

**Định danh 16S rRNA và khảo sát tiềm năng kháng khuẩn của *Bacillus* sp. B10****Đặng Thị Thúy Ngọc, Nguyễn Thị Kim Chi, Lâm Giang Hồng Phúc, Lê Ngọc Sương,
Nguyễn Thị Kim Cơ***Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế*

THÔNG TIN BÀI BÁO

Quá trình xử lý:

Ngày nhận: 17/11/2025

Ngày nhận bản chỉnh sửa: 25/12/2025

Ngày nhận đăng: 28/12/2025

Ngày xuất bản: 20/4/2026

Từ khóa:

Bacillus velezensis;

16S rRNA;

Lipopeptide;

Vibrio alginolyticus.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm định danh và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B10. Phân tích hình thái và phản ứng sinh hóa cho thấy B10 là vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử, có hoạt tính catalase và oxidase dương tính. Trình tự gen 16S rRNA dài 1484 bp có hàm lượng G+C 55,5% và thể hiện độ tương đồng 99,5% với *Bacillus velezensis*, thuộc nhóm *Bacillus amyloliquefaciens* trong phức hợp *Bacillus subtilis*. Tiềm năng kháng khuẩn từ dịch nuôi cấy ngoại bào của chủng B10 được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán lỗ thạch cho thấy khả năng ức chế mức trung bình đối với *Vibrio alginolyticus* ($11,3 \pm 0,4$ mm), ức chế yếu *Photobacterium damsela* ($3,9 \pm 0,2$ mm) và không thể hiện hiệu quả kháng *Enterobacter hormaechei*. Kết quả cho thấy chủng B10 thể hiện hoạt tính ức chế chọn lọc đối với *Vibrio alginolyticus*, gợi ý khả năng sinh các hợp chất có tác dụng kháng khuẩn đặc hiệu, nhiều khả năng liên quan đến các lipopeptide thường gặp ở chi *Bacillus*. Dữ liệu này cung cấp cơ sở ban đầu cho các nghiên cứu tiếp theo về hoạt tính kháng khuẩn của chủng B10 và ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bacillus là chi vi khuẩn Gram dương, hình que, có khả năng sinh bào tử và phân bố phổ biến trong tự nhiên. Nhiều loài trong chi này đã được biết đến với các đặc tính có lợi, đặc biệt là khả năng sản xuất enzyme ngoại bào với giá trị công nghiệp cao. Các enzyme này được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực công nghiệp thực phẩm và dược phẩm như protease, amylase, cellulase, giúp nâng cao hiệu quả sản xuất và chất lượng sản phẩm (Su et al., 2020).

Trong nông nghiệp, các chủng *Bacillus* đóng vai trò quan trọng nhờ khả năng cố định đạm, sản xuất kháng sinh tự nhiên và các chất ức chế sinh học, góp phần kiểm soát vi sinh vật gây bệnh ở cây trồng. Nhờ vậy, việc ứng dụng chế phẩm *Bacillus* giúp giảm thiểu sử dụng hóa chất bảo vệ thực vật và kháng sinh tổng hợp, từ đó hướng tới nền nông nghiệp an toàn, bền vững (Petkova et al., 2025; Khan et al., 2022).

Đặc biệt, một số chủng *Bacillus* sp. có khả năng sinh các hợp chất kháng khuẩn với hoạt tính mạnh, thể hiện tiềm năng ứng dụng không chỉ trong kiểm soát bệnh ở cây trồng và vật nuôi mà còn trong y học ở người (Zhang et al., 2023). Trong những năm gần đây, các loài tiêu biểu như *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* và *Bacillus licheniformis* đã được ghi nhận có phổ kháng khuẩn rộng, đồng thời có khả năng tổng hợp đa dạng các nhóm hợp chất kháng khuẩn đặc hiệu, thể hiện tiềm năng ứng dụng cao trong lĩnh vực kiểm soát vi sinh vật gây bệnh và phát triển chế phẩm sinh học. *B. velezensis* thường chứa các đảo gen tổng hợp nonribosomal peptides (NRPs) tạo iturin/fengycin/surfactin và được báo cáo có hoạt tính kháng cả vi khuẩn và nấm gây bệnh thực vật cũng như tiềm năng ứng dụng sinh học (Kenfaoui et al., 2024). *B. amyloliquefaciens* liên tục được phân lập từ nhiều nguồn môi trường với hoạt tính kháng khuẩn rộng (bao gồm tác nhân Gram-dương và Gram-âm), nhiều nghiên cứu gần đây còn xác định các hợp chất cụ thể đóng góp cho hiệu lực kháng khuẩn (Palacios-Rodriguez et al., 2024). *B. licheniformis* được biết đến với các peptide kháng

