



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.037

## PHÂN LẬP VI KHUẨN LIÊN KẾT VỚI HẢI MIỀN Ở HÒN NGHỆ, VÙNG BIỂN HÀ TIÊN, TỈNH KIÊN GIANG, VIỆT NAM

Trần Vũ Phương<sup>1</sup>, Phạm Ngọc Hân<sup>2</sup> và Cao Ngọc Điệp<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>Học viên cao học ngành Công nghệ sinh học K23

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Cao Ngọc Điệp (email: cndiep@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 14/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

### Title:

Isolation of sponge-associated bacteria at Nghe island, Ha Tien sea, Kien Giang, Vietnam

### Từ khóa:

Bacillus, hải miên, hòn Nghệ, kháng khuẩn, vi khuẩn liên kết với hải miên

### Keywords:

Antimicrobial ability, bacteria-associated sponge, Bacillus, Nghe island, sponges

### ABSTRACT

This study was carried out to isolate bacteria associated with the sponges have the ability to create antibacterial activity. 29 sponge samples collected in the waters at Hon Nghe of Ha Tien sea, Kien Giang province, there were 236 bacteria isolated by using MA and SYP media. The survey with 6 strains of pathogenic microorganisms for human and animals, including *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Edwardsiella ictaluri*, showed that 155/236 bacterial isolates were capable of producing antimicrobial agents against at least one of the six referenced strains. Thirteen isolates were selected (SN13d, SN14e, SN12m, SN20e, SN24d, MN26d, MN26g, N1a, N11d, N10a, N6a, N9a) with ability to resistant to three bacteria Gram-negative, Gram-positive and *Candida albicans*. A total of 13 strains were identified including twelve strains belonged to the genus *Bacillus*, and a strain was genus *Halomonas*. *Bacillus tequilensis* N1a strain resistant strongly with *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

### TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm phân lập được những dòng vi khuẩn liên kết với hải miên có khả năng tạo hoạt tính kháng khuẩn. Từ 29 mẫu hải miên sưu tập tại Hòn Nghệ, thuộc vùng biển Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang đã phân lập được 236 dòng vi khuẩn trên 2 môi trường MA (Marine Agar và SYP (Starch-Yesat extract-Peptide)). Qua kết quả khảo sát với 6 chủng vi sinh vật kiểm định gây bệnh cho người và động vật: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* và *Edwardsiella ictaluri*, có 155/236 dòng vi khuẩn có khả năng tạo hoạt chất kháng khuẩn kháng lại ít nhất 1 trong 6 chủng vi sinh vật kiểm định. Tuyển chọn được 13 dòng vi khuẩn (SN13d, SN14e, SN12m, SN20e, SN24d, MN26d, MN26g, N1a, N11d, N10a, N6a, N9a) có khả năng kháng khuẩn tốt nhất, mỗi dòng kháng lại 3 nhóm vi khuẩn Gram âm, Gram dương và *Candida albicans*. Nhận diện 12 dòng vi khuẩn này thuộc chi *Bacillus* và 1 dòng thuộc chi *Halomonas*. Dòng *Bacillus tequilensis* N1a kháng mạnh với vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* và nấm men *Candida albicans*.

Trích dẫn: Trần Vũ Phương, Phạm Ngọc Hân và Cao Ngọc Điệp, 2019. Phân lập vi khuẩn liên kết với hải miên ở Hòn Nghệ, vùng biển Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang, Việt Nam. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 1-9.

## 1 GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, tình trạng kháng kháng sinh đang ở mức báo động với sự xuất hiện của một số chủng vi sinh vật có khả năng kháng nhiều loại kháng sinh. Các nghiên cứu tìm ra các hợp chất có tác dụng kháng khuẩn gặp không ít khó khăn nhưng hiệu quả mang lại không được như mong muốn. Nhiều nghiên cứu chỉ tập trung vào việc khai thác các nguồn trên cạn dần trở nên khan hiếm các nguồn kháng sinh mới, nguồn vi sinh vật dưới biển vô cùng phong phú. Vì vậy việc tìm kiếm các vi sinh vật dưới biển hoặc cộng sinh với các sinh vật biển được đặc biệt quan tâm với mục tiêu quan trọng là tìm kiếm nguồn kháng sinh mới trong đó các hợp chất có hoạt tính sinh học cao từ các nguồn tài nguyên nước biển vô cùng phong phú (Wang *et al.*, 2006). Do đó vi sinh vật biển trở thành mục tiêu quan trọng đối với ngành công nghiệp sinh học trên con đường tìm kiếm và sản xuất các loại kháng sinh mới, các hoạt chất sinh học có khả năng kháng khuẩn. Vi sinh vật từ các hệ sinh thái ở những vùng biển của Việt Nam nói chung và vùng biển Hà Tiên nói riêng, có độ đa dạng sinh học cao sẽ là nguồn nguyên liệu tiềm năng hứa hẹn cho sự ra đời các loại kháng sinh mới. Tuy nhiên, ở Việt Nam những nghiên cứu về các nhóm vi sinh vật liên kết với hải miên như vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc có khả năng sinh chất kháng khuẩn còn chưa nhiều.

