

ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG PROBIOTIC CỦA VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ HỆ TIÊU HÓA CỦA HÀU THÁI BÌNH DƯƠNG *CRASSOSTREA GIGAS* NUÔI TẠI NINH HÒA, KHÁNH HÒA, VIỆT NAM

EVALUATION OF THE POTENTIAL PROBIOTIC ISOLATED FROM THE DIGESTIVE SYSTEM OF PACIFIC OYSTER (*CRASSOSTREA GIGAS*) CULTIVATED IN NINH HOA, KHANH HOA, VIETNAM

Phạm Thị Minh Hải¹, Nguyễn Thị Thanh Hải¹, Lê Nhã Uyên¹

¹Viện Công nghệ sinh học và môi trường, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Phạm Thị Minh Hải, Email: haiptm@ntu.edu.vn

Ngày nhận bài: 17/10/2024; Ngày phản biện thông qua: 29/12/2023; Ngày duyệt đăng: 15/05/2024

TÓM TẮT:

Nghiên cứu này tập trung vào việc đánh giá tiềm năng probiotic của vi khuẩn phân lập từ hệ tiêu hóa của hàu biển Thái Bình Dương (*Crassostrea gigas*) nuôi tại khu vực Ninh Hòa, Khánh Hòa, Việt Nam với định hướng phát triển sản phẩm probiotic phục vụ cho giai đoạn nuôi ấu trùng hàu và nuôi lưu hàu thương phẩm. Qua quy trình phân lập với môi trường MA (Marine agar), nghiên cứu đã thu nhận 22 chủng vi khuẩn từ hệ tiêu hóa của hàu, gồm 15 chủng gram dương và 7 chủng gram âm. Khả năng kháng khuẩn, sinh enzyme ngoại bào, hoạt tính gây tan máu và khả năng chịu mặn là các tiêu chí được sử dụng để sàng lọc các chủng vi khuẩn định hướng probiotic. Khả năng kháng khuẩn đối với *Vibrio parahaemolyticus* và sinh enzyme ngoại bào (protease, amylase, cellulase) được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Hoạt tính gây tan máu (hemolytic activity) được xác định trên môi trường thạch BA (Blood agar). Khả năng chịu mặn được xác định bằng phương pháp đo độ đục ở bước sóng 600nm. Sau quá trình sàng lọc, thu nhận được 3 chủng BS2, N5 và N7 đều có khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 43996, có khả năng chịu mặn đến nồng độ NaCl 4%, và sinh enzyme ngoại bào protease, cellulase, và amylase. Hơn nữa, 3 chủng này đều cho kết quả âm tính trong kiểm tra sàng lọc tan huyết sử dụng đĩa thạch máu. Sau khi thực hiện định danh bằng chỉ thị 16S rRNA, N5 và N7 được xác định thuộc nhóm *Bacillus cereus* với độ tương đồng 100%, BS2 là chủng *Enterobacter hormaechei* với độ tương đồng 99,93%.

Từ khóa: hàu Thái Bình Dương, *Crassostrea gigas*, probiotic, kháng khuẩn, sinh enzyme ngoại bào, tan máu

ABSTRACT:

This study focuses on assessing the probiotic potential of bacteria isolated from the digestive system of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) cultivated in the Ninh Hoa region, Khanh Hoa, Vietnam, aimed at developing probiotic products for hatchery growth and depuration process of commercial oyster. Through isolation procedures using Marine agar medium, the research collected 22 bacterial strains from the oyster digestive system, comprising 15 gram-positive strains and 7 gram-negative strains. Criteria such as antibacterial activity, extracellular enzyme production, hemolytic activity, and salt tolerance were used to screen the bacterial strains for potential probiotic. Antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus* and extracellular enzyme production (protease, amylase, cellulase) were evaluated using agar diffusion methods. Hemolytic activity was determined on Blood agar medium. Salt tolerance was assessed by measuring turbidity at a wavelength of 600nm. Following the screening process, three strains—BS2, N5, and N7—demonstrated resistance to *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 43996, with salt tolerance up to 4% NaCl concentration, and exhibited extracellular enzyme production of protease, cellulase, and amylase. Furthermore, these three strains tested negative in hemolysis assays using blood agar plates. Upon 16S rRNA sequencing, N5 and N7 were identified as *Bacillus cereus* with a 100% similarity, while BS2 was classified as *Enterobacter hormaechei* with a 99.93% similarity.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong số hơn 100 loại hào đang được sử dụng làm thực phẩm và được đánh giá là món ẩm thực cao cấp trên khắp thế giới, hào Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* (TBD) là một trong những loại được nuôi và tiêu thụ nhiều nhất (1). Hào TBD có chứa một lượng lớn acid amin thiết yếu ($12,20 \div 14,14 \text{ g (100 g)}^{-1}$), trong số đó leucine ($2,81 \div 3,29 \text{ g (100 g)}^{-1}$) và lysine ($2,79 \div 3,28 \text{ g (100 g)}^{-1}$) là chủ yếu. Thịt hào TBD cũng rất giàu acid béo không bão hòa đa, chiếm $42,26\% \div 45,24\%$ tổng acid béo trong đó hàm lượng DHA là $18,53\% \div 21,16\%$ tổng lượng acid béo và EPA là $17,23\% \div 18,68\%$ tổng lượng acid béo. Hào còn chứa một hàm lượng khoáng chất (Mg, Zn, Fe và Cu) đáng kể so với các loài thủy hải sản khác (2). Ngoài các đặc điểm dinh dưỡng cao như các loài hào nói chung, hào TBD đã được giới nghiên cứu báo cáo có giá trị dinh dưỡng đặc biệt liên quan đến các peptide sinh học có giá trị trong lĩnh vực thực phẩm sức khỏe như peptide có thể ức chế men chuyển angiotensin I (ACE) (3), hỗn hợp peptit giàu cysteine có khả năng kháng khuẩn (4); hoạt chất thủy phân có hoạt tính chống khối u và tác dụng kích thích miễn dịch trong chuột BALB/c (5); dịch thủy phân từ hào Thái Bình Dương còn có khả năng chống viêm (Qian và cs., 2020) hay tăng cường hormone nam (6).