khuẩn và lipopeptide (ví dụ lichenysin) có tác dụng ức chế vi khuẩn gây bệnh và giảm hình thành biofilm (Shleeve et al., 2023). Do đó, việc nghiên cứu, phân lập và định danh các chủng *Bacillus* mới, đồng thời khảo sát khả năng kháng khuẩn của chúng, là vấn đề có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Việc khảo sát khả năng kháng khuẩn của các chủng *Bacillus* bản địa, đặc biệt đối với các vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio alginolyticus*, *Enterobacter hormaechei* và *Photobacterium damsela* có ý nghĩa quan trọng trong phát triển các chế phẩm sinh học phục vụ nông nghiệp. Xuất phát từ những cơ sở trên, nghiên cứu này nhằm định danh chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B10 bằng phương pháp định danh gen 16S rRNA và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chủng đối với các vi sinh vật gây bệnh nêu trên. Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần bổ sung dữ liệu khoa học và làm cơ sở phát triển các ứng dụng chế phẩm sinh học hoặc kiểm soát sinh học hiệu quả, an toàn.

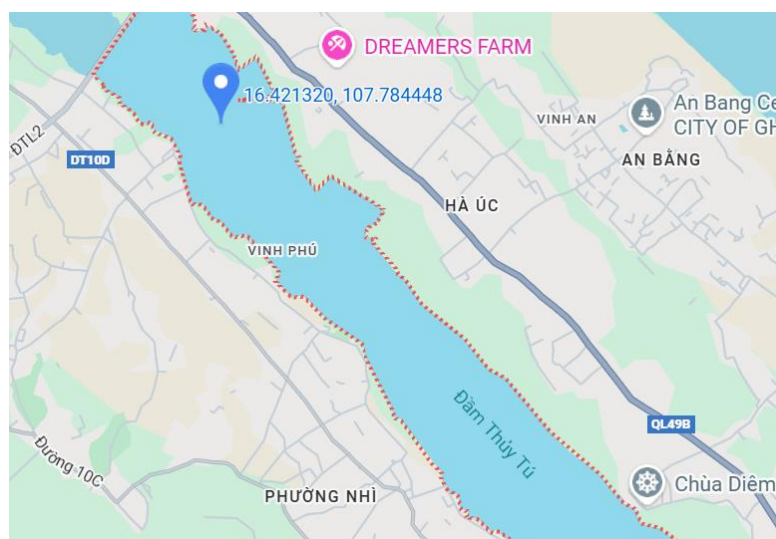
2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng *Bacillus* sp. B10 được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Di truyền – Vi sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế.

Thời gian thu mẫu: ngày 01 tháng 02 năm 2025.

Địa điểm thu mẫu: Đầm Thủy Tú, thành phố Huế (hình 1).



Hình 1. Địa điểm thu mẫu.