Phần lớn các sản phẩm biển tự nhiên được tách chiết từ động vật không xương sống (Wang *et al.*, 2006). Rất nhiều hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn được tìm ra từ nhóm động vật này, đặc biệt là hải miên (ngành Porifera) đáng chú ý bởi tính đa dạng và cộng đồng vi sinh vật đa dạng trong mô của chúng. Những nghiên cứu về vi sinh vật liên kết hải miên cho thấy vi sinh vật có thể chiếm đến 50% thể tích hải miên, và con số này lớn hơn 2 - 3 lần so với lượng vi khuẩn trong nước biển (Li *et al.*, 2007). Sự đa dạng này có thể giải thích một phần bởi sự thay đổi các điều kiện lý, hóa, sinh trong hải miên. Hải miên được biết là nguồn giàu các sản phẩm sinh học tự nhiên có giá trị. Rất nhiều sản phẩm sinh học có tác dụng kháng khuẩn của hải miên thực tế là do vi khuẩn liên kết hải miên sinh ra (Newman, 2003). Việc nuôi cấy vi khuẩn liên kết hải miên có thể cung

cấp hợp chất có khả năng kháng khuẩn với số lượng lớn và có thể ứng dụng trong y học và công nghệ sinh học (Hoffmann, 2005).

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về thành phần hải miên ở Vịnh Hạ Long, Nha Trang cho thấy thành phần của loài rất đa dạng, một số được công bố về tách chiết các chất có hoạt tính sinh học từ hải miên ở Việt Nam (Nguyen *et al.*, 2013). Những nghiên cứu về sự liên kết của các vi sinh vật trong hải miên chưa được chú ý nhiều. Đến nay chỉ có một số công trình phân lập và xác định hoạt tính sinh học của các hợp chất từ vi sinh vật biển của các nhà khoa học trong nước (Đỗ Đình Hạo và Phạm Thế Thu, 2010). Từ năm 2002 đến nay, nhóm hải miên bắt đầu được chú ý nghiên cứu ở các đề tài hợp tác quốc tế như: Việt Nam - Italia, Việt - Nga, Việt Nam - Tây Ban Nha và các đề tài thuộc chương trình Khoa học và Công nghệ biển. Các kết quả nghiên cứu cho thấy số lượng loài hải miên ở vùng biển Việt Nam có khoảng 160 loài và phân bố tập trung ở vùng biển quanh các đảo ven bờ và xa bờ. Một số kết quả nghiên cứu đã được công bố cho thấy tiềm năng của các loài hải miên thu tại Việt Nam.

Hòn Nghệ là 1 trong các hòn đảo thuộc quần đảo Bà Lụa, nằm trong vịnh Thái Lan, thuộc vùng biển Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang của Việt Nam. Hòn Nghệ có cấu tạo địa chất đá vôi mang tính hoang sơ. Chính vì vậy mục tiêu đề tài nhằm tìm kiếm các dòng vi khuẩn có khả năng kháng khuẩn liên kết với hải miên và có tiềm năng ứng dụng thực tế.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

### 2.1 Thời gian và địa điểm thực hiện

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 10/2017 đến tháng 3/2018 tại phòng thí nghiệm Vi Sinh Vật môi trường và Sinh học Phân tử thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2 Phương tiện thí nghiệm

Mẫu hải miên được thu tại Hòn Nghệ ở vùng biển Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang (Hình 1), mẫu thu theo phương pháp SCUBA.



**Hình 1: Hòn Nghê**

\*Các chủng vi sinh vật kiểm định:

- + *Bacillus cereus* ATCC 11778 (ký hiệu là B);
- + *Candida albicans* ATCC 10231 (ký hiệu là C);
- + *Escherichia coli* ATCC 25922 (ký hiệu là E);
- + *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 (ký hiệu là S);
- + *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ký hiệu là St).

Các chủng vi khuẩn thử nghiệm trên đều là chủng vi sinh vật thể hệ F4 được mua từ công ty Microbiologics thông qua đại lý phân phối ở Việt Nam là công ty TNHH thiết bị khoa học Lan Oanh (Địa chỉ: 456 Phan Xích Long, Phường 2, Phú Nhuận, thành phố Hồ Chí Minh).

+ *Edwardsiella ictaluri* (ký hiệu là Ed): từ bộ sưu tập giống của Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ.

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật:

- Môi trường starch-yeast extract-peptone-sea water (SYP) (Kennedy *et al.*, 2009)
- Môi trường Marine Agar (MA) (Kennedy *et al.*, 2009)
- Môi trường Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)
- Môi trường Mueller Hinton Agar (MHA) (Mueller and Hinton, 1941)
- Hóa chất nhuộm Gram: Crystal Violet, Lugol, Alcohol 96%, Safranin
- Hóa chất để tinh sạch DNA của vi khuẩn
- Hóa chất dùng trong phản ứng chuỗi (PCR=Polymerase Chain Reaction)
- Hóa chất dùng trong điện di sản phẩm PCR

- Các loại kháng sinh: Streptomycin, Flucanazol và Tetracyclin.

