

## ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA CHỦNG *Bacillus* sp. P4 SINH TRƯỞNG TRONG MÔI TRƯỜNG CHỨA TẢO

Bùi Hương Giang<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Minh<sup>1,2</sup>, Ngô Thị Hoài Thu<sup>1,2</sup>,  
Chu Nhật Huy<sup>1,2</sup>, Lê Thị Ánh Tuyết<sup>1</sup>, Hoàng Phương Hà<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Vi khuẩn probiotics đang được ứng dụng rộng rãi trong nuôi thủy sản bởi chúng có khả năng sinh enzyme hỗ trợ tiêu hóa và ức chế vi khuẩn gây bệnh cho vật nuôi. Việc sản xuất sinh khối probiotics thường phụ thuộc vào các thành phần đất nền như cao thịt, cao nấm men, pepton... do đó làm tăng giá thành sản phẩm thu được. Bột tảo khô là nguồn dinh dưỡng giàu protein, polysaccharide, chất xơ và đặc biệt có chứa hàm lượng cao các axit béo không no đa nối đôi (PUFAs) có rất nhiều tác dụng và vai trò khác nhau. Trong nghiên cứu này, các loại tảo khô *Nannochloropsis*, *Isochrysis galbana* và *Spirulina platensis* đã được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng duy nhất trong môi trường sinh trưởng của chủng lợi khuẩn P4 để đánh giá khả năng sinh enzyme tiêu hóa và kháng lại vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus*. Kết quả cho thấy, chủng P4 đạt mật độ tế bào  $(23,8 \pm 2,33) \times 10^7$  CFU/mL ở môi trường chứa 1% tảo *S. platensis*, cao gấp 4 lần với trong môi trường MPA sau 48 giờ lên men. Thí nghiệm cũng chỉ ra khi bổ sung amoni, nitrat hay urê vào môi trường chứa tảo là không phù hợp để cải thiện hoạt tính probiotic của chủng, nhưng với môi trường nuôi chứa *S. platensis* (1%) bổ sung thêm mật rỉ đường (1%) không chỉ giữ được hoạt tính sinh enzyme amylase, protease, cellulase của chủng P4 với kích thước vòng phân giải cơ chất lần lượt là 11, 27, 20 mm mà còn làm tăng khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh với kích thước vòng kháng khuẩn lên đến 22 mm. Chủng P4 được định danh là *Bacillus* sp. P4 khi so sánh độ tương đồng của gen 16S rRNA. Như vậy mật rỉ đường kết hợp với sinh khối tảo khô *S. platensis* có thể là môi trường thích hợp cho sinh trưởng và sản xuất sinh khối chủng *Bacillus* sp. P4, nhằm tạo nên một sản phẩm lên men có hoạt tính probiotic tốt đồng thời vẫn chứa các thành phần PUFAs đã có trong tảo, rất quan trọng và cần thiết cho động vật thủy sản.

**Từ khóa:** Hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa, mật rỉ đường, ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, *S. platensis*, vi khuẩn có lợi.

### MỞ ĐẦU

Probiotic là các vi khuẩn có lợi bao gồm các vi khuẩn lactic, *Bacillus* hay nấm men... Chúng được đề xuất như một biện pháp bổ sung vào chế độ ăn giúp chống lại các bệnh liên quan đến rối loạn tiêu hóa đường ruột bởi khả năng sinh ra các enzyme và hợp chất kháng khuẩn tốt như axit lactic, hydrogen peroxide và bacteriocin (Szczerbiac *et al.*, 2022). Cho nên, nhu cầu sử dụng sinh khối của nhóm vi khuẩn có lợi này ngày càng tăng để có thể được dùng như các kháng sinh tự nhiên thay thế cho kháng sinh tổng hợp, giúp ngăn ngừa sự bùng phát của vi khuẩn gây bệnh trong nuôi thủy sản. Tuy nhiên, chất lượng và giá thành chế phẩm probiotic phụ thuộc rất nhiều vào chủng giống vi sinh vật, điều kiện nuôi và thành phần môi trường lên men. Việc lựa chọn cơ chất phù hợp cho môi trường lên men với giá thành giảm, nhưng lại kích thích sinh hoạt chất sinh học cũng như làm tăng mật độ của vi sinh vật có lợi trong quá trình sản xuất probiotic sẽ giúp nâng cao giá trị sản phẩm tạo thành.