2.2. Phương pháp định danh

2.2.1. Định danh sơ bộ qua các đặc điểm sinh hóa

Để xác định sơ bộ loài, chủng B10 được quan sát và mô tả đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên Luria–Bertani (Luria–Bertani broth: tryptone 10 g, NaCl 10 g, yeast extract 5 g; pH 7,0) agar, sau đó so sánh với khóa phân loại trong Bergey's Manual (Brenner et al., 2006). Sau 12–18 giờ nuôi cấy, mẫu được tiến hành nhuộm Gram theo phương pháp Hucker cải tiến, sử dụng Gentian violet làm thuốc nhuộm chính và Safranin làm thuốc nhuộm đối chứng nhằm xác định phản ứng Gram. Dựa vào sự khác biệt cấu trúc thành tế bào: vi khuẩn Gram dương (+) giữ màu tím, trong khi Gram âm (–) bắt màu hồng (Dũng, 2003). Khả năng sinh bào tử được kiểm tra bằng cách nuôi khuẩn lạc ở 30°C trong 7 ngày, sau đó cố định tiêu bản lên lam kính có chứa một giọt nước cất vô trùng và nhuộm theo phương pháp Ogietska. Quan sát dưới kính hiển vi bào tử bắt màu đỏ với Fuchsin Ziehl và tế bào chất giữ màu xanh bởi Xanh methylen Loeffler, chứng minh chủng vi khuẩn có khả năng hình thành nội bào tử (Dũng, 2003). Hoạt tính oxidase được kiểm tra bằng cách đặt khuẩn lạc lên giấy thấm tẩm N-dimethyl-paraphenylenediamine (Công ty TNHH Nam Khoa, Việt Nam); sự chuyển màu xanh trên giấy cho thấy phản ứng dương tính. Đồng thời, khả năng sinh enzyme catalase được đánh giá bằng cách nhỏ dung dịch hydrogen peroxide (H₂O₂) 3% trực tiếp lên khuẩn lạc. Hiện tượng sủi bọt khí do giải phóng O₂ xác nhận sự hiện diện của catalase, qua đó khẳng định đặc tính hiếu khí của vi khuẩn (Dũng, 2003).

2.2.2. Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số

Vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB dịch thể trước khi tiến hành tách chiết DNA tổng số bằng bộ kit HTOne™ Genomic DNA Extraction (HT Biotech, Việt Nam). Mẫu được chuẩn bị bằng cách thu nhận khoảng 5 x 10⁶ tế bào vi khuẩn B10 thông qua ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau khi loại

bỏ dịch nổi, phần cặn được rửa bằng 200 μ L dung dịch PBS, tiếp tục ly tâm và loại bỏ dịch nổi. Cặn tế bào thu được sau đó được hòa trong 200 μ L PBS. Thêm vào hỗn dịch 10 μ L enzyme Proteinase K, trộn đều và ủ ở 56 °C trong 15 phút; trong quá trình ủ, mẫu được vortex nhẹ 3–5 lần để tăng hiệu quả phân giải protein. Sau khi hoàn tất, hỗn hợp được đưa về nhiệt độ phòng. Tiếp theo, bổ sung 10 μ L RNase A nhằm loại bỏ tạp RNA, trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút (QIAGEN, 2023; Thermo Fisher Scientific, 2018).

Quá trình ly giải được tiến hành bằng cách thêm 200 μ L Lysis Buffer và vortex trong 30 giây, sau đó hỗn hợp được chuyển vào cột lọc silica, bổ sung 300 μ L ethanol tuyệt đối, trộn đều và ủ trong 3 phút trước khi ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 1 phút. Cột lọc được rửa lần lượt bằng 700 μ L Wash Buffer 1 (ly tâm 8.000 vòng/phút, 1 phút) và 500 μ L Wash Buffer 2 (ly tâm 16.000 vòng/phút, 1 phút), sau đó ly tâm cột rỗng ở 16.000 vòng/phút trong 1 phút để loại bỏ ethanol dư. DNA được rửa giải bằng cách thêm 50–100 μ L Elution Buffer đã được gia nhiệt ở 65°C, ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 phút và ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 1 phút. Sản phẩm DNA tinh sạch được bảo quản trong dung dịch đệm acid nucleic vô trùng hoặc lưu giữ lâu dài ở –20°C (QIAGEN, 2023; Thermo Fisher Scientific, 2018).

2.2.3. Khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng phản ứng PCR

Trình tự 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAC-3') và 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Chu trình PCR bao gồm giai đoạn biến tính ban đầu và hoạt hóa enzyme ở 95 °C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ gồm: 95 °C trong 30 giây, 55 °C trong 20 giây và 72 °C trong 1 phút. Giai đoạn kéo dài cuối được thực hiện ở 72 °C trong 5 phút và sau đó giữ ở 25 °C trong 5 phút (Chakravorty et al., 2007; Janda & Abbott, 2007).