### 2.3 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1 Thu thập và xử lý mẫu

Mẫu thu ở độ sâu 0,5 – 1 m so với mực nước biển, trữ lạnh trong thùng xốp với nước đá và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu tiếp tục được bảo quản trong tủ đông ở nhiệt độ -4°C và tiến hành phân lập sau 1 tháng.

#### 2.3.2 Phân lập vi khuẩn

Mẫu hải miên được cắt nhỏ khoảng 1 cm<sup>2</sup>, và được rửa sạch nhiều lần bằng nước biển vô trùng trong tủ cấy vô trùng. Dùng kéo vô trùng cắt nhỏ mẫu cho vào ống nghiệm, thêm vào 3 mL nước biển vô trùng, dùng đĩa thủy tinh nghiền nát mẫu trong ống nghiệm. Sau khi nghiền, pha loãng nồng độ dung dịch mẫu lần lượt 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> lần; Hút 100 µL dung dịch gốc và các dung dịch pha loãng cho vào các đĩa môi trường nuôi cấy (SYP (Starch Yeast extract Peptone) và MA (Marine Agar)) đã chuẩn bị sẵn; Dùng que thủy tinh trải đều giọt mẫu trong đĩa; Ủ đĩa trong tủ ủ ở nhiệt độ 30°C từ 24 – 48 giờ để các vi khuẩn phát triển. Chọn những khuẩn lạc có kích thước, hình dạng, màu sắc khác nhau cấy phân lập trên môi trường tương ứng.

#### 2.3.3 Tách rông

- Các đĩa trải mẫu ủ trong tủ vi sinh ở 30°C từ 24 – 48 giờ xuất hiện nhiều dạng khuẩn lạc khác nhau;
- Chọn các khuẩn lạc khác nhau cấy vào các đĩa khác để phân lập và ủ ở 30°C;
- Cấy phân lập nhiều lần trên môi trường tương ứng cho tới khi quan sát thấy các khuẩn lạc tách rời nhau và đồng nhất;

– Chọn 1 khuẩn lạc tách rời cây vào ống thạch nghiêng chứa môi trường tương ứng, ủ ở 30°C cho vi khuẩn phát triển;

– Kiểm tra dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần để xác định độ rỗng của vi khuẩn.

Khi cấy vi khuẩn trên môi trường phân lập, tiến hành đồng thời đo kích thước và quan sát hình thái các dạng khuẩn lạc bằng mắt thường bao gồm các chỉ tiêu như sau:

Khi khuẩn lạc vi khuẩn nuôi trên môi trường phân lập đã rỗng, tiến hành quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần bằng phương pháp giọt ép đồng thời ghi nhận hình thái tế bào với các tiêu chí sau: sự di động, vỏ nhày, nội bào tử

2.3.4 Nhuộm Gram

Nhỏ 30 µL nước cất vô trùng lên lam kính; dùng que cấy trên ngọn lửa đèn cồn và để nguội, lấy vi khuẩn sợi trong ống nghiệm trải đều lên giọt nước trên lam kính và để khô tự nhiên; hơ lam kính trên ngọn lửa đèn cồn 2, 3 lần để cố định vi khuẩn sợi lên lam kính; nhỏ 100 µL Crystal Violet lên trên vệt vi khuẩn sợi vừa cố định trong 1 phút; rửa lại với nước cất vô trùng để ráo nước; tiếp tục nhỏ 100 µL Lugol lên trên vệt vi khuẩn sợi vừa cố định trong 1 phút; rửa lại với nước cất vô trùng; tẩy màu bằng cồn 96% cho đến khi hết máu xanh tím; rửa nhanh lại với nước và để khô; nhỏ 100 µL Safranin lên trên vệt vi khuẩn sợi vừa cố định trong 1 phút; rửa lại với nước cất vô trùng và để khô tự nhiên;

Kháng mạnh	Kháng trung bình	Kháng yếu	Không kháng
>20 mm	6-20 mm	1-5 mm	<1 mm

(Galindo, 2004)

2.3.6 Nhận diện vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

Phản ứng khuếch đại vùng gen 16S rRNA được tiến hành với cặp môi 8F (Weisburg *et al.*, 1991) và 1492R (Reysenbach *et al.*, 1992). Trình tự cặp môi 8F và 1492R như sau:

– 8F 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'  
 – 1492R 5'  
 TACGGTTACCTGTTACGACTT 3'

Tách mạch (95°C trong 5 phút), 30 chu kỳ [tách mạch 95°C trong 30 giây, lai môi 53°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 90 giây], hoàn tất 72°C trong 10 phút và trữ ở 10°C

2.3.7 Giải trình tự

Giải trình tự các mẫu DNA sau phản ứng PCR tại công ty cổ phần công nghệ Top Biotechnology Research [TBR] (553, Hương Lộ 2, phường Bình Trị Đông, quận Bình Tân, thành phố Hồ Chí Minh).

Quan sát dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 400 lần.

