]. Trong số các loại vi sinh vật được coi là an toàn (GRAS), nhóm vi khuẩn lactic acid bacteria (LAB) và *Bacillus* thường được ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm và chăn nuôi [7]

Bacteriocin là một hợp chất có giá trị cao sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm và được phẩm mục đích ngăn ngừa thực phẩm bị hư hỏng và sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh. Trong quá trình tổng hợp sinh học Bacteriocin các enzyme xúc tác tạo thành lantibiotic, để tạo ra các peptide mới đóng vai trò kháng khuẩn [8]. Bacteriocin được sử dụng để nuôi cấy trong các quy trình sản xuất thực phẩm để tăng hương vị và kéo dài thời hạn sử dụng. Ngoài ra, nhiều vi khuẩn sản xuất Bacteriocin được phân lập từ thực phẩm và nguyên liệu thô của chúng [9]. Trong số này, *Bacillus* được coi là chủng tiềm năng trong sản xuất chế phẩm sinh học, đóng góp tích cực vào sự phát triển

của ngành chăn nuôi và thực phẩm. Mặc dù vậy, tại Việt Nam các công bố về việc chủng *Bacillus* có khả năng kháng các mầm bệnh trên vật nuôi và thực phẩm còn hạn chế. Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu được tiến hành với mục đích phân lập, nhận dạng, sàng lọc chủng vi

sinh vật có khả năng sinh tổng hợp Bacteriocin từ mẫu thực phẩm và cá có khả năng kháng với mầm bệnh nhằm sản xuất chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh và điều trị bệnh trong chăn nuôi và bảo quản thực phẩm.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Nguồn vi sinh vật: Các loại ruột cá, rau cải muối, nem chua...thu thập ngẫu nhiên tại các chợ tại Quận Cầu Giấy, Hà Nội. Mẫu thí nghiệm được đựng trong túi chuyên dụng đã được vô trùng và bảo quản lạnh được tiến hành phân tích tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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 20g, pH 7, nước cất vừa đủ 1 lít [10].

- Môi trường LB có bổ sung các cơ chất tinh bột (0,2%, w/v), Carboxymethyl cellulose (CMC) (0,2%, w/v) và casein (0,2%, w/v), lipid (0,2%, w/v) được sử

- 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, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*.

dụng trong nghiên cứu hoạt tính của các enzyme ngoại bào tương ứng amylase, cellulase, protease, lipase bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [11].

- 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

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

Mẫu ruột cá, rau cải muối, nem chua được cắt nhỏ, cho vào ống eppendorf 5 ml có chứa nước muối sinh lí. Mỗi mẫu lấy 0.5g cho vào ống falcon chứa 4,5ml NaCl 0,9% đã tiệt trùng. Vortex mẫu cho đều, sau đó đem đi đồng hóa ở tủ 37°C trong 30 phút và xử lý nhiệt ở 100°C trong 5 phút.

Mẫu được pha loãng đến nồng độ 10^{-8} , hút 100 µl dịch đã pha loãng cấy

trải trên môi trường LB-agar và cấy ở 3 nồng độ 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} rồi bọc kín để trong tủ ủ 37°C. Các khuẩn lạc riêng rẽ được nhặt ra và nuôi trong LB dịch thể ở 37°C trong 24 giờ. Dịch lên men được ly tâm ở 10000 vòng/phút, trong 5 phút và thu dịch nổi sử dụng cho các thí nghiệm làm thuần các chủng vi khuẩn [12].

Phương pháp xác định hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn kiểm định bằng phương pháp đục lỗ thạch

Khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh trên động vật như *E.coli*, *S.aureus*, *V.harveyi*, *V.paraheamolyticus*, *Salmonella typhi* của vi khuẩn tuyển chọn được thực hiện theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Các vi khuẩn gây bệnh được nuôi trong môi trường LB lỏng 24h /37°C. Sau đó tiến hành hút và cấy trang vi khuẩn kiểm định trên môi trường LB chứa 3,5% NaCl. Để khô tự nhiên và tiến hành khoan lỗ thạch, kích thước lỗ thạch (d=6mm) [13].