2.2.4. Giải trình tự gen 16S rRNA và phân tích dữ liệu

Sản phẩm khuếch đại PCR được giải trình tự theo phương pháp Sanger. Dữ liệu trình tự thô được xử lý bằng cách loại bỏ các đoạn có chất lượng thấp và lắp ráp thành trình tự hoàn chỉnh sử dụng phần mềm Clone Manager v9.0 kết hợp với ChromasPro v2.1.10. Trình tự lắp ráp hoàn chỉnh sau đó được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI bằng công cụ BLASTn để định danh sơ bộ chủng vi khuẩn. Để xây dựng cây phát sinh chủng loại, các trình tự 16S rRNA tham khảo (chủng chuẩn) được thu thập từ cơ sở dữ liệu LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <https://lpsn.dsmz.de>). Các trình tự này được căn chỉnh đa chuỗi (multiple sequence alignment) bằng phần mềm MAFFT phiên bản 7.525 với các thiết lập mặc định. Cây phát sinh chủng loại được thực hiện bằng phương pháp ước lượng hợp lý tối đa (maximum likelihood) trong phần mềm IQ - TREE. Mô hình thay thế tối ưu được lựa chọn bằng thuật toán ModelFinder Plus và quá trình đánh giá độ tin cậy của các nhánh trên cây phát sinh chủng loại được thực hiện thông qua 1000 lần lặp bootstrap.

2.3. Khảo sát tiềm năng kháng khuẩn của *Bacillus* sp. B10

Phương pháp khuếch tán giếng thạch Kirby-Bauer có điều chỉnh được sử dụng để đánh giá tiềm năng kháng khuẩn của B10 trên các chủng vi khuẩn kiểm định bao gồm *V. alginolyticus*, *E. hormaechei* và *P. damsela* (Ngamsurach & Praipipat, 2022). Chủng *Bacillus* sp. B10 được nuôi lắc 200 vòng/phút trong môi trường LB broth ở 37 °C trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 4°C, 6.000 vòng/phút trong 15 phút để thu dịch nổi. Huyền phù vi sinh vật kiểm định được chuẩn hóa đến OD₆₀₀ = 0,3; sau đó 100 μ L được trải đều lên bề mặt đĩa thạch MHA (Mueller–Hinton agar: Beef Extract 300 g, tryptone 17,5 g, tinh bột 1,5 g; pH 7,3) bằng tấm bông vô trùng. Trên mỗi đĩa thạch, ba giếng có đường kính 6 mm được tạo bằng dụng cụ đục vô trùng, sau đó lần lượt nạp 100 μ L mẫu dịch sau ly tâm, đối chứng dương (doxycycline 20 μ g đối chứng dương cho 2 chủng *V. alginolyticus* và *P. damsela*, levofloxacin 30 μ g đối chứng dương cho *E. hormaechei*) và đối chứng âm (môi trường LB vô trùng) vào từng giếng tương ứng. Sau khi nạp mẫu, đĩa được ủ ở 4°C trong 120 phút để dịch khuếch tán đều trong giếng, rồi chuyển sang ủ ở 37°C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được ghi nhận bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn (mm) xung quanh mỗi giếng.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày ở giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD). Kết quả nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm thống kê IBM SPSS Statistics 20.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

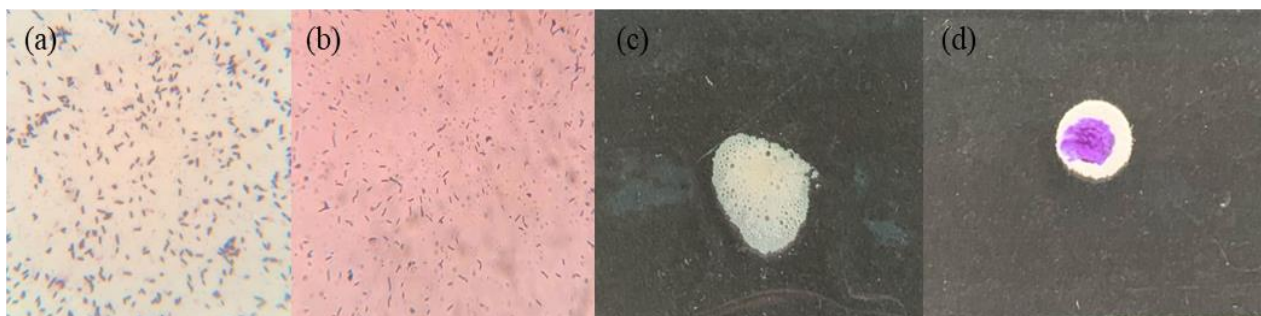
3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và sinh hóa của *Bacillus* sp. B10

Sau 24 giờ nuôi cấy trên môi trường LB agar (LBA), khuẩn lạc của chủng *Bacillus* sp. B10 có hình dạng tròn, bờ rìa răng cưa, phát triển lan tỏa và có xu hướng kết dính với nhau tạo thành các mảng lớn. Khuẩn lạc có màu trắng ngà, lồi nhẹ, bề mặt hơi nhám và khô. Kích thước khuẩn lạc dao động trong khoảng 1–3 mm. Sự sinh trưởng mạnh của khuẩn lạc thể hiện qua khả năng lan rộng trên bề mặt môi trường, hình thành các dải và cụm liên tiếp (hình 2).