2.3.5 Kiểm tra khả năng kháng khuẩn

**Phương pháp khuếch tán qua giếng thạch** (dựa theo phương pháp của Bauer, 1966): Theo Magaldi *et al.*, (2004) và Valgas *et al.*, (2007), mỗi dòng vi sinh vật kiểm định khác nhau cần những loại kháng sinh khác nhau, 3 loại kháng sinh được sử dụng là Streptomycin đối với dòng *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* chuyên ức chế vi khuẩn gram dương (positive gram bacteria), Flucanazol, là thuốc đặc trị nấm đối với *Candida albicans* và Tetracyclin đối với các dòng vi sinh vật còn lại chuyên ức chế cho vi khuẩn cho xác định gram. Các kháng sinh này được cân và pha loãng với nước cất đã khử trùng sao cho nồng độ là 30 µg/mL.

Tiêu chí đánh giá khả năng kháng khuẩn

– Quan sát khả năng kháng khuẩn của từng dòng vi khuẩn thông qua sự hiện diện vòng vô khuẩn xung quanh giếng thạch.

– Đường kính vòng vô khuẩn được tính theo công thức  $d = d1 - d2$ . Trong đó, d là đường kính vòng vô khuẩn, d1 là đường kính tổng vòng vô khuẩn, d2 là đường kính khối thạch hoặc giếng thạch.

– Nghiên cứu này dựa theo quy ước của Galindo (2004):

Quy ước khả năng kháng khuẩn:

Kết quả giải trình tự các dòng vi khuẩn được so sánh độ tương đồng với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng chương trình BLAST N để nhận diện vi khuẩn ở mức độ đồng hình cao, vẽ cây phả hệ (phylogenetic tree) bằng phần mềm MEGA 7.0 đồng thời dựa vào các kết quả nhuộm Gram, kích thước, đặc điểm khuẩn lạc vi khuẩn...

2.3.8 Xử lý kết quả thí nghiệm

Các kết quả thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16 và Microsoft Excel 2010.

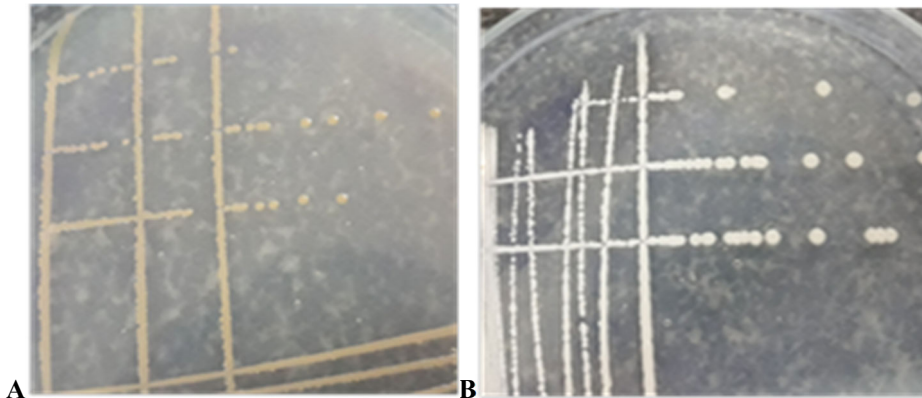
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ 29 mẫu Hải miên thu được ở Hòn Nghệ đã phân lập được 236 dòng vi khuẩn, trong đó, 72 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường thạch MA và 164 dòng vi khuẩn trên môi trường thạch SYP. Trong 236 dòng vi khuẩn phân lập được trên 2 môi trường MA và SYP:



Có khuẩn lạc: tròn chiếm 100%, màu khuẩn lạc trắng đục chiếm >50%, dạng bìa nguyên chiếm >80%, độ nổi mô chiếm >90% (Hình 2).

Tế bào có dạng que ngắn chiếm >60%, hình cầu chiếm >20%, chuyển động chiếm >70%.



**Hình 2: Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn sau 48 giờ nuôi cấy**

A: Khuẩn lạc của dòng vi khuẩn SN20l trên môi trường SYP B: Khuẩn lạc của dòng vi khuẩn MN14b trên môi trường MA  
(Ngày chụp: 03/01/2018)

Sau khi phân lập 236 dòng vi khuẩn tiến hành kiểm tra khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch (Bauer, 1966) với 6 chủng vi sinh vật kiểm định: *Bacillus cereus* (B), *Escherichia coli* (E), *Salmonella typhimurium* (S), *Staphylococcus aureus* (St), *Candida albicans* (C) và *Edwardsiella ictaluri* (Ed). Quan sát đường kính vòng vô khuẩn tạo ra xung quanh giếng thạch thu được 155/236 dòng vi khuẩn kháng ít nhất 1 chủng vi sinh vật kiểm định.

Dựa theo quy ước của Galindo (2004), tuyển chọn được 12/155 dòng vi khuẩn (SN13d, SN14e, SN12m, SN20e, SN24d, MN26d, MN26g, N1a, N11d, N10a, N6a, N9a) có khả năng kháng khuẩn tốt nhất, mỗi dòng kháng lại 3 nhóm vi sinh vật bao

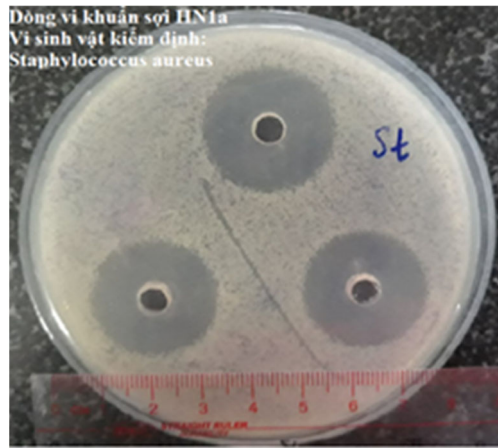
gồm vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương và *Candida albicans* trừ dòng N6a chỉ kháng mạnh trên vi khuẩn *Bacillus cereus* (Bảng 1).