Nhỏ 50 μ l dịch nổi nuôi vi khuẩn *E.coli*, *S.aureus*, *V.harveyi*, *V.paraheamolyticus*, *Salmonella typhi* đã loại bỏ tế bào (sau ly tâm) vào mỗi giếng. Sau khi nhỏ dịch để khô tự nhiên. Để đĩa

Định danh chủng vi sinh vật phân lập

Định danh chủng *Bacillus* kháng khuẩn cao nhất được thực hiện bằng phương pháp tách DNA. Quá trình ly trích DNA được thực hiện chạy PCR trên bộ kit E.Z.N.A.®Forensic DNA Kit 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 250ml có chứa 50 ml môi trường LB lỏng ở 37°C, lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ,

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê trên phần mềm Excel và Minitab 16.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

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

Tiến hành phân lập 70 chủng trong đó: 15 chủng từ dưa muối, 12 chủng từ nem chua, 7 từ ruột cá rô phi, 13 chủng từ ruột cá Trắm, 7 chủng từ Kimchi, 6 chủng từ ruột cá Thu, 10 chủng từ ruột cá Chép. Sử dụng phương pháp khuếch tán

thạch vào tủ nuôi 37°C trong 24h. Căn cứ vào việc xuất hiện vòng ức chế vi khuẩn gây bệnh để xác định khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh. Hoạt tính được đánh giá bằng hiệu số D – d (mm). Trong đó: D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d là đường kính lỗ thạch. Mức độ đối kháng của *Bacillus* với mầm bệnh được phân loại dựa trên kích thước đường kính vòng kháng khuẩn: Đường kính từ 6-8mm (+), 10-12mm (++), > 12mm (+++) hoặc không tạo vòng vô khuẩn (-). Đối chứng dương (PC) là giếng có bổ sung 50 μ l 0,1g/L Streptomycin, đối chứng âm (NC) là giếng có chứa 50 μ l NaCl 0,9% [8].

ly tâm thu tế bào và tiến hành tách chiết DNA. Khuếch đại gene 16S rRNA và đọc trình tự đoạn gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn chọn lọc [14]. Trình tự DNA 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 phân tích so sánh trình tự gen và xử lý số liệu sử dụng phần mềm CLUSTAL X ver. 1.83.

trên giếng thạch để kiểm tra khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn phân lập. Kết quả đánh giá khả năng đối kháng của các chủng đã phân lập được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Khả năng đối kháng của các chủng vi sinh vật được chọn lọc