Hình 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc chủng B10.

Kiểu hình này phổ biến ở *Bacillus* spp. trên môi trường giàu dinh dưỡng: nhiều chủng tạo khuẩn lạc màu trắng kem, đục, bề mặt thô hoặc khô, có bờ không đều trên LB hoặc NA; trong nghiên cứu của (Zhou et al., 2022) chủng BR-01 được xác định là *Bacillus velezensis* có khuẩn lạc màu trắng, phẳng, mờ đục, sần sùi và nhẵn nhéo với các cạnh không đều trên môi trường NA; tương tự theo mô tả của (Trang et al., 2020), 22 chủng phân lập thuộc nhóm *Bacillus subtilis* khi nuôi trên môi trường TSA đều có khuẩn lạc màu trắng đục hoặc trắng sữa, nhẵn, có viền răng cưa không đều. Theo nghiên cứu của (Liu et al., 2024), *Bacillus velezensis* phát triển các khuẩn lạc màu trắng kem, hình bán nguyệt, có viền không đều và bề mặt nhẵn, ẩm khi nuôi cấy trên đĩa thạch LB trong 12 giờ ở 37°C, khác biệt này có thể do điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, pH, thành phần LB) hoặc do đặc điểm di truyền từng chủng.



Hình 3. Khảo sát một số đặc điểm sinh hóa của chủng B10
(a): nhuộm gram; (b): nhuộm bào tử; (c): hoạt tính catalase; (d): hoạt tính oxidase.

Kết quả nhuộm Gram cho thấy tế bào vi khuẩn B10 hình que, bắt màu tím của thuốc nhuộm gentian violet, có đặc tính Gram dương (hình 3a). Theo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, các loài trong chi *Bacillus* đều có thành tế bào peptidoglycan dày, giàu acid teichoic, giúp giữ lại thuốc nhuộm tinh thể tím và iod trong quá trình nhuộm Gram, do đó thể hiện phản ứng Gram dương (Brenner et al., 2006). Nhiều nghiên cứu cũng xác nhận đặc điểm này, theo nghiên cứu của (Hân et al., 2021) mô tả 29 chủng *Bacillus* sp. phân lập từ sản phẩm đậu nành lên men đều có Gram dương, hình que. Các chủng *Bacillus* phân lập từ mẫu phân của người khỏe mạnh trong nghiên cứu của (Bách et al., 2024) cũng được mô tả tế bào hình que và Gram dương. Kết quả Gram dương của B10 củng cố cơ sở sơ bộ rằng chủng này thuộc chi *Bacillus* và thể hiện đặc trưng ổn định của nhóm vi khuẩn hiếu khí sinh bào tử.

Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường LBA, B10 hình thành nội bào tử và nằm ở vị trí trung tâm (hình 3b). Trong nghiên cứu của (Hân et al., 2021), các chủng *Bacillus* có nội bào tử hình bầu dục, nằm giữa hay trong khoảng từ trung tâm đến gần cuối tế bào, giống với quan sát trên chủng B10 của chúng tôi. Theo Harirchi et al., 2022, *Bacillus* là chi đặc trưng bởi khả năng hình thành bào tử nội sinh giúp vi khuẩn tồn tại trong điều kiện bất lợi. Vì vậy, kết quả quan sát bào tử của B10 củng cố thêm căn cứ định danh trong phạm vi chi *Bacillus*.

Thử nghiệm catalase được tiến hành với dung dịch H₂O₂ 10% cho kết quả dương tính, đặc trưng bởi sự xuất hiện bọt khí do sự giải phóng O₂ trong quá trình phân hủy hydrogen peroxide dưới tác dụng của enzyme catalase (hình 3c). Tương tự, phản ứng oxidase xác định bằng giấy tẩm N-dimethyl-para-phenylenediamine cũng cho kết quả dương tính, thể hiện qua sự xuất hiện màu xanh tím đặc trưng trong khoảng 10–30 giây sau khi tiếp xúc (hình 3d). Các kết quả này hoàn toàn phù hợp với báo cáo của (Hân et al., 2021), cũng như nghiên cứu của (Cơ & Dung, 2019), khi cả hai nhóm tác giả đều ghi nhận các chủng *Bacillus* sp. có phản ứng catalase và oxidase dương tính, phản ánh đặc trưng sinh hóa điển hình của chi *Bacillus*.