Sinh khối khô các loài tảo bao gồm cả vi tảo và vi khuẩn lam là nguồn dinh dưỡng giàu protein, polysaccharide, axit béo không bão hòa đa nối đôi (PUFAs), carotenoid, vitamin và khoáng chất (Raheem *et al.*, 2018). Đặc biệt các ấu trùng cũng như giai đoạn trưởng thành của động vật thủy sản không thể tự tổng hợp được các PUFAs như Eicosapentaenoic (EPA), Arachidonic acid (AA) và Docosahexaemoic acid (DHA) nên chúng phải được bổ sung thông qua chuỗi thức ăn chứa vi tảo. Một số nghiên cứu cho thấy thành phần chất xơ (prebiotics) trong sinh khối tảo có tác dụng kích thích sinh trưởng của vi khuẩn có lợi (Gotteland *et al.*, 2020). Khi các vi khuẩn được sinh trưởng trong môi trường chứa sinh khối tảo đã làm tăng khả năng sống sót trong điều kiện cực trị như pH thấp, muối mật, phenol (Sylwia, Elzbieta., 2020). Việc bổ sung *Desmodesmus maximus*, *Chlorococcum* sp., và vi khuẩn lam *Spirulina platensis* cũng có thể làm tăng đáng kể mật độ của *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*. Hiện nay các công nghệ nuôi tảo đã được phát triển nhiều, từ đó tạo ra lượng lớn sinh khối tảo với chi phí thấp. Ví dụ như tảo *Isochrysis galbana* và *Nannochloropsis oculata* có thể được nuôi trong các hệ thống nuôi kín dạng tấm với mật độ lên tới 200-500 triệu tb/mL và năng suất trung bình đạt 0,9 g/L/ngày (Phạm *et al.*, 2015).

Trong một vài nghiên cứu thăm dò về hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn phân lập được, chủng P4 đã thể hiện được tính trội về một số đặc tính sinh học. Do đó trong nghiên cứu này, chủng P4 được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng, hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa và kháng khuẩn của nó khi được lên men trên nền sinh khối tảo. Đây là định hướng nghiên cứu mới, chi phí đầu tư thấp, ổn định và an

toàn. Mở ra khả năng sản xuất chế phẩm probiotics trên quy mô lớn kết hợp hai trong một, vừa phát huy các hoạt tính sinh học của lợi khuẩn, vừa giữ được các PUFAs có trong tảo là thành phần rất cần thiết cho động vật thủy sản.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn P4 được phân lập từ ruột tôm tại huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu, chủng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus* được lưu giữ trong bộ chủng giống của phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường. Sinh khối các loại tảo khô gồm: *Nannochloropsis*, *Isochrysis galbana*, *Spirulina platensis* sử dụng trong các thí nghiệm do phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Môi trường MPA gồm các thành phần (g/L): NaCl (5), peptone (10), cao thịt (5); nước cất đủ 1 lít; pH 7-7,2. Đối với môi trường thạch bổ sung thêm 20 g/L agar (Trần *et al.*, 2018).

Môi trường chứa sinh khối tảo được chuẩn bị bằng cách bổ sung sinh khối khô vào dung dịch đệm PBS (Phosphate Buffered Saline) ở pH 7, sau đó được khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

### Phương pháp nghiên cứu

**Đặc điểm sinh học:** Hình thái khuẩn lạc được xác định theo phương pháp vi sinh vật học cơ bản, hình thái tế bào được nhuộm Gram và soi trên kính hiển vi (Nguyễn *et al.*, 2003).