Tên chủng	S. aureus	V. harveyi	V. para-heamolyticus	E. coli	S. typhi	Tên chủng	S. aureus	V. harveyi	V. para-heamolyticus	E. coli	S. typhi
Nguồn phân lập từ nem chua						Nguồn phân lập từ ruột cá Rô phi					
N1	+++	-	-	-	-	RP1	+++	+++	+++	-	+++
N2	-	-	-	-	-	RP2	-	-	-	-	-
N3	++	-	-	-	-	RP3	-	-	-	-	-
N4	+++	++	+	-	-	RP4	-	-	-	-	-
N5	++	-	-	-	-	RP5	-	-	-	-	-
N6	-	-	-	-	-	RP6	-	-	-	-	-
N7	+++	++	-	-	-	RP7	-	-	-	-	+++
N8	+,5	-	-	-	-	Nguồn phân lập từ ruột cá Thu					
N9	++	++	-	-	-	TH1	++	-	-	-	-
N10	-	-	-	-	-	TH2	-	-	-	-	-
N11	-	-	-	-	-	TH3	+++	+++	-	-	-
N12	-	-	-	-	-	TH4	-	-	-	-	-
Nguồn phân lập từ dưa muối						TH5	+++	+++	-	-	-
DM1	-	-	-	-	+++	TH6	-	+++	-	-	-
DM2	+++	-	-	-	-	Nguồn phân lập từ ruột cá Trắm					
DM3	+++	+++	-	-	++	TR1	+++	+++	+++	-	+++
DM4	-	-	-	-	+++	TR2	-	-	-	-	-
DM5	-	-	-	-	+++	TR3	-	-	-	-	-
DM6	-	-	-	-	+++	TR4	-	-	-	-	-
DM7	-	-	-	-	+++	TR5	-	-	-	-	+++
DM8	-	-	-	-	+++	TR6	-	-	-	-	-
DM9	-	-	-	-	+++	TR7	-	-	-	-	-
DM10	+++	-	-	-	-	TR8	-	-	-	-	+++
DM11	+++	+++	-	-	-	TR9	-	-	-	-	+++
DM12	+++	-	-	-	-	TR10	-	-	-	-	+++
DM13	-	-	-	-	+++	TR11	-	-	-	-	+++
DM14	+++	-	-	-	-	TR12	-	-	-	-	+++
DM15	-	-	-	-	+++	TR13	-	-	-	-	+++
Nguồn phân lập từ kim chi						Nguồn phân lập từ ruột cá Chép					
KC1	-	+++	-	-	-	CH1	-	-	-	-	-
KC2	-	+++	-	-	-	CH2	-	+++	+++	-	+++
KC3	+	-	-	-	-	CH3	-	-	-	-	-
KC4	++	-	-	-	-	CH4	++	+++	+++	-	+++
KC5	+	-	-	-	-	CH5	-	+++	+++	-	+++
KC6	-	++	-	-	-	CH6	++	+++	+++	-	+++
KC7	-	-	-	-	-	CH7	++	+++	+++	-	+++
ĐC(+)	+++	+++	+++	+++	+++	CH8	+	+++	+++	-	+++
ĐC(-)	-	-	-	-	-	CH9	++	+++	+++	-	+++
						CH10	-	-	-	-	-
						ĐC(+)	+++	+++	+++	+++	+++
						ĐC(-)	-	-	-	-	-

Đường kính từ 6-8mm (+); 10-12mm (++), > 12mm (+++) hoặc không tạo vòng vô khuẩn (-).

Kết quả thu được cho thấy, 26/70 chủng kháng *S. aureus* kích thước vòng kháng khuẩn 8 – 17 mm, có 20/70 chủng kháng *V. harveyi*, có 10/70 chủng kháng *V. paraheamolyticus* và có 26/70 chủng kháng *Salmonella typhi*. Trong đó có 2 chủng RP1 và TR1 cho khả năng kháng 4 chủng vi khuẩn gây bệnh *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*,

Salmonella typhi với đường kính vòng kháng khuẩn RP1 lần lượt là 14, 13, 12 và 12 mm, và đường kính vòng kháng khuẩn TR1 đối với *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*, *Salmonella typhi* lần lượt là 17, 13, 13 và 13 mm. Các chủng RP1 và TR1 được làm thuần và kiểm tra đường kính kháng khuẩn được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của 2 chủng RP1, TR1

Tên chủng	Đường kính vòng kháng khuẩn của các vi khuẩn gây bệnh (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. paraheamolyticus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>
RP1	16,75 ^b ±0,35	13,5 ^b ±0,71	17,5 ^b ±0,71	-	11,75 ^b ±1,06
TR1	15,00 ^c ±0,00	12,0b±0,00	13,5 ^b ±0,71	-	10,75 ^b ±0,35
ĐC	27,75 ^a ±0,35	22,0 ^a ±1,41	24,0 ^a ±1,41	27,0 ^a ±1,41	20,50 ^a ±0,71