Theo tiêu chuẩn của Galindo (2004) các dòng MN26d, SN24d, N1a, N6a và N9a kháng trung bình với vi khuẩn *Bacillus cereus* và kháng sinh chuẩn Streptomycin; dòng N10a kháng trung bình với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* nhưng dòng vi khuẩn N1a kháng rất mạnh với vi khuẩn này và cả kháng sinh Streptomycin (Bảng 1). Dòng vi khuẩn N1a lại kháng mạnh với nấm men *Candida albicans* và kháng sinh Flucanazol trong khi đó chỉ có dòng N11d kháng trung bình với nấm *Candida albicans* và kháng sinh Flucanazol (theo tiêu chuẩn của Galindo, 2004) (Bảng 1).

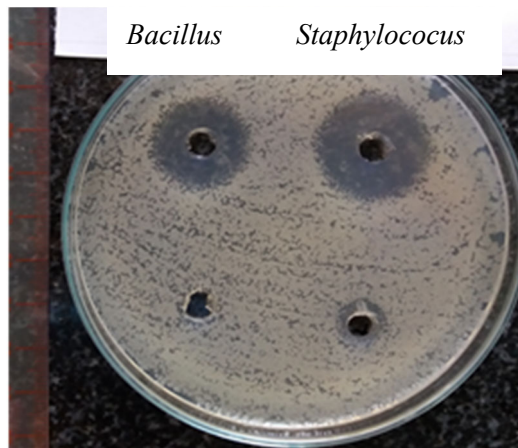
**Bảng 1: Kết quả khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn phân lập được**

TT	Dòng vi khuẩn	Khả năng kháng các dòng vi sinh vật kiểm định					
		B (mm)	St (mm)	E (mm)	Ed (mm)	S (mm)	C (mm)
1	MN26d	10,0 fg	7,7 de	5,0 ef	-	7,0 jk	-
2	MN26g	5,0 mnop	8,0 cd	7,0 cd	-	-	-
3	SN12m	4,0 opqrs	9,0 bc	-	-	7,0 jk	-
4	SN13d	5,0 mnop	9,0 bc	6,0 de	-	-	-
5	SN14e	-	10,0 b	6,0 de	-	-	6,3 jk
6	SN20e	8,0 hi	6,0 fgh	5,3 e	-	-	-
7	SN24d	10,3 fg	9,7 b	6,0 de	-	-	-
8	N1a	10,0 ij	24,0 a	-	-	-	21,0 d
9	N6a	14,3 ef	-	-	--	-	-
10	N9a	8,7 jkl	4,3 h	-	-	-	-
11	N10a	7,0 mn	12,0 e	-	-	-	8,0 mn
12	N11d	6,0 no	10,0 f	-	-	-	11,7 k
13	Đối chứng	8,0 klm	12,0 e	7,0 f	8,0 o	8,0 ij	10,0 l

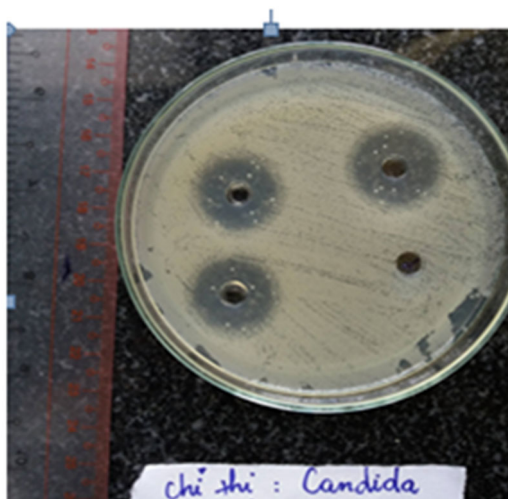
Những số theo sau cùng 1 chữ không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%



Hình 3a: Khả năng kháng khuẩn của dòng vi khuẩn N1a thông qua vòng kháng khuẩn với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* và kháng sinh Streptomycin



Hình 3b: Khả năng kháng khuẩn của dòng vi khuẩn N10a với vi khuẩn *Bacillus cereus* và *Staphylococcus aureus* với kháng sinh Streptomycin



Hình 3c: Khả năng kháng khuẩn của dòng vi khuẩn N11d với nấm men *Candida albicans* và kháng sinh Flucanazol ở mức trung bình

Sau đây là danh sách 13 dòng vi khuẩn có độ kháng khuẩn cao có trình tự gen 16S đồng hình với

ngân hàng dữ liệu GenBank thông qua phần mềm BLASTN (Bảng 2):