Probiotic mang lại lợi ích *in vivo* cho vật chủ thông qua các thuộc tính như sản xuất chất kháng khuẩn, cạnh tranh loại trừ mầm bệnh, điều hòa miễn dịch và kiểm soát hệ vi sinh vật chung (7). Tồn thất sản phẩm hào xảy ra trong suốt chu kỳ nuôi trồng thủy sản có thể bắt nguồn từ những thay đổi đối với hệ vi sinh vật của hào. Do đó, phát triển chế phẩm probiotic cho hào là một chủ đề được quan tâm nghiên cứu để đạt được những lợi ích như tăng khả năng chống chịu với các biến cố tử vong của hào, kiểm soát chất lượng nước trại giống, hỗ trợ hào phát triển tốt giữa khi môi trường sống thay đổi và thúc đẩy tăng trưởng trong quá trình nuôi hào. Các nghiên cứu tập trung vào đánh giá vai trò của các chủng probiotic được bổ sung vào nước nuôi lưu trước khi đưa hào ra thị trường. Kết quả nghiên cứu cho thấy chế phẩm

probiotic có thể phục hồi hệ vi sinh vật cho hào nhờ đó cải thiện sức khỏe của hào và tăng khả năng bảo quản trong vận chuyển. Đồng thời, probiotic còn có sự đóng góp vào hương vị và kết cấu thịt hào. Các chủng probiotic điển hình đã được thử nghiệm trong nuôi hào là thành viên của nhiều chi có tiềm năng lợi khuẩn như: *Alteromonas*, *Phaeobacter*, *Enterococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Aeromonas*, *Vibrio* và một số trực khuẩn (8). Tuy nhiên, việc sử dụng các chế phẩm sinh học thương mại được phát triển cho các ứng dụng nuôi trồng thủy sản nói chung thường có hiệu quả hạn chế khi áp dụng cho nuôi hào vì có thể các ứng cử viên probiotic này không thích nghi đủ tốt với các điều kiện đặc biệt trong mô hào hoặc có các đặc tính cần thiết cho các mầm bệnh cụ thể của hào (9). Do đó, việc áp dụng các chế phẩm sinh học được phát triển từ các hệ vi sinh tự nhiên tiềm năng của hào cũng đang được quan tâm (10). Các thử nghiệm kiểm tra các ứng viên probiotic được phân lập từ vật chủ mục tiêu cùng với các sản phẩm thương mại có sẵn ban đầu được phát triển cho các sinh vật khác không tìm thấy tác dụng bảo vệ đáng kể nào sau này. Đa số các chủng vi sinh vật được phân lập từ hệ vi sinh vật hào hoặc họ hàng gần của hào luôn hoạt động tốt hơn các sản phẩm probiotic có sẵn trên thị trường (11). Hơn nữa, hiện trên thị trường chưa có sản phẩm probiotic được thương mại hóa riêng cho hào (12).

Nghiên cứu này nhằm đánh giá tiềm năng probiotic của vi khuẩn phân lập từ hệ tiêu hóa của hào TBD nuôi tại khu vực Ninh Hòa, Khánh Hòa, Việt Nam, từ đó định hướng phát triển sản phẩm probiotic phục vụ cho giai đoạn nuôi ấu trùng hào và nuôi lưu hào.