Dựa trên đặc điểm hình thái và sinh hóa bao gồm tế bào hình que, Gram dương, sinh nội bào tử ở vị trí trung tâm, catalase dương và oxidase dương và dựa trên khóa phân loại của Bergey có thể xác định sơ bộ chủng B10 thuộc chi *Bacillus*.

3.2. Phân tích trình tự 16S rRNA và mối quan hệ phát sinh chủng loại của *Bacillus* sp. B10

Trình tự nucleotide của chủng *Bacillus* sp. B10 được xác định sau khi loại bỏ các đoạn môi và tín hiệu nhiễu trong dữ liệu thô, thu được trình tự cuối cùng có chiều dài 1484 nucleotide, đảm bảo chất lượng và tính toàn vẹn của vùng gen phân tích. Phân tích thành phần nucleotide của gen 16S rRNA cho thấy trình tự gồm 368 base adenine (A, chiếm 24,80%), 293 base thymine (T, chiếm 19,74%), 471 base guanine (G, chiếm 31,74%) và 352 base cytosine (C, chiếm 23,72%). Tỷ lệ (A+T)/(G+C) đạt 0,80 cho thấy trình tự có hàm lượng G+C cao (55,5%), đặc trưng cho các loài thuộc chi *Bacillus*. Hàm lượng G+C cao thường phản ánh cấu trúc bộ gen bền vững, khả năng thích nghi tốt với điều kiện môi trường khác nhau.

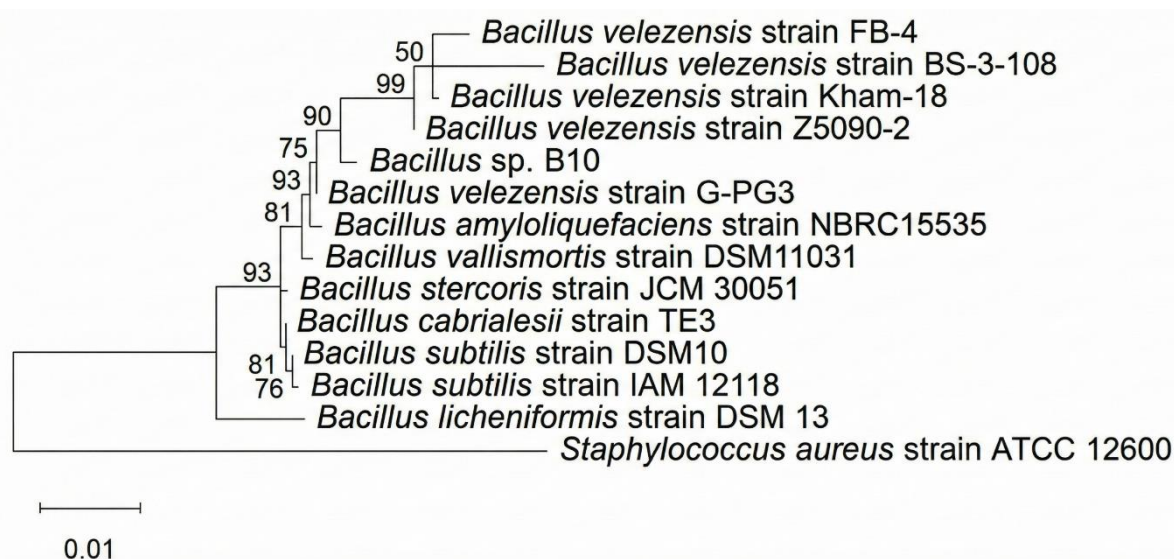
Trình tự 16S rRNA sau khi được lắp ráp hoàn chỉnh đã được so sánh với cơ sở dữ liệu của NCBI bằng công cụ BLAST. Kết quả phân tích BLAST cho thấy các trình tự tương đồng hàng đầu đều có độ bao phủ truy vấn đạt 100% và mức độ tương đồng về nucleotide dao động từ 99,2% đến 99,5%. Trong đó, trình tự có độ tương đồng cao nhất là *Bacillus velezensis* chủng FZB42 (mã số gia nhập Genbank NR_075005.2) với giá trị tương đồng 99,5%. Các trình tự có mức tương đồng tiếp theo bao gồm các loài thuộc nhóm phức hợp *B. subtilis* như *B. subtilis*, *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens* và một số loài khác thuộc chi *Bacillus*. (bảng 1). Kết quả này cung cấp bằng chứng chứng tỏ chủng B10 thuộc cụm *B. amyloliquefaciens*” (gồm *B. velezensis*–*B. amyloliquefaciens*–*B. siamensis*) trong phức hợp *B. subtilis* (Liang et al., 2024).