### Đánh giá hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa

Khả năng sinh một số loại enzyme tiêu hóa được xác định theo phương pháp của Phạm và đồng tác giả (2024):

Sinh khối chủng vi khuẩn P4 được tăng sinh trong môi trường MPA ở 30°C. Sau 48 giờ nuôi lắc, ly tâm thu dịch.

Chuẩn bị các đĩa thạch chứa môi trường có bổ sung 1% từng loại cơ chất là tinh bột, casein và carboxymethyl cellulose (CMC) để kiểm tra khả năng sinh amylase, protease và cellulase tương ứng. Tiến hành đục lỗ thạch rồi nhỏ 100  $\mu$ L mẫu vào các giếng, trong đó, đối chứng âm là dịch môi trường MPA không chứa vi khuẩn, giếng còn lại là dịch nuôi cấy của chủng khảo sát. Sau 24 giờ nuôi tĩnh ở 30°C, vòng phân giải enzyme được nhận diện bằng thuốc thử lugol, quan sát và đo đường kính các vòng sáng màu trên nền thạch chứa cơ chất so với giếng đối chứng âm là môi trường MPA.

### Khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*

Khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn nghiên cứu được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo Phạm và đồng tác giả (2024) với chủng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*. Vi khuẩn gây bệnh đã chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau và được trải đều trên đĩa thạch MPA. Tạo giếng thạch, nhỏ 100  $\mu$ L dịch lên men chủng P4 (đã ly tâm loại bỏ tế bào) vào các giếng thạch. Ủ ở 30°C trong 24 giờ, quan sát đường kính vòng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh.

**Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn:** Được kiểm tra theo phương pháp xác định mật độ vi khuẩn ở độ pha loãng tối hạn, sau đó được cấy trên môi trường MPA thạch để đếm khuẩn lạc.

### Đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn P4 trên môi trường chứa sinh khối tảo

Sinh khối tảo khô *Nannochloropsis*, *Isochrysis galbana*, *Spirulina platensis* lần lượt được hòa trong đệm PBS với tỷ lệ 1% (w/v) để tạo ra các môi trường nuôi vi khuẩn khác nhau, môi trường MPA được sử dụng làm đối chứng dương. Bổ sung dịch sinh khối vi khuẩn P4 (mật độ tế bào  $10^8$  CFU/mL) vào các môi trường đã chuẩn bị với tỷ lệ 5% (v/v). Sau 48 giờ nuôi lắc ở 30°C, kiểm tra lại mật độ vi khuẩn trên môi trường MPA, hoạt tính sinh enzyme và kháng *V. parahaemolyticus* của chủng P4 khi sinh trưởng trong môi trường chứa tảo, sau đó so sánh với môi trường MPA.

### Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ bổ sung đến hoạt tính kháng khuẩn và sinh enzyme tiêu hóa của chủng P4

**Ảnh hưởng của nguồn cacbon:** Sử dụng lần lượt các nguồn cacbon khác nhau như glucose, tinh bột và mật rỉ đường với nồng độ 1% để bổ sung vào đệm PBS đã chứa 1% sinh khối tảo khô.

**Ảnh hưởng của nguồn nitơ:** Các nguồn nitơ ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ , hay urê với nồng độ 0,1% được bổ sung vào đệm PBS đã chứa 1% sinh khối tảo khô.

Bổ sung 5% (v/v) sinh khối vi khuẩn P4 (mật độ  $10^8$  CFU/mL) vào các môi trường đã chuẩn bị. Sau 48 giờ nuôi trong điều kiện hiếu khí ở 30°C kiểm tra hoạt tính sinh enzyme và khả năng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* để lựa chọn nguồn cacbon và nitơ phù hợp.

### Xác định vị trí phân loại của vi khuẩn

Mẫu vi khuẩn P4 được tách DNA tổng số và nhân bản đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi 27F/1492R. Trình tự đoạn gen 16S rRNA được so sánh độ tương đồng với các trình tự gen được đăng ký trên ngân hàng Genbank để xác định vị trí phân loại của chủng vi khuẩn nghiên cứu.

## Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Số liệu được xử lý bằng Microsoft Office Excel 2022. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình  $\pm$  Sai số chuẩn.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

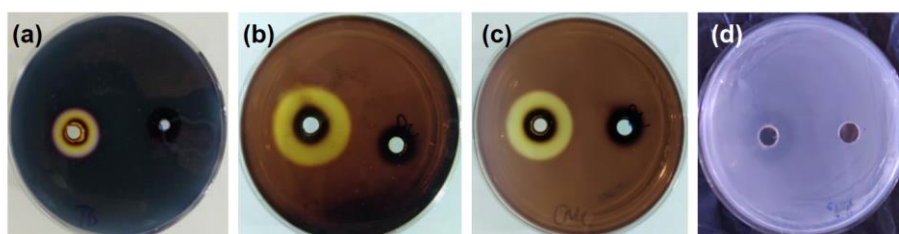
### Đặc điểm hình thái, hoạt tính kháng khuẩn và sinh tổng hợp enzyme của chủng P4

Chủng vi khuẩn P4 được hoạt hóa để xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào, nhuộm Gram. Sau đó, đánh giá khả năng sinh enzyme và kháng vi khuẩn gây bệnh. Kết quả chỉ ra ở Hình 1 cho thấy, chủng P4 thuộc vi khuẩn Gram dương, khuẩn lạc có hình tròn, màu trắng đục, kích thước 2-3 mm, tế bào hình que khi được chụp trên kính hiển vi.

Khi bổ sung dịch nuôi vi khuẩn P4 vào đĩa thạch chứa lần lượt các cơ chất như tinh bột, casein và CMC có thể quan sát được các vòng phân giải tạo thành (Hình 2 a-c), điều này chứng minh khả năng sinh enzyme amylase, protease và cellulase của chủng. Bên cạnh đó, một số lợi khuẩn được biết đến có khả năng tiết các hợp chất sinh học như axit lactic, hydrogen peroxide và bacteriocin... có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh, nên chủng P4 cũng được tiến hành đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* nhằm sử dụng chủng vi khuẩn này thay thế kháng sinh tổng hợp trong ức chế vi khuẩn gây bệnh, ứng dụng trong nuôi thủy sản. Kết quả đã cho thấy, chủng P4 có khả năng ức chế sự phát triển của *V. parahaemolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn là 9 mm (Hình 2d).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc chủng P4 (trái); ảnh nhuộm Gram tế bào chủng P4 (phải)



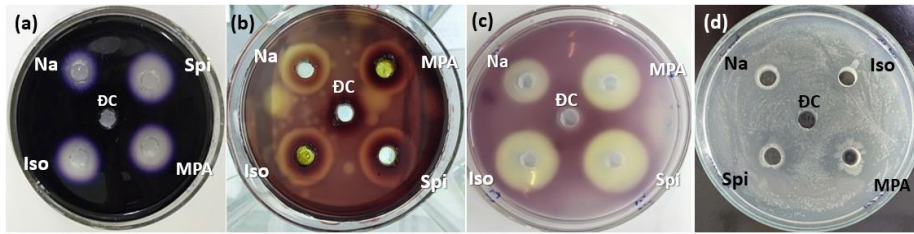
Hình 2. Vòng phân giải enzyme (a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) vòng kháng *V. parahaemolyticus*

### Khả năng sinh trưởng của chủng P4 trên các môi trường chứa sinh khối tảo

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu lựa chọn được nguồn tảo khô phù hợp giúp kích thích sinh trưởng của chủng vi khuẩn nghiên cứu nhằm thay thế cho môi trường MPA truyền thống. Chủng P4 được nuôi trong môi trường chứa riêng rẽ 1% (w/v) từng loại tảo *Nannochloropsis*, *Isochrysis galbana* hoặc *Spirulina platensis*. Sau 48 giờ nuôi cấy, vi khuẩn P4 đạt mật độ tế bào cao nhất trong môi trường chứa tảo *S. platensis* với giá trị  $(23,8 \pm 2,33) \times 10^7$  CFU/mL, trong khi ở môi trường MPA chỉ đạt  $(5,2 \pm 1,01) \times 10^7$  CFU/mL, cao hơn trên 4 lần so với môi trường MPA (Bảng 1 và Hình 3).