II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Xử lý mẫu và phân lập, làm thuần vi khuẩn từ hệ tiêu hóa của hào

Các mẫu hào được thu nhận tại vùng nuôi Ninh Hòa, Khánh Hòa và được bảo quản lạnh ($5-8^{\circ}\text{C}$) để đảm bảo hào còn sống khi đưa về PTN trường Đại học Nha Trang để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Hào được chà rửa sạch vỏ dưới vòi nước

chảy, sau đó tách lấy cơ thịt và giải phẫu thu nhận phần hệ tiêu hóa của hầu để sử dụng cho quy trình phân lập vi khuẩn từ hệ tiêu hóa của hầu TBD.

Cân 10g mẫu, pha loãng trong nước muối sinh lý và cấy trang trên đĩa thạch MA (Marine Agar), ủ ở 30°C trong 24-48 giờ để thực hiện phân lập vi khuẩn. Tách các dạng khuẩn lạc có khác biệt về mặt hình thái và tiến hành làm thuần.

Các chủng thuần phân lập được bảo quản trên thạch nghiêng chuẩn bị cho thí nghiệm tiếp theo.

2. Sàng lọc vi khuẩn định hướng probiotic

Chủng thuần sau phân lập được nuôi cấy lỏng trong MB (Marine Broth) trong 18 giờ đạt mật độ $10^7 - 10^8$ CFU/ml ở nhiệt độ phòng để làm mẫu trong các thí nghiệm khảo sát.

2.1 Khảo sát khả năng gây tan máu (hemolytic activity)

Phương pháp sàng lọc hoạt tính tan máu được thực hiện bằng cách cấy điểm các chủng phân lập trên môi trường BA (Blood Agar) có bổ sung NaCl 2,5% và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Quan sát vòng tan máu xung quanh vết cấy để xác định khả năng gây tan máu của vi khuẩn.

2.2 Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn phân lập được xác định theo phương pháp khuếch tán giếng thạch với chủng thử nghiệm *V. parahaemolyticus* ACCT43996 (13). Dịch nuôi cấy chủng phân lập được nhỏ vào các giếng thạch và sau 24h quan sát vòng kháng khuẩn trong suốt xuất hiện xung quanh giếng thạch. Chủng *V. parahaemolyticus* ACCT43996 được cung cấp bởi Trung tâm Chất lượng nông lâm thủy sản vùng 3.

2.3 Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào

Chuẩn bị môi trường thạch (MA) bổ sung cơ chất 1% casein, 1% tinh bột, 1% carboxymethyl cellulose để kiểm tra khả năng sinh protease, amylase, và cellulase tương ứng. Đục giếng thạch và nhỏ dịch nuôi cấy của chủng khảo sát vào giếng. Sau 24 giờ, nhận diện vòng phân giải enzyme được nhận diện bằng thuốc thử HgCl₂ 0,3% đối với protease, 1% lugon đối với

amylase, 0,3% congo đỏ đối với cellulase.

2.4 Khảo sát khả năng chịu mặn

Chuẩn bị 5 ống nghiệm chứa 10ml môi trường TSB (Trypticase Soy Broth) với các nồng độ NaCl tương ứng 0%, 1%, 2%, 3% và 4% để nuôi cấy vi khuẩn thử nghiệm ở 30°C. Sau 24 giờ đo độ đục các ống nuôi cấy ở bước sóng 600nm.

3. Định danh các chủng sàng lọc

3.1 Định danh sơ bộ chủng sàng lọc bằng quan sát hình thái và các thử nghiệm sinh hoá

Một số thử nghiệm sinh hóa được thực hiện nhằm sơ bộ định danh vi khuẩn bao gồm: thử nghiệm Oxidase trên đĩa giấy có tấm N-dimethyl-para phenylenediamine; thử nghiệm catalase bằng H₂O₂ 3%; thử nghiệm Methyl red - Voges Proskauer trên môi trường MR-VP; thử nghiệm indol trong canh tripton với thuốc thử Kovac's; thử nghiệm lên men đường, sinh H₂S, sinh hơi trên KIA.

3.2 Định danh vi sinh vật các chủng sàng lọc để tuyển chọn bằng sinh học phân tử

Khuẩn lạc của các chủng sàng lọc được thu nhận và thực hiện tách chiết DNA, khuếch đại vùng 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR, và giải trình tự bằng bộ hóa chất BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit trên máy ABI 3500. Tiếp theo, so sánh trình tự thu được với ngân hàng dữ liệu NCBI để định danh chủng vi khuẩn sàng lọc được lựa chọn.