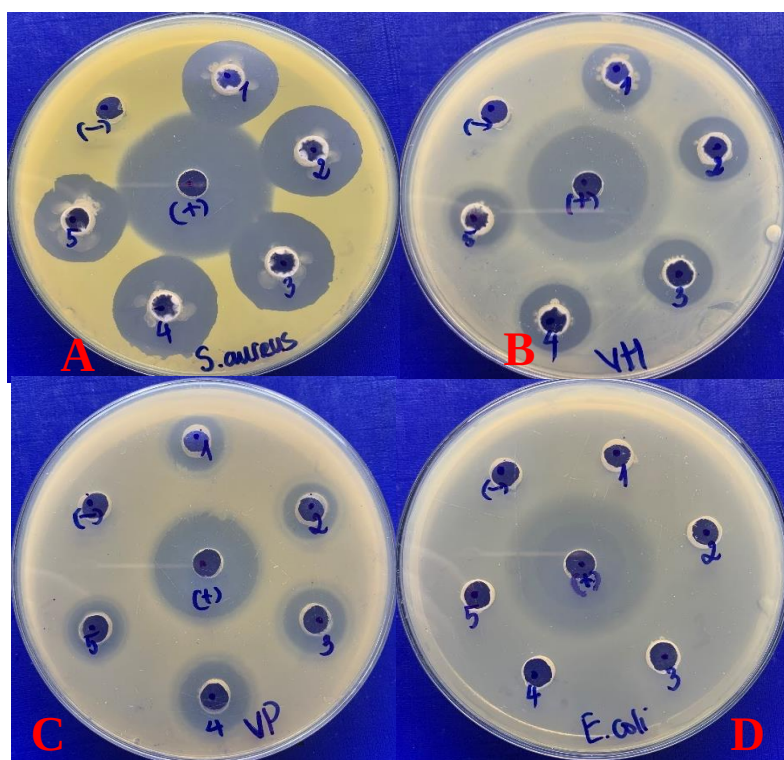
Trong mỗi cột, các giá trị có chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$)).

Chủng RP1 phân lập từ ruột cá rô phi có khả năng kháng *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*, *Salmonella typhi* tốt nhất trong 70 dòng khảo sát với đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 16,75 mm, 13,50 mm, 17,50 mm và 11,75 mm không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa ở mức ý nghĩa thống kê $p < 0.05$. Vì vậy, chủng RP1 cho thấy tiềm năng về khả năng sinh tổng hợp Bacteriocin cao hơn các chủng phân lập còn lại và được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết

quả nghiên cứu phù hợp với công bố của Aishwarya và cộng sự, 2021 chủng *Bacillus* U5, được phân lập từ các mẫu đất của các khu vực khác nhau của Thung lũng Kathmandu có khả năng kháng khuẩn với các loại vi khuẩn gây bệnh khác nhau: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) và *E. coli* sản xuất beta-lactamase phổ rộng (ESBL) [15].

3.2. Đánh giá đặc tính sinh học của chủng RP1

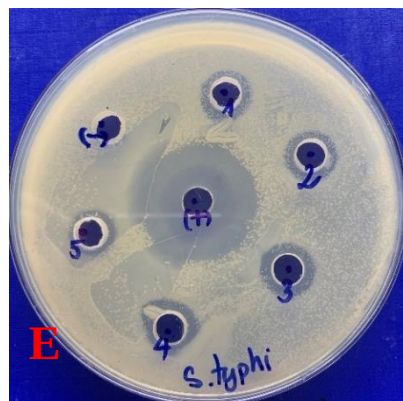
Tiến hành nuôi cấy các đời sau mỗi lần cấy rìa làm thuần chủng để test sự ổn định hoạt tính kháng khuẩn của chủng RP1 đối với *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*, *E. coli*, *S. typhi* cho thấy chủng RP1 thể hiện hoạt tính ổn định với 5 vi khuẩn gây bệnh kết quả thể hiện ở Hình 1 và Bảng 3.