Bảng 1. Đánh giá đặc tính sinh học của chủng *B. subtilis* P4 trong các môi trường chứa sinh khối tảo

Loại môi trường có bổ sung sinh khối tảo	Mật độ tế bào CFU/mL	Đường kính vòng hoạt tính D-d (mm)			
		Amylase	Protease	Cellulase	Kháng khuẩn
<i>Nannochloropsis</i>	$(7,4 \pm 0,32) \times 10^6$	5 $\pm$ 0,2	18 $\pm$ 0,5	16 $\pm$ 0,1	-
<i>I. galbana</i>	$(10,1 \pm 0,4) \times 10^7$	9 $\pm$ 0,3	20 $\pm$ 1,0	19 $\pm$ 0,12	7 $\pm$ 0,44
<i>S. platensis</i>	$(23,8 \pm 2,33) \times 10^7$	10 $\pm$ 1,0	21 $\pm$ 1,0	18 $\pm$ 1,11	8 $\pm$ 0,3
MPA	$(5,2 \pm 1,01) \times 10^7$	9 $\pm$ 0,8	20 $\pm$ 0,3	18 $\pm$ 0,2	9 $\pm$ 0,5



Hình 3. Hoạt tính sinh tổng hợp enzyme và kháng khuẩn của P4 trong môi trường nuôi cấy có bổ sung các loại sinh khối tảo khô khác nhau (a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) Kháng *V. parahaemolyticus*

Bên cạnh giá trị mật độ tế bào, chủng P4 cũng có khả năng sinh các enzyme tiêu hóa tốt nhất trong môi trường chứa tảo *S. platensis* với kích thước vòng phân giải cơ chất tinh bột, casein và CMC lần lượt là 10, 21, 18 mm, kết quả này có cao hơn so với khi sinh trưởng trong môi trường MPA. Cùng với đó, kích thước vòng kháng vi khuẩn *V. paraharmolyticus* của chủng P4 trên các môi trường đều nằm trong khoảng 7-9 mm. Khi được nuôi cấy trong môi trường chứa tảo *Nannochloropsis*, chủng P4 không thể hiện được khả năng kháng khuẩn cùng với đó là hoạt tính sinh enzyme kém hơn các môi trường còn lại. Kết quả này chỉ ra rằng, việc sử dụng sinh khối tảo *S. platensis* thay thế cho môi trường MPA có thể duy trì được đặc tính probiotic của P4. Do vậy, sinh khối tảo *S. platensis* sẽ được lựa chọn thử nghiệm trong các nghiên cứu tiếp theo.

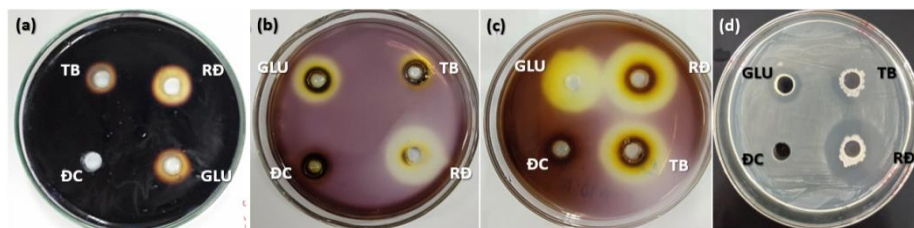
### Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa và kháng khuẩn của chủng P4

Báo cáo của Anto và đồng tác giả (2006) công bố rằng, việc bổ sung lactose vào môi trường nuôi cấy sẽ kích thích khả năng tổng hợp  $\alpha$ -amylase ngoại bào của chủng *Bacillus cereus* MTCC 1305, nên trong nghiên cứu này một số nguồn cacbon, nitơ cũng được bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy nhằm tăng khả năng sinh enzyme tiêu hóa và ức chế vi khuẩn gây bệnh của chủng *B. subtilis* P4.