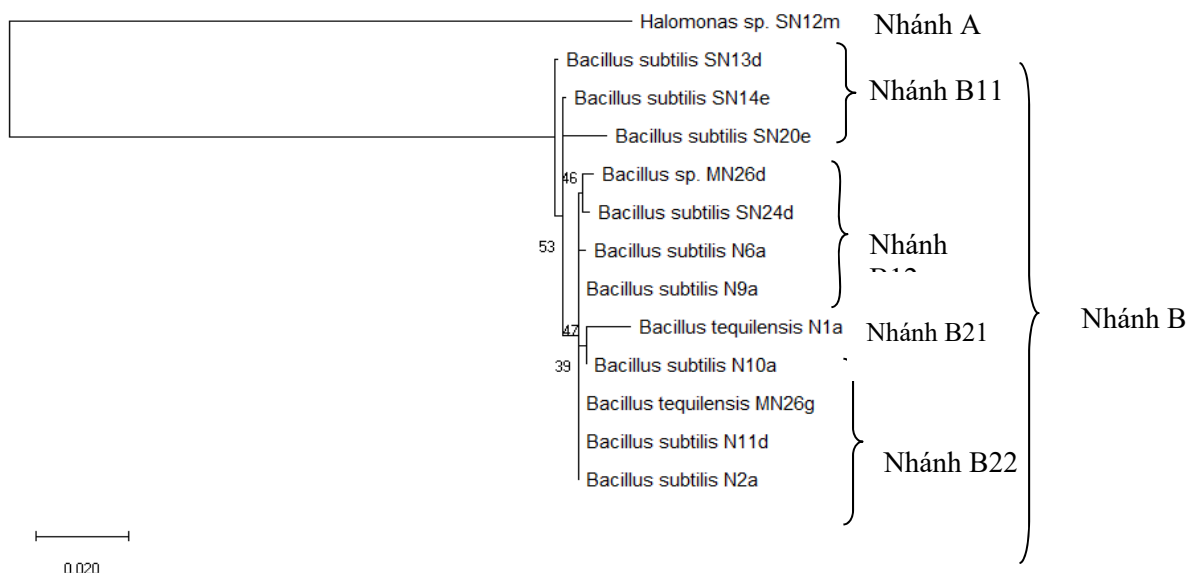
**Bảng 2: Danh sách 13 chủng vi khuẩn có độ đồng hình thông qua trình tự 16S với ngân hàng dữ liệu GenBank**

Nhóm phân loại và dòng	Loài liên hệ gần nhất	Mức đồng hình (%)
Chi <i>Halomonas</i>		
SN12m	<i>Halomonas</i> sp. VSS1 (KR296930)	99
	<i>Halomonas aquamarina</i> strain Ve1-10-83 (EU684464)	99
Chi <i>Bacillus</i>		
SN13d	<i>Bacillus subtilis</i> strain SA4 (KY285264)	99
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain H19 (KJ149809)	97
SN14e	<i>Bacillus subtilis</i> strain SH23 (KP735610)	99
	<i>Bacillus methylotrophicus</i> strain HB25 (KM659226)	97
SN20e	<i>Bacillus subtilis</i> strain IARI-NIAW1-13 (KF054916)	99
	<i>Bacillus siamensis</i> strain TSS18 (MF620076)	99
MN26d	<i>Bacillus subtilis</i> strain MA-40 (KX426640)	99
	<i>Bacillus</i> sp. BAB-5142 (KR998247)	98
SN24d	<i>Bacillus subtilis</i> strain MCB-8 (KJ865584)	98
	<i>Bacillus tequilensis</i> strain MML2 (JX847616)	98
MN26g	<i>Bacillus tequilensis</i> strain MML2 (JX847616)	98
	<i>Bacillus subtilis</i> strain X303 (KU240494)	98
N1a	<i>Bacillus tequilensis</i> strain TY5 (AB862132)	98
	<i>Bacillus subtilis</i> strain SCKB1458 (KM922586)	98
N11d	<i>Bacillus subtilis</i> strain Natto3 (KM924291)	99
	<i>Bacillus</i> sp. strain ERD-004 (MF176945)	99
N10a	<i>Bacillus subtilis</i> strain SCKB1458 (KM922586)	99
	<i>Bacillus</i> sp. strain MGFB-03 (MG062765)	99
N6a	<i>Bacillus subtilis</i> strain ZGL14 (MH362700)	99
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain HPA19 (MF371320)	99
	<i>Bacillus subtilis</i> strain ZGL14 (MH362700)	99
N9a	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain HPA19 (MF371320)	99
	<i>Bacillus subtilis</i> strain ZGL14 (MH362700)	100
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain HPA19 (MF371320)	100

Cây phá hệ trình bày có 2 nhánh rõ rệt: nhánh A chỉ có dòng *Halomonas* sp. SN12m (vi khuẩn gram âm) còn nhánh B là chi *Bacillus* bao gồm các nhánh nhỏ như nhánh gồm chi *Bacillus*; chi tiết trong nhánh này gồm các loài trong chi *Bacillus* như *Bacillus tequilensis* N1a, *Bacillus subtilis* N10a, *Bacillus tequilensis* MN26g, *Bacillus subtilis* N11d và *Bacillus subtilis* N2a (Hình 4).