Hình 1. Khả năng kháng khuẩn của chủng RP1 qua các thế hệ (từ 1 đến 5)

Kháng các chủng vi khuẩn kiểm định: *S. aureus* (A), *V. harveyi* (B), *V. paraheamolyticus* (C), *E. coli* (D), *S. typhi* (E); (+): Đối chứng dương (PC), dung dịch kháng sinh Streptomycin (0,1g/L); (-): Đối chứng âm (NC), nước đã vô trùng; 1: thế hệ 1; 2: thế hệ 2; 3: thế hệ 3; 4: thế hệ 4; 5: thế hệ 5.

Qua 5 đời nuôi cấy, chủng RP1 thể hiện hoạt tính ổn định với 4 chủng vi khuẩn kiểm định *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*, *S. typhi* và không có hoạt tính kháng khuẩn với *E. coli*. Kết quả



hoạt tính kháng khuẩn RP1 thể hiện qua các thế hệ nuôi cấy có ở Bảng 3.

Bảng 3. Hoạt tính kháng khuẩn RP1 thể hiện qua các thế hệ nuôi cấy

Các thế hệ nuôi cấy	Đường kính vòng kháng khuẩn của các vi khuẩn gây bệnh (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. paraheamolyticus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>
1	19	15	12	-	11
2	21	14	12	-	11
3	21	14	13	-	10
4	22	15	15	-	11
5	19	13	12	-	11
ĐC	32	26	23	19	16

Giá trị biểu hiện ở các cột: Đường kính vòng kháng khuẩn(mm).

(-): Không có biểu hiện kháng khuẩn, vi khuẩn phát triển bình thường.

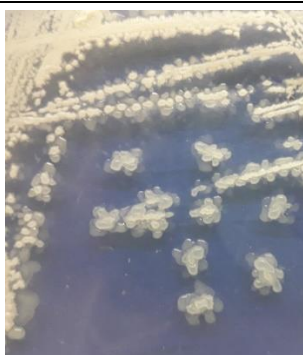
Từ Bảng kết quả cho thấy, chủng RP1 trải qua 5 đời nuôi cấy đều cho hoạt tính kháng khuẩn ổn định với *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*, *S. typhi* và không kháng *E. coli*. Qua 5 đời nuôi cấy đường kính vòng kháng *S. aureus* dao động 19 – 22 mm, *V. harveyi*: 13 – 15 mm, *V. paraheamolyticus*: 12 – 15 mm và *S. typhi* là 10 – 11 mm.

Khi cấy trong môi trường LB-agar thì chủng RP1 đều mọc theo đường cấy

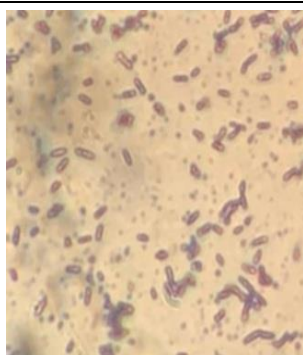
chúng tỏ chủng RP1 không có khả năng di động. Thử nghiệm catalase với chủng RP1 có hiện tượng hình thành bọt khí, chứng tỏ chủng này có enzyme catalase phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 . Kết quả nhuộm Gram cho thấy chủng RP1 bắt màu tím (vi khuẩn Gram dương). Hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào và một số đặc điểm sinh học của chủng RP1 được thể hiện ở Bảng 4 và Hình 2.

Bảng 4. Một số đặc điểm sinh học của chủng RP1

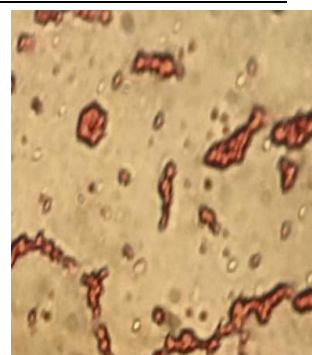
Đặc điểm	Chủng vi khuẩn RP1
Hình dạng tế bào	Hình que
Sắp xếp tế bào	Đơn, đôi, đám
Nhuộm màu Gram	Gram dương (+)
Hình dạng khuẩn lạc	Trắng đục, nhớt, có viền 5-6 cánh xung quanh
Khả năng di động	Không
Khả năng sinh bào tử	Sau 48 giờ
Hoạt tính catalase	Có