Việc định danh vi khuẩn sàng lọc được thực hiện bởi Công ty TNHH AND LOCI, Thành phố HCM, Việt Nam.

4. Phương pháp trình bày và xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Kết quả nghiên cứu là trung bình cộng các giá trị và được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excell 2013. Đồ thị được vẽ bằng Microsoft Excell 2013.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân lập vi khuẩn từ hệ tiêu hóa hầu Thái Bình Dương

Nghiên cứu đã phân lập được 22 chủng vi khuẩn từ hệ tiêu hóa của mẫu hầu thu nhận tại Ninh Hòa, Khánh Hòa (Bảng 1). Chủng vi khuẩn phân lập được làm thuần, bảo quản

chúng trong ống thạch nghiêng và trong glycerol 20% ở -80°C. Từ 22 chủng phân lập

được, nghiên cứu thực hiện thử nghiệm sàng lọc khả năng làm probiotic cho hầu.

Bảng 1: Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của 22 chủng phân lập được từ hào biển Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* nuôi tại Ninh Hòa, Khánh Hòa.

STT	Mã chủng	Đặc điểm khuẩn lạc					Hình thái tế bào	
		Màu sắc	Hình dạng	Bìa	Nhân	Bề mặt	Gram	Dạng tế bào
1	N1	Vàng nhạt	Tròn	Răng cưa	Không	Nhẵn	-	Hình cầu đơn
2	N2	Vàng nhạt	Tròn	Nguyên	Không	Nhẵn	+	Hình cầu đơn
3	N3	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Không	Nhẵn	+	Hình cầu đơn
4	N4	Vàng nhạt	Tròn	Nguyên	Không	Nhẵn	-	Hình que ngắn
5	N5	Vàng nhạt	Tròn	Nguyên	Có	Nhẵn	+	Hình que ngắn, chuỗi ngắn, bào tử nằm giữ tế bào
6	N6	Vàng nhạt	Tròn	Nguyên	Có	Nhẵn	+	Hình que đơn ngắn
7	N7	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Không	Nhẵn	+	Hình que dài, chuỗi ngắn
8	N8	Cánh gián	Tròn, ở giữa lõi	Nguyên	Có	Nhẵn	+	Hình que ngắn chuỗi dài
9	N9	Cánh gián	Tròn, ở giữa lõi	Nguyên	Có	Nhẵn	+	Hình que ngắn
10	N10	Cánh gián	Tròn, ở giữa lõi	Nguyên	Có	Nhẵn	-	Hình que đơn ngắn
11	N11	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Không	Nhẵn	+	Hình cầu chuỗi ngắn
12	N12	Cánh gián	Tròn, ở giữa lõi	Nguyên	Có	Nhẵn	+	Hình que ngắn chuỗi dài
13	L1	Vàng nhạt	Tròn	Mọc loang	Không	Nhẵn	-	Hình cầu chùm
14	L2	Vàng nhạt	Tròn	Mọc tràn	Không	Nhẵn	+	Hình cầu đơn
15	L3	Vàng nhạt	Tròn	Mọc loang	Không	Nhẵn	+	Hình cầu chùm
16	L4	Cánh gián	Tròn	Nguyên	Không	Nhẵn	+	Hình cầu chùm
17	L5	Vàng nhạt	Tròn	Mọc tràn	Không	Nhẵn	+	Hình cầu đơn
18	L6	Vàng nhạt	Tròn	Mọc loang	Không	Nhẵn	-	Hình que chùm ngắn
19	L7	Vàng nhạt	Vô định hình	Mọc loang	Không	Nhẵn	+	Hình cầu chùm ngắn
20	L14	Vàng nhạt, đục	Tròn	Răng cưa	Không	Nhẵn	+	Hình cầu chùm
21	BS1	Trắng đục	Tròn	Răng cưa	Không	Xù xì	-	Hình cầu đơn cặp
22	BS2	Vàng nhạt	Tròn	Nguyên	Có	tron nhẵn	-	Hình que ngắn,

2. Kết quả sàng lọc vi khuẩn định hướng probiotic

2.1. Kết quả xác định khả năng gây tan máu

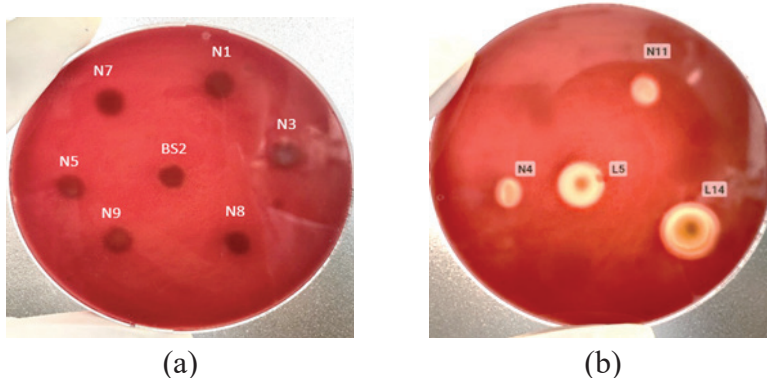
Để đảm bảo tính an toàn cho chủng vi khuẩn định hướng probiotic, thí nghiệm xác định khả