Ba nguồn cacbon thử nghiệm gồm glucose, tinh bột, mật rỉ đường được bổ sung riêng rẽ vào môi trường chứa sinh khối tảo *S. platensis* 1%. Kết quả chỉ ra ở Bảng 3, Hình 4 cho thấy, khi sử dụng nguồn cacbon là glucose và tinh bột đã làm giảm hoạt tính sinh enzyme amylase của vi khuẩn nghiên cứu. Trong khi đó, đường kính vòng kháng khuẩn của P4 đã tăng lên gấp 2 lần khi bổ sung 1% mật rỉ đường vào môi trường chứa sinh khối tảo *S. platensis* mà vẫn giữ được hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa, thậm chí còn cao hơn so với khi nuôi cấy trong môi trường MPA. Mật rỉ đường là hỗn hợp của nhiều loại đường đơn và đường đa, vì vậy khi bổ sung nguồn cacbon này trong môi trường nuôi cấy, vi khuẩn có thể dễ dàng sử dụng các loại đường này trong nhiều quá trình chuyển hóa khác nhau. Đây có thể là nguyên nhân giúp tăng hoạt tính sinh học của vi khuẩn nghiên cứu khi so sánh với môi trường bổ sung glucose hay tinh bột. Trong nghiên cứu của Mawarda và đồng tác giả (2018) cũng cho thấy, vi khuẩn *Nocardia* sp. V1 có hoạt tính ức chế *Rhodotorula* sp. và *Fusarium graminearum* tăng lên trong môi trường chứa mật rỉ đường. Do đó mật rỉ đường được lựa chọn là nguồn cacbon phù hợp bổ sung trong môi trường chứa tảo *S. platensis* 1% để nhân nuôi lợi khuẩn P4.

Bảng 3. Đường kính vòng phân giải thể hiện hoạt tính probiotics chủng P4 sinh trưởng trong các nguồn cacbon

Đặc tính probiotics	<i>S. platensis</i> + Glucose D-d (mm)	<i>S. platensis</i> + tinh bột D-d (mm)	<i>S. platensis</i> + mật rỉ đường D-d (mm)
$\alpha$ -amylase	9 ± 1,2	7 ± 1,11	11 ± 0,58
Protease	16 ± 0,9	12 ± 1,2	27 ± 0,76
Cellulase	15 ± 1,0	14 ± 1,0	20 ± 0,3
Kháng khuẩn	5 ± 0,4	8 ± 1,53	22 ± 1,16



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt tính enzyme và kháng khuẩn của chủng P4 (a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) Kháng *V. parahaemolyticus*

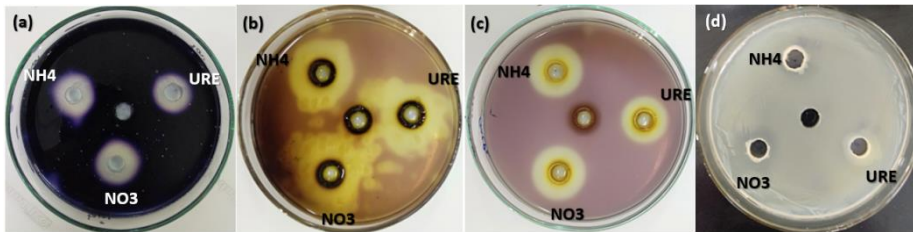
### Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa và kháng khuẩn của chủng P4

Dựa trên các kết quả được trình bày trong Bảng 4 việc bổ sung 3 nguồn nitơ amoni, nitrat và urê vào môi trường chứa sinh khối tảo *S. platensis* không cải thiện đáng kể hoạt tính sinh enzyme của chủng P4, đường kính vòng

phân giải các cơ chất tinh bột, casein và CMC cũng không tăng so với môi trường chứa 1% rỉ mật đường. Hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* của chủng P4 chỉ thể hiện trong môi trường bổ sung nitrat với đường kính vòng kháng khuẩn chỉ đạt 12 mm. Như vậy có thể nhận định, việc bổ sung thêm nguồn nitơ không cải thiện được hoạt tính probiotics của chủng P4.