a. Khuẩn lạc



b. Tế bào



c. Bào tử

Hình 2. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng RP1

Chủng RP1 kháng khuẩn dựa trên vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc của chúng trong quá trình nuôi cấy sơ cấp trên đĩa thạch agar (hình 2). Trong một nghiên cứu tương tự do Rai và cộng sự 2017 thực hiện, các khuẩn lạc có vùng hào quang trong suốt được coi là sinh ra kháng sinh. Sự cạnh tranh để phát triển của một loại sinh vật có trong mẫu bị ức chế bởi các sinh vật khác đánh dấu ranh giới mà

không có sinh vật nào phát triển tạo ra vùng hào quang [16]. Theo kết quả hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào của chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được, tham chiếu theo kết quả phân loại của Holt và cộng sự, 1994 [17] bước đầu nhận định chủng vi khuẩn RP1 thuộc họ *Bacillus*. Tuy nhiên cần tiếp tục phân tích trình tự rRNA 16S của chủng vi khuẩn này để định danh đến tên loài của chúng.

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

Tiến hành PCR khuếch đại đoạn 16S rDNA với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3') được điện di trên thạch agarose 1,2% [18]. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy khuếch đại thành công mẫu RP1 vạch sản phẩm có kích thước trong khoảng 1400bp. Để xác định danh pháp đến mức loài, các chủng vi khuẩn sau khi thực hiện phản ứng PCR sẽ tiến hành giải trình tự nucleotide ở đoạn gen 16S rRNA

[19]. Trình tự nucleotide của chủng sau khi giải mã tiến hành so sánh với các loài vi khuẩn được lưu trữ từ ngân hàng dữ liệu gen của NCBI. DNA tổng số của chủng RP1 được tách và tinh sạch được sử dụng để nhân đoạn gen trên 16S-RNA. Khi so sánh trình tự 16S rDNA của chủng RP1 với dữ liệu ngân hàng gen bằng chương trình BLAST. Trình tự 16S-r RNA được xác định và trình bày trên Hình 3 và Hình 4.



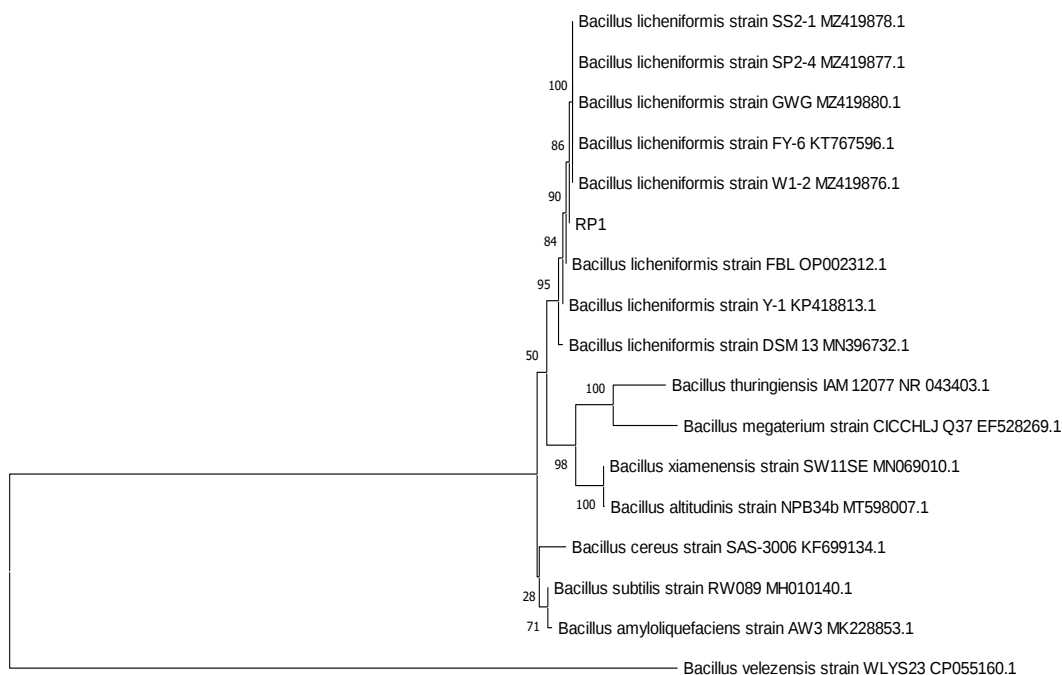
Hình 3. Kết quả phản ứng PCR khuếch đại gen 16S rDNA của chủng RP1, M: Marker 16S+: Chủng dương 16S