năng gây tan máu được thực hiện như điều kiện tiên quyết để sàng lọc và loại bỏ các chủng có khả năng sản xuất hemolysin (enzyme tan máu) có thể gây tác động tiêu cực đến sức khỏe vật chủ, bao gồm viêm nhiễm và tổn thương

tế bào máu. Hoạt tính gây tan máu của chủng phân loại được đánh giá dựa trên cơ sở lý giải tế bào hồng cầu trong môi trường xung quanh khuẩn lạc. Nếu vùng quanh khuẩn lạc trên đĩa thạch máu xuất hiện vòng phân giải màu xanh là tán huyết α , vùng trong suốt là tán huyết β , và không xuất hiện gì là tán huyết γ . Chỉ những chủng có kết quả tán huyết γ mới được coi là an

toàn cho việc sử dụng làm probiotic (14).

Kết quả cho thấy 4 chủng N4, N11, L5, L14 thể hiện hoạt tính tan máu dạng β , vòng tan máu trong suốt, hồng cầu bị phá hủy hoàn toàn. Như vậy, sàng lọc khả năng gây tan máu đã loại bỏ 4 chủng vi khuẩn phân lập từ hệ tiêu hóa của hải TBD, còn lại 18 chủng được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1: Hình ảnh vòng tan máu của chủng phân lập
Vòng tan máu γ , (b) Vòng tan máu β .

2.2 Kết quả xác định khả năng kháng khuẩn

V. parahaemolyticus là vi khuẩn kỵ khí tùy nghi gram âm thường được tìm thấy ở môi trường ven biển và trên cá, tôm, động vật có vỏ nuôi ở biển (15). *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên nhiều đối tượng thủy sản, đồng thời là vi

khuẩn gây viêm dạ dày - ruột trên người ở tất cả các quốc gia ven biển với nguyên nhân chủ yếu là do ăn hải sản (16). Kết quả tìm được ba chủng có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* gồm N5, N7 và BS2 (Bảng 2).

Bảng 2: Vòng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* ACCT 43996 thu nhận được từ thí nghiệm sàng lọc 18 chủng phân lập từ hệ tiêu hóa của hải TBD nuôi tại Ninh Hòa, Khánh Hòa.

Mã chủng	Vòng kháng khuẩn D-d (mm)	Đánh giá mức độ kháng khuẩn (17)
N5	6±0,9	Yếu
N7	10±0,8	Trung bình
BS2	15±0,4	Mạnh

Từ kết quả thí nghiệm, BS2 là chủng thể hiện khả năng kháng *V. parahaemolyticus* mạnh nhất. Với định hướng sàng lọc chọn chủng có tiềm năng làm probiotic cho đối tượng nuôi trồng thủy sản biển, kháng *V. parahaemolyticus* là một trong những đặc tính quan trọng cần có của chủng probiotic. Vì vậy ba chủng này được sử dụng khảo sát khả năng sinh enzyme, khả năng chịu muối tiếp theo.

2.3 Kết quả xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào

Trong nuôi trồng thủy sản, probiotic được

mô tả như một chất bổ sung vi khuẩn sống có tác động hữu ích lên vật chủ bằng cách hỗ trợ tiêu hóa (18) và kích thích hệ thống miễn dịch của vật chủ (19). Do đó, sản xuất enzyme ngoại bào là một tính năng quan trọng của probiotic mang lại tác dụng có lợi cho vật chủ về mặt hấp thụ thức ăn và cải thiện chất lượng nước nuôi trồng bằng cách phân hủy các hợp chất hữu cơ, bao gồm amylase, protease và cellulase (29). Từ kết quả sàng lọc, cả 3 chủng N5, N7 và BS2 đều có khả năng sinh enzyme ngoại bào protease, cellulase và amylase với vòng phần

Bảng 3: Kết quả sàng lọc khả năng sinh enzyme ngoại bào của 3 chủng N5, N7 và BS2.