Phạm Việt Cường và *ctv.* (2014) đã phân lập được 2.640 chủng vi khuẩn liên kết với 6 loài hải miên *Cliona viridis*, *Callyspongia australis*, *Agelas dirpar*, *Haliclona oculata*, *Amphius huxleyi*, *Dycidea cinerea* tại vùng biển Sơn Chà, tỉnh Thừa Thiên Huế, họ đã xác định được 3 hợp chất tự nhiên: 7,7-bis(3-indolyl)-*p*-cresol, cyclo-(*S*-Pro-*R*-Leu), cyclo-(*S*-Pro-*R*-Val) tách chiết từ chủng *Bacillus*

*megaterium* LC phân lập trên hải miên *Haliclona oculata* có khả năng kháng *Vibrio vulnificus* và *Vibrio parahaemolyticus*. Phan Thị Hoài Trinh và *ctv.* (2016) nghiên cứu tại vùng đảo Phú Quốc, Việt Nam đã phân lập và sàng lọc được 3 dòng vi khuẩn từ hải miên có khả năng kháng *Bacillus cereus* (đường kính vòng vô khuẩn từ 9-11 mm). Với kết quả phân lập cho thấy thành phần vi khuẩn nội sinh với hải miên rất đa dạng. Những nghiên cứu phát sinh loài trước đây đã nhận diện được 26 ngành vi khuẩn khác nhau liên kết hải miên biển, trong đó ngành Poribacteria hầu như chỉ tìm thấy trong hải miên. Các loài hải miên khác nhau chứa quần thể vi khuẩn gồm các loài khác nhau, nhưng các loài này vẫn có quan hệ gần hơn so với các loài vi khuẩn ở môi trường nước xung quanh (Schmitt *et al.*, 2012).



**Hình 4: Cây phả hệ trình bày mối quan hệ của 13 dòng vi khuẩn liên kết với hải miên được phân lập ở vùng biển Hà Tiên (phân tích theo phương pháp Maximum-Likelihood) với bootstrap là 1000**

Từ hải miên *Haplosclerida simulans*, Kennedy *et al.* (2009) đã phân lập được 15 dòng vi khuẩn có khả năng kháng *B. cereus*. trong đó đã phân lập được 2 chủng *Bacillus licheniformis*, và *Bacillus pumilus* được xác định là có hoạt tính kháng khuẩn. *Halomonas* sp. cũng đã được phân lập trước đó từ 2 loài hải miên *Halichondria panicea* (Atikana *et al.*, 2013) và *Callyspongia diffusa* (Dhasayan *et al.*, 2015). Pandey *et al.* (2013) đã phân lập được dòng vi khuẩn *Bacillus tequilensis* từ 2 loài hải miên *Aka coralliphaga*, *Sarcotragus fasciculatus*. *Bacillus tequilensis* có khả năng sinh subtilosin A, một loại kháng sinh mới với hoạt tính kháng một số vi khuẩn Gram dương, *Bacillus tequilensis* thể hiện hoạt tính kháng tốt đối với *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Candida albicans* (Rani *et al.*, 2016).

Tại Ấn Độ, Anand *et al.* (2006) phân lập và xác định được 6 chủng có khả năng kháng *Escherichia coli* là *Bacillus* sp. (26 mm), *Marinobacter* sp. (9 mm), *Vibrio parahaemolyticus* (10 mm), *Bacillus subtilis* (16 mm), *Vibrio fortis* (6 mm), *Vibrio* sp. (5 mm). Năm 2017, ở Indonesia, Yatnita đã phân lập được 4 dòng vi khuẩn liên kết với hải miên *Xestospongia testudinaria* có khả năng kháng *Escherichia coli* (đường kính vòng vô khuẩn từ 18-23 mm).

Kết quả của chúng tôi cho thấy các dòng vi khuẩn kháng mạnh vi khuẩn Gram dương như *Bacillus cereus* và *Staphylococcus aureus* cùng với

kháng sinh Streptomycin đồng thời có dòng vi khuẩn kháng trung bình với nấm men *Candida albicans* cùng với kháng sinh Flucanazol trong khi có ít có dòng vi khuẩn kháng với các vi khuẩn Gram âm như *Escherichia coli* hay *Salmonella typhimurium* hoặc với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*.

Mười hai dòng vi khuẩn này được nhận diện thuộc chi *Bacillus* trong đó nhiều loài như *Bacillus tequilensis* và *B. subtilis* và 1 dòng thuộc chi *Halomonas*. Như vậy đa số các dòng vi khuẩn liên kết với hải miên là dòng vi khuẩn *Bacillus* có nội bào tử, trừ dòng *Halomonas* sp., có thể sống trong môi trường nước biển, kỵ khí.

**4 KẾT LUẬN**

- Từ 29 mẫu hải miên thu tại hòn Nghệ đã phân lập được 236 dòng vi khuẩn, trong đó có 72 dòng phân lập trên môi trường MA, 164 dòng phân lập trên môi trường SYP. 155/236 dòng vi khuẩn có khả năng tạo hoạt chất kháng khuẩn kháng lại ít nhất 1 chủng vi sinh vật kiểm định. Có 13/155 dòng có khả năng kháng nhiều dòng vi sinh vật kiểm định

- Kết quả định danh 13/155 dòng vi khuẩn được xác định thuộc 2 chi chính là chi *Bacillus* (12/13 dòng) và chi *Halomonas* (1/13 dòng).