Từ đoạn trình tự được giải mã của chủng trên, tiến hành tìm kiếm những trình tự nucleotide của các chủng tương đồng với trình tự của chủng RP1 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 RP1 cây phân loại được lập dựa vào phần mềm là

Mega11 [20]. Sự tương đồng về trình tự nucleotide của RP1 và 16 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 RP1 với 16 chủng vi khuẩn đó được thể hiện trong Hình 4.

CTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTCAGCGGCGGACGGGT
 GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACCGGGGCTAATACCGGAT
 GCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCG
 GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
 ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
 AATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCTGTT
 GTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGG
 CTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
 GCGCGCGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAAA
 CTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGTAATCCACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGT
 GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
 AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTC
 CGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT
 CAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGCAACAGCGGTGGGATTCACACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGT
 CCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGGCAGAGTGACA
 GGTGGTGTCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
 TTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAGCTGGGCTACACACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGT
 AGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAA
 CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 CCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGG
 AGCCAGCCGCCGAA

Hình 4. Trình tự 16S-r RNA đầy đủ của chủng RP1



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn chọn lọc RP1 với các trình tự gen trên GenBank có mức độ tương đồng cao nhất. Giá trị trên cây phân loại thể hiện giá trị bootstrap, giá trị bootstrap càng cao thể hiện sự chính xác và độ tin cậy càng cao cho từng nhánh cây.

Căn cứ vào cây phân loại và bảng so sánh mức độ tương đồng về trình tự nucleotide của chủng vi sinh vật RP1 và trình tự gen của 16 chủng vi khuẩn

Bacillus (trên Genbank) đã được biết trình tự, một số nhận xét như sau:

- Chủng RP1 có chung nguồn gốc phát sinh với 16 chủng vi khuẩn *Bacillus* có

trình tự xác định trên Genbank, do đó có thể khẳng định chủng RP1 là một chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*.

- Chủng RP1 hệ số tương đồng với các chủng thuộc loài *Bacillus licheniformis* là rất cao với giá trị bootstrap trên 80. Bên

cạnh đó, kết quả trình tự nucleotide cho thấy mức độ tương đồng 16S rARN của chủng RP1 với các chủng thuộc loài *Bacillus licheniformis* đều từ 99% – 100%. Xét về mặt giá trị tin cậy và mức độ tương đồng thì RP1 thuộc loài *Bacillus licheniformis*.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, từ 70 mẫu chủng vi khuẩn được phân lập đã sàng lọc được chủng RP1 từ ruột cá rô phi có khả năng sinh Bacteriocin. Chủng RP1 trải qua 5 đời nuôi cấy đều có khả năng sinh Bacteriocin ức chế mạnh vi khuẩn gây bệnh với *S. aureus*, *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus*, *S. typhi* và không kháng *E. coli*. Kết hợp các đặc điểm sinh

học và phương pháp xác định DNA sinh học phân tử, đưa ra kết luận chủng RP1 có quan hệ họ hàng gần gũi với loài *Bacillus licheniformis*. Vì vậy, chủng RP1 có thể là chủng lợi khuẩn tiềm năng trong sản xuất chế phẩm sinh học kiểm soát vi khuẩn gây bệnh trong chăn nuôi và thực phẩm.