Ký hiệu chủng	Kích thước vòng phân giải enzyme (D – d) (mm)		
	Protease	Cellulase	Amylase
N5	7±0,5	8±0,6	7±0,3
N7	6±0,3	8±0,6	7±0,3
BS2	12±0,5	10±0,5	10±0,5

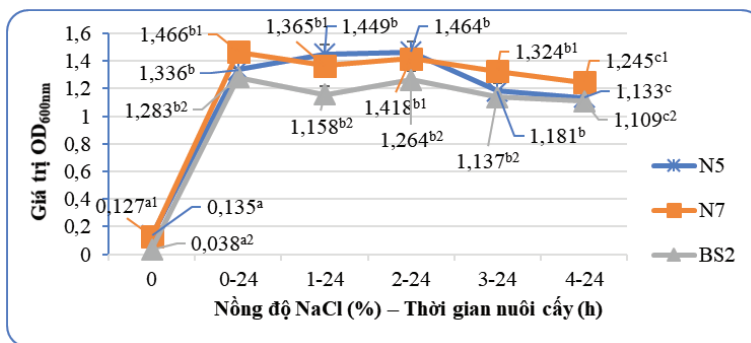
giải 6-12 (mm) (Bảng 3). Trong đó, chủng BS2 tổng hợp enzyme ngoại bào có hoạt tính mạnh nhất với vòng phân giải từ 10-12 (mm).

2.4 Kết quả xác định khả năng chịu mặn của chủng sàng lọc

Để làm probiotic cho đối tượng nuôi biển nói chung và nuôi hàu biển nói riêng, các loài vi khuẩn phải có khả năng phát triển trong nước biển hay có khả năng chịu mặn. Độ mặn của nước là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của hàu TBD. Theo công bố

của Horodesky và cộng sự (21), hàu TBD phát triển tối ưu ở độ mặn 0,4-4%, và không phát triển tốt khi độ mặn nhỏ hơn 0,2% và lớn hơn 5%. Do đó, trong thí nghiệm này, độ mặn 1, 2, 3 và 4 (%) đã được sử dụng làm thông số đánh giá khả năng chịu mặn của các chủng sàng lọc.

Các chủng phân lập từ mẫu nội tạng hàu hầu hết có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối 1%. Kết quả trên Hình 1 thể hiện khả năng sinh trưởng ổn định của ba chủng vi khuẩn N5, N7, BS2 ở nồng độ muối >3%.



a, b, c cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa (p<0.05) của các giá trị OD đo được trên cùng chủng sàng lọc
Hình 2: Kết quả đo OD các chủng sàng lọc có bổ sung NaCl 1-4(%) sau 24h.

Kết quả đo OD ở mẫu tại thời điểm 0 giờ và các mẫu sau 24 giờ nuôi cấy có sự khác biệt có ý nghĩa (p<0.05) cho thấy các vi khuẩn sinh trưởng tốt trong thời gian nuôi cấy. Sau 24 giờ, cả ba chủng N5, N7 và BS2 ít bị ảnh hưởng bởi độ mặn từ nồng độ NaCl 1-3%. Từ độ mặn 4%, OD các chủng khảo sát mới có sự khác biệt có ý nghĩa. Đây cũng là độ mặn phù hợp với môi

trường nước biển và trong nội tạng hàu.

3. Kết quả định danh vi khuẩn

Từ các kết quả thu nhận của quá trình sàng lọc chủng có tiềm năng probiotic, cả 3 chủng N5, N7 và BS2 đều cho kết quả phù hợp bước đầu cho đối tượng định hướng là probiotic cho hàu TBD. Do đó, cả 3 chủng N5, N7 và BS2 được lựa chọn để thực hiện việc định danh vi khuẩn.

Bảng 4: Kết quả các thí nghiệm sinh hóa của 3 chủng N5, N7 và BS2

Mã chủng	Catalase	Oxidase	MR	VP	Indol	SCA	Thử nghiệm KIA			
							Glucose	Lactose	H ₂ S	Sinh hơi
N5	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
N7	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
BS2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+

Từ các kết quả sinh hóa ở Bảng 4, bước đầu có thể xác định 2 chủng N5 và N7 thuộc nhóm *Bacillus* sp. (22) và BS2 thuộc nhóm *Enterobacteriace* sp. (23).

Từ kết quả giải trình tự và so sánh trình tự trên ngân hàng gen NCBI, N5 và N7 thuộc “nhóm *Bacillus cereus*” (*Bacillus cereus* group) với mức tương đồng 100%, BS2 là chủng *Enterobacter hormaechei* với mức tương đồng 99,93%.