Bảng 1. Kết quả tìm kiếm sự tương đồng với trình tự 16S rRNA

STT	Tên chủng	Tên khoa học	Điểm tương đồng cao nhất	Độ bao phủ truy vấn (%)	Tỷ lệ tương đồng trình tự (%)	Chiều dài trình tự (bp)	Mã truy cập
1	<i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42 16S	<i>Bacillus velezensis</i>	2691	100%	99.46%	1550	NR_075005.2
2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain 168	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	2686	100%	99.39%	1550	NR_102783.2
3	<i>Bacillus vallismortis</i> strain DSM 11031	<i>Bacillus vallismortis</i>	2680	100%	99.33%	1530	NR_024696.1
4	<i>Bacillus subtilis</i> strain DSM 10	<i>Bacillus subtilis</i>	2675	100%	99.26%	1517	NR_027552.1
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain NBRC 15535	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2673	100%	99.32%	1475	NR_112685.1
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain NBRC 15535	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2671	100%	99.39%	1472	NR_041455.1
7	<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	<i>Bacillus subtilis</i>	2669	100%	99.19%	1550	NR_112116.2
8	<i>Bacillus stercoris</i> strain JCM 30051	<i>Bacillus stercoris</i>	2669	100%	99.19%	1508	NR_180796.1
9	<i>Bacillus cabrialesii</i> strain TE3	<i>Bacillus cabrialesii</i>	2669	100%	99.19%	1550	NR_180419.1
10	<i>Bacillus inaquosorum</i> strain BGSC 3A28	<i>Bacillus inaquosorum</i>	2669	100%	99.19%	1538	NR_104873.1

Dữ liệu khi BLAST được sử dụng làm cơ sở cho bước phân tích phát sinh chủng loại nhằm xác định chính xác hơn mối quan hệ tiến hóa của chủng B10 với các loài trong phức hợp *B. subtilis*. Trình tự 16S rRNA của chủng B10 và các chủng tham chiếu thuộc nhóm *Bacillus subtilis* group (gồm *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. vallismortis*, *B. stercoris* và *B. licheniformis*) được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại. Trình tự *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 được chọn làm nhóm ngoài để xác định nguồn gốc. Kết quả phân tích phát sinh loài cho thấy *Bacillus* sp. B10 nằm trong cùng cụm với các chủng *B. velezensis* (FB-4, BS-3-108, Kham-18, Z5090-2 và G-PG3) và có khoảng cách di truyền rất ngắn (<0,01), thể hiện mối quan hệ tiến hóa gần gũi. Cụm này tách biệt rõ với các loài khác như *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. vallismortis* và *B. stercoris*, cho thấy sự phân nhánh đặc trưng trong nhóm *B. subtilis sensu lato* (hình 4). Trong khi đó, *B. licheniformis* và *S. aureus* nằm ở các nhánh xa hơn, phản ánh sự khác biệt về di truyền và khẳng định tính hợp lý của việc chọn outgroup. Sự phân bố này chứng minh rằng chủng *Bacillus* sp. B10 có mối quan hệ tiến hóa gần nhất với *B. velezensis*, qua đó cho phép khẳng định chủng nghiên cứu thuộc loài *B. velezensis* hoặc cùng cụm phân loại tiến hóa (*B. velezensis* group). Những ghi nhận này phù hợp với các nghiên

cứu trước đây cho thấy các chủng *B. velezensis* thường có trình tự 16S rRNA tương đồng cao (>99%) và mang đặc điểm sinh lý–sinh hóa tương