Tài liệu tham khảo

1. Vogel V & Spellerberg B. Bacteriocin production by beta-hemolytic Streptococci. *Pathogens*. 2021;10:7:867.
2. Sugrue I, O'Connor PM, Hill C, Stanton C & Ross RP. Actinomyces produces defensin-like Bacteriocins (actifensins) with a highly degenerate structure and broad antimicrobial activity. *Journal of Bacteriology*. 2020; 202:4:e00529-19.
3. Ge J, Kang J & Ping W. Effect of acetic acid on bacteriocin production by gram-positive Bacteria. *JMB*. 2019;29:1341–1348.
4. Lê Trọng Bằng. Nghiên cứu phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn biển có khả năng sinh tổng hợp Bacteriocin. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*. 2021;20:4B:333–344.
5. Fallah R, Kiani A & Azarfar A. A review of the role of five kinds of alternatives to in-feed antibiotics in broiler production. *J Vet Med Anim Health*. 2013;5:317-321.
6. Sheng Z, Deli S, Xiaofeng Z, et al. Characterization of *Bacillus subtilis* from gastrointestinal tract of hybrid Hulong grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*) and its effects as probiotic additives. *Fish & Shellfish Immunology*. 2019;84:1115-1124.
7. Firmino J, Furones MD, Andree KB, et al. Contrasting outcomes of *Vibrio harveyi* pathogenicity in gilthead seabream, Sparus aurata and European seabass Dicentrarchus labrax. *Aquaculture* 2019;511:734210.
8. Nishie M, Nagao JI, et al. Antibacterial Peptides “Bacteriocins”: An Overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Science*. 2012;17:1–16.
9. Settanni L & Corsetti A. Application of Bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol*. 2008;121:123–138.
10. Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB & Gálvez A. Diversity and applications of Bacillus Bacteriocins. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. 2011; 35:1:201-232.
11. Đỗ Thị Bích Thủy, Phan Thị Bé & Đoàn Thị Thanh Thảo. Định danh và nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng lên khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào của *Bacillus subtilis* DC5. *Tạp chí Sinh học*. 2015;37:1:177-183.
12. Aishwarya T, Anupa B, Anupama S, et al. Isolation, Identification and Screening of *Bacillus* species with Antimicrobial Activity from Different Soil Samples of Kathmandu Valley. *Nepal Journal of Biotechnology*. 2021;9 (2): 1-6.
13. Pramila E, Sachin ME, et al. Characterization of dual Bacteriocins producing *Bacillus subtilis* SC3.7 isolated from fermented food.

- LWT-Food Science and Technology. 2021;154:112854.
14. Weisburg WG, Barns SM, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 1991;173:697–703.
 15. Jiang H, Zou J, Cheng H, Fang J & Huang G. Purification, characterization, and mode of action of Pentocin JL-1, a novel Bacteriocin isolated from *Lactobacillus pentosus*, against drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. 2017;7657190.
 16. Rai M, Aryal S, Parajuli P. Characterization and activity of antimicrobial polypeptide of *Bacillus spp* from wastelands of Kathmandu valley. *Annals of Applied Bio-Sciences*. 2017;4(1):50-5.
 17. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams và Wilkins, Baltimore. 1994:9.
 18. Cotter PD, Hill C & Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3:10:777-788.
 19. Farmer JJ III, Janda JM, Brenner FW, et al. Genus 1. *Vibrio* Pacini 1854, 411AL. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edn. The *Proteobacteria* part B. The *Gammaproteobacteria*. Springer, New York. 2005;494–546.
 20. Fabbro C, Celussi M, Russell H, et al. Phenotypic and genetic diversity of coexisting *Listonella anguillarum*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio chagassi* recovered from skin haemorrhages of diseased sand smelt, *Atherina boyeri*, in the Gulf of Trieste. *Lett Appl Microbiol*. 2011;54:153–159.