Nhóm *Bacillus cereus* bao gồm một số loài *Bacillus* có đặc điểm phát sinh loài gần gũi gồm *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* và *B. toyonensis* (24). Các thành viên của nhóm *Bacillus cereus* thường được biết đến là vi khuẩn gây độc gây ra các triệu chứng bệnh cho người và động vật. Hiện nay, có một vài sản phẩm probiotic được triển khai trên thị trường có chủng thuộc nhóm *Bacillus cereus* như Toyocerin VR (*B. cereus* var. *toyo* BCIMB 40112/CNCM I-1012) được Liên minh Châu Âu chấp nhận với lý do gen mã hóa cho các độc tố ruột là gen lặn và không tạo ra độc tố hoạt động. Tuy nhiên, một số sản phẩm probiotic thương mại khác như PaciflorVR C10 (*B. cereus* IP5832) và Esporafeed PlusVR (*B. cereus* CECT 953) sử dụng cho sản phẩm thức ăn chăn nuôi đều bị thu hồi do khả năng sản xuất 2 loại độc tố ruột gây tiêu chảy và mang gen kháng tetracycline di động (tetB) (SCAN 1999, 2001). Theo FAO, việc không có tiềm năng độc hại là điều kiện tiên quyết với các ứng cử viên được sử dụng cho chế phẩm sinh học, do đó việc làm rõ tiềm năng probiotic của các

chủng thuộc nhóm *Bacillus cereus* và đánh giá khả năng gây độc của nhóm này vẫn đang là vấn đề cần được làm rõ thêm (25).

Enterobacter hormaechei được suy đoán có khả năng ức chế sự phát triển của một số chủng vi khuẩn gây bệnh như *Pseudomona*, và làm thay đổi thành phần vi khuẩn đường ruột của ấu trùng rệp cánh đen (26). Nhóm nghiên cứu của Ghosh (27) báo cáo *Enterobacter hormaechei* phân lập từ ruột cá đối thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt với 59% mầm bệnh của tôm được thử nghiệm (vùng ức chế 10-15mm).

Như vậy, mặc dù đều thỏa mãn các điều kiện sàng lọc ban đầu đối với chủng tiềm năng probiotic cho hàu, *Enterobacter hormaechei* được đánh giá cao về độ an toàn cho chế phẩm sinh học hơn các chủng thuộc nhóm *Bacillus cereus*.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Từ hệ tiêu hóa của mẫu hàu Thái Bình Dương *Crassostrea gigas* nuôi tại Ninh Hòa, Khánh Hòa, Việt Nam, nghiên cứu đã thu nhận được 22 chủng vi khuẩn, trong đó có 15 chủng gram dương và 7 chủng gram âm. Sau quá trình sàng lọc khả năng gây tan máu, kháng khuẩn *V. parahaemolyticus*, sinh enzyme ngoại bào và chịu mặn, 3 chủng N5, N7 và BS2 cho các kết quả tốt nhất. Việc định danh sử dụng chỉ thị 16S rRNA đã giúp xác định N5 và N7 thuộc nhóm *Bacillus cereus* và BS2 là chủng *Enterobacter hormaechei*. Do các tranh cãi về độ an toàn của các chủng vi khuẩn thành viên của nhóm *Bacillus cereus* khi ứng dụng là probiotic, *Enterobacter hormaechei* được lựa chọn để nghiên cứu tiếp với định hướng probiotic cho hàu biển Thái Bình Dương *Crassostrea gigas*.

Tài liệu tham khảo

1. Botta, R., F. Asche, J. S. Borsum and E. V. Camp, (2020). “A review of global oyster aquaculture production and consumption”. *Marine Policy* 117: 103952.
2. Zhu, Y., Q. Li, H. Yu, and L. Kong, (2018). “Biochemical Composition and Nutritional Value of Different Shell Color Strains of Pacific Oyster *Crassostrea gigas*”. *Journal of Ocean University of China* 17(4): 897-904.
3. Je, J.-Y., J.-Y. Park, W.-K. Jung, P.-J. Park and S.-K. Kim, (2005). “Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*”. *Food Chemistry* 90(4): 809-

814.