- Xác định thành phần và công thức hóa học của các hợp chất kháng khuẩn từ các dòng vi khuẩn phân lập được nhất là dòng *Bacillus tequilensis* N1a đồng thời trích các chất này từ dung môi hữu cơ phù



hợp để thử nghiệm trong điều kiện *in-tro* trong tương lai.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anand, T.P., Bhat, A.W., Shouche, Y.S., Roy, U., Siddharth, J., and Sarma, S.P. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*, 161(3): 252-262.
- Atikana, A., Naim, M.A. and Sipkema, D., 2013. Detection of keto synthase (ks) gene domain in sponges and bacterial sponges. *Annales Bogorienses*, 17(2): 27-33.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Tenckhoff, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4): 493.
- Cuong, P.V., Cuc, N.T.K., Quyen, V.T. *et al.* 2015. Antimicrobial Constituents from the *Bacillus megaterium* LC Isolated from Marine Sponge *Haliclona oculata*. *Natural Product Sciences*, 21: 202-205.
- Dhasayan, A., Selvin, J. and Kiran, S., 2015. Biosurfactant production from marine bacteria associated with sponge *Callyspongia diffusa*. 3 *Biotech*, 5(4): 443-454.
- Đỗ Đình Hạo và Phạm Thế Thư, 2010. Một số nghiên cứu về vi sinh vật tại vùng ven biển Hải Phòng. *Tạp chí khoa học và công nghệ biển*, 109(1): 52-65.
- Galindo, A. B., 2004. *Lactobacillus plantarum* 44A as a live feed supplement for freshwater fish. Ph.D Thesis. 1-131.
- Hoffmann, F., Larsen, O., Thiel, V., Rapp, H.T., Pape, T., Michaelis, W. and Reitner, J., 2005, "An anaerobic world in sponges", *Geomicrobiol*, 22: 1-10.
- Kennedy, J., Baker, P., Piper, C. *et al.* 2009. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Marine biotechnology*, 11(3): 384-396.
- Li, Z., He, L. and Miao, X. 2007. Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Curr Microbiol*, 55: 465-472
- Magaldi, S., S. Mata-Essayag., C. Hartung de Capriles *et al.*, 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing, *Int. J. Infect. Dis*, 8: 39 – 45.
- Mueller, J. H. and Hinton, J., 1941. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 48(1): 330-333.
- Newman, K., Ponsky, T., Kittle, K. *et al.* 2003. Appendicitis 2000: variability in practice, outcomes, and resource utilization at thirty pediatric hospitals. *Journal of Pediatric surgery*, 38(3): 372-379.
- Nguyen, X.C., Longeon, A., Pham, V.C., Urvois, F., Bressy, C., Trinh, T.T.V. and Bourguet-Kondracki, M.L. 2013. Antifouling 26, 27-cyclosterols from the Vietnamese marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Journal of natural products*, 76(7): 1313-1318.
- Phạm Việt Cường, Nguyễn Mai Anh, Vũ Thị Quyên, Nguyễn Thị Kim Cúc, 2014. Phân lập, tuyển chọn và định danh một số chủng vi khuẩn liên kết 6 loài hải miên vùng biển Sơn Chà. *Tạp chí Sinh học*, 36(3): 345-350.
- Pandey, S., Sree, A., Dash, S. S., Sethi, D. P. and Chowdhury, L., 2013. Diversity of marine bacteria producing beta-glucosidase inhibitors. *Microbial cell factories*, 12(1): 35.
- Phan Thị Hoài Trinh, Ngô Thị Duy Ngọc, Bùi Minh Lý, Lê Đình Hùng, Cao Thị Thuý Hằng, Võ Thị Diệu Trang, và Huỳnh Hoàng Như Khánh, 2016. Hoạt tính kháng khuẩn của một số chủng vi khuẩn phân lập từ bọt biển ở vùng đảo Phú Quốc, Việt Nam. *Tạp chí Sinh học*, 38(1): 109-114.
- Rani, P.R., Anandharaj, M., Hema, S., Deepika, R. and David Ravindran, A., 2016. Purification of antilisterial peptide (Subtilosin A) from novel *Bacillus tequilensis* FR9 and demonstrate their pathogen invasion protection ability using human carcinoma cell line. *Frontiers in microbiology*, 7: 1910.
- Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S. and Pace, N.R., 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10): 3417-3418.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press. pp. 1546.
- Schmitt, S., Peter, T., James, B. *et al.* 2012. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *The ISME Journal*, 6(3): 564-576.
- Valgas, C., De Souza., S.M., Smânia, E.F.A. *et al.*, 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 369 –380.
- Wang, G., 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7): 545-551.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.
- Yatnita, P.C., Achmad, S., Ocky, K.R., and Pratiwi, S, 2017. Antibacterial activity of marine bacteria isolated from sponge *Xestospongia testudinaria* from Sorong, Papua. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5): 450-454.