**Bảng 4. Đường kính vòng phân giải thể hiện hoạt tính probiotics chủng P4 sinh trưởng trong các nguồn nitơ**

Đặc tính probiotics	<i>S. platensis</i> + Amoni D-d (mm)	<i>S. platensis</i> + Nitrat D-d (mm)	<i>S. platensis</i> + Urê D-d (mm)
α-amylase	15 ± 1,8	15 ± 0,75	13 ± 0,25
Protease	25 ± 1,27	21 ± 0,29	21 ± 0,67
Cellulase	18 ± 0,79	20 ± 1,67	17 ± 1,28
Kháng khuẩn	-	12 ± 0,39	-



**Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt tính enzyme và kháng khuẩn của chủng P4 (a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) Kháng *V. parahaemolyticus***

**Xác định vị trí phân loại của vi khuẩn**

Dựa trên các kết quả nghiên cứu trên, chủng vi khuẩn P4 phân lập có hoạt tính sinh học tốt khi sinh trưởng trong môi trường chứa 1% sinh khối tảo *Spirulina platensis* và 1% mật rỉ đường. Chủng P4 được sử dụng để đánh giá vị trí phân loại. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy P4 có độ tương đồng đến 98 % với chủng *Bacillus subtilis*, nên P4 được đặt tên là *Bacillus* sp. P4 với mã số đăng ký trên ngân hàng gen là PQ057067 (không thể hiện bằng hình ảnh).

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài cơ sở chọn lọc: “Nghiên cứu cải tiến để phát triển lợi khuẩn trong môi trường tảo giàu axit béo không bão hòa đa nối đôi (PUFAs) chứa ω-3, ω-6 nhằm định hướng làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng”, mã số: CSCL08.02/24-25 do TS. Hoàng Phương Hà làm chủ nhiệm.

**KẾT LUẬN**

Chủng vi khuẩn P4 có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong môi trường chứa 1% sinh khối tảo *Spirulina platensis* so với các loại tảo khác *Nannochloropsis*, *Isochrysis galbana* đạt mật độ tế bào đạt  $(23,8 \pm 2,33) \times 10^7$  CFU/mL, cao gấp 4 lần khi sinh trưởng trong môi trường MPA. Bổ sung nguồn cacbon là mật rỉ đường 1% trong môi trường chứa tảo *S. platensis* 1% giúp chủng *B. subtilis* P4 tăng khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* mà vẫn giữ được hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa tốt. Thành phần nitơ như amoni, nitrat hay urê không có tác dụng kích thích khả năng sinh enzyme tiêu hóa và kháng khuẩn. Chủng vi khuẩn ký hiệu P4 đã được định danh là *Bacillus* sp. P4 thông qua so sánh độ tương đồng của trình tự gen 16S rRNA trên Gen Bank. Vì vậy môi trường chứa *S. platensis* (1%) + mật rỉ đường (1%) được lựa chọn là môi trường phù hợp để nuôi cấy chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. P4 thay cho môi trường truyền thống MPA, định hướng ứng dụng trong sản xuất probiotics ở qui mô công nghiệp.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Anto H, Trivedi U and Patel K (2006). Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Food Technol Biotechnol*, 44(2): 241- 245.

Colantoni E, Palone F, Cesi V, Leter B, Sugoni G, Laudadio I, Stronati L (2022). Innovative method to grow the probiotic *Lactobacillus reuteri* in the omega3-rich microalga *Isochrysis galbana*. *Scientific Reports*, 12(1): 3127.

Gotteland M, Riveros K, Gasaly N, et al (2020). The Pros and Cons of using algal polysaccharides as prebiotics. *Front Nutr*, 7:163.

Mawarda P C, Endah E S, Ratnaningrum D, Budiwati T A, Andayani D G S, Pudjiraharti S (2018). Antimicrobial activity of extracellular liquid obtained from molasses fermentation by *Nocardia* sp strain V1. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 160: 012011.

Nguyễn L D, Nguyễn Đ Q - Phạm V T ( 2003), *Giáo trình Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục Việt Nam.

Phạm Đ T, Thu NTH, Hồng ĐD (2015). Nuôi trồng vi tảo biển *Nannochloropsis oculata* trong hệ thống nuôi kín dạng ống. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(2A): 545–549.

Phạm T M H, Nguyễn T T H, Lê N U (2024). Đánh giá tiềm năng probiotic của vi khuẩn phân lập từ hệ tiêu hóa của hàu thái

- binh dương *crassostrea gigas* nuôi tại Ninh Hòa, Khánh Hòa, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 2/2024: 22-30.
- Raheem A, Prinsen P, Vuppaladadiyam AK (2018). A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. *J Clean Prod*, 181:42–59.
- Sylwia Ś, Elżbieta K (2020). Algae *Chlorella vulgaris* as a factor conditioning the survival of *Lactobacillus* spp. in adverse environmental conditions. *LWT*, 133:109936.
- Szczerbiec D, Piechocka J, Głowacki R, Torzewska A (2022). Organic acids secreted by *Lactobacillus* spp. isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Molecules*, 27(17): 5557.
- Trần V C, Bùi V H, Lê T B L, Nguyễn X H, Phạm Q H, Biền V M (2018). *Giáo trình Vi sinh vật học môi trường*. NXB Bách Khoa – Hà Nội.

## EVALUATION OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE *Bacillus* sp. P4 BACTERIAL STRAIN IN THE ALGAE-CONTAINING MEDIUM

Bui Huong Giang<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Minh<sup>1,2</sup>, Ngo Thi Hoai Thu<sup>1,2</sup>,  
Chu Nhat Huy<sup>1,2</sup>, Le Thi Anh Tuyen<sup>1</sup>, Hoang Phuong Ha<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

Probiotic bacteria are commonly used in aquaculture for their ability to produce enzymes that aid in digestion and inhibit disease-causing bacteria in animals. The production of probiotic biomass often relies on costly ingredients like meat extract, yeast extract, and peptones, increasing the overall cost. Dried algae powder is a rich source of protein, polysaccharides, and prebiotics, and it particularly contains high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which have various beneficial effects. In a recent study, dried algae *Nannochloropsis*, *Isochrysis galbana*, and *Spirulina platensis* were used as the sole source of nutrients in the growth medium of probiotic strain P4 to assess its ability to produce digestive enzymes and inhibit against *V. parahaemolyticus* disease. The results indicated that strain P4 achieved a cell density of  $(23.8 \pm 2.33) \times 10^7$  CFU/mL in the medium containing 1% *S. platensis* algae, which was four times higher than in the MPA medium after 48 hours of fermentation. Additionally, the experiment revealed that adding ammonium, nitrate, or urea to the medium with algae did not improve the probiotic activity of the strain. However, a culture medium containing *S. platensis* (1%) and molasses (1%) not only maintained the amylase, protease, and cellulase enzyme activity of strain P4 with substrate-hydrolysis ring sizes of 11, 27, 20 mm, respectively, but also increased the ability to inhibit pathogenic *Vibrio* bacteria with large sizes of antibacterial ring up to 22 mm. The strain P4 was identified as *Bacillus* sp. P4 when comparing the similarity of the 16S rRNA gene. Therefore, a combination of molasses and dried algal biomass *S. platensis* can provide a suitable environment for the growth and production of *Bacillus* sp. P4 strain bacterial biomass, resulting in a fermented product with good probiotic activity while retaining essential PUFAs components in algae, which are crucial for aquatic animals.

**Keywords:** Extracellular enzymes, molasses, *Vibrio parahaemolyticus* inhibition, *S. platensis*, probiotic.

\* Author for correspondence: Tel: +84-988754668; Email: hahongp@gmail.com