4. Liu, Z., S. Dong, J. Xu, M. Zeng, H. Song and Y. Zhao, (2008). “Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin”. Food Control **19**(3): 231-235.
5. Wang, X., H. Yu, R. Xing, S. Liu, X. Chen and P. Li, (2020). “Optimization of Oyster (*Crassostrea talienwhanensis*) Protein Hydrolysates Using Response Surface Methodology.” Molecules **25**(12).
6. Zhang, W., Y. Wei, X. Cao, K. Guo, Q. Wang, X. Xiao, X. Zhai, D. Wang and Z. Huang, (2021). “Enzymatic preparation of *Crassostrea* oyster peptides and their promoting effect on male hormone production”. Journal of Ethnopharmacology **264**: 113382.
7. Martínez Cruz, P., A. L. Ibáñez, O. A. Monroy Herмосillo and H. C. Ramírez Saad, (2012). “Use of probiotics in aquaculture.” ISRN microbiology 916845-916845.
8. Yeh, H., S. A. Skubel, H. Patel, D. Cai Shi, D. Bushek and M. L. Chikindas, (2020). “From Farm to Fingers: an Exploration of Probiotics for Oysters, from Production to Human Consumption.” Probiotics and Antimicrobial Proteins **12**(2): 351-364.
9. Macías OL, Ojeda-Ramírez JJ, Campa-Córdova AI, Saucedo PE, (2010). Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. J World Aquac Soc 41:447–454. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00386.x>
10. Hoseinifar, S. H., Y.-Z. Sun, A. Wang and Z. Zhou, (2018). “Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives.” Frontiers in microbiology **9**: 2429-2429.
11. Kang C-H, Gu T, So J-S, (2018). Possible probiotic lactic acid bacteria isolated from oysters (*Crassostrea gigas*). Probiotics Antimicrob Proteins 10:728–739. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9315-5>
12. Ringø E., (2020). “Probiotics in shellfish aquaculture.” Aquaculture and Fisheries **5**(1): 1-27.
13. Sivakumar N., Sundararaman M., Selvakumar G., (2012). Probiotic effect of *Lactobacillus acidophilus* against vibriosis in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) Afr. J. Biotechnol. **11**:15811–15818
14. Mangia, N.P., Saliba, L. & Deiana, P., (2019). Functional and safety characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* FS103 isolated from sheep cheese and its survival in sheep and cow fermented milks during cold storage. Ann Microbiol **69**, 161–170. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1416-1>
15. Guo, S., Zhang, Z., and Guo, L., (2022a). Antibacterial molecules from marine microorganisms against aquatic pathogens: a concise review. Mar. Drugs **20**:230. doi: 10.3390/md20040230
16. Shimohata T., Takahashi A., (2010). Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Med. Investig; **57**:179–182. doi: 10.2152/jmi.57.179.
17. Jiang, N.; Hong, B.; Luo, K.; Li, Y.; Fu, H.; Wang, J., (2023). Isolation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* with Anti-*Vibrio parahaemolyticus* Activity and Identification of the Anti-*Vibrio parahaemolyticus* Substance. Microorganisms **11**, 1667. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071667>.
18. Vine N.G., Leukes W.D., Kaiser H., (2006.) Probiotics in marine larvi-culture. FEMS Microbiol Rev. **30**(3):404–427.
19. Villamil L., Figueras A., Novoa B., (2003). Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus*) Fish Shellfish Immunol. **14**:157–164.

20. Thurlow, C.M.; Williams, M.A.; Carrias, A.; Ran, C.; Newman, M.; Tweedie, J.; Allison, E.; Jescovitch, L.N.; Wilson, A.E.; Terhune, J.S., (2019). *Bacillus velezensis* AP193 exerts probiotic effects in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and reduces aquaculture pond eutrophication. *Aquaculture* 503, 347–356.
21. Horodesky, A., Westphal, G.G.C., Cozer, N., Rossi, V.G., and Ostrensky, A., (2019). Effects of salinity on the survival and histology of oysters *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757). *Bioscience Journal* [online], vol. 35, no. 2, pp. 586–597. DOI 10.14393/BJ-v35n2a20198-42099.
22. Kunihiro Shinagawa, (1990). Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, 10, 125-142.
23. O'hara C. M., Steigerwalt, A. G., Hill, B. C., Farmer III. J. J., Fanning, G. T., and Brenner, D. J., (1989). *Enterobacter Hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group 75. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.27, No.9, P. 2046-2049.
24. Liu Y, Lai Q, Göker M, Meier-Kolthoff JP, Wang M, Sun Y, Wang L, Shao Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci Rep* 5:14082 10.1038/srep14082.
25. Yifang Cui, Erwin Märthlbauer, Richard Dietrich, Hailing Luo, Shuangyang Ding and Kui Zhu, (2019). Multifaceted toxin profile, an approach toward a better understanding of probiotic *Bacillus cereus*, *Critical Reviews in Toxicology*, DOI: 10.1080/10408444.2019.1609410
26. Zhang Quian, Shumin Wang, Xinyu Zhang, Kexin Zhang, Wenjuan Liu, Ruiling Zhang and Zhong Zhang (2021). *Enterobacter hormaechei* in the intestines of housefly larvae promotes host growth by inhibiting harmful intestinal bacteria. *Parasites & Vectors*, 14:598.
27. Ghosh S., Ringo E., Deborah G. S. A., Rahiman K. M. M., and Hatha A. A. M., (2011). *Enterobacter hormaechai* BAC 1010 from the gut of flathead grey mullet as probable aquaculture probiotic. *Journal of Nature Science and Sustainable Technology*, Vol 5, No 3. ISSN: 1933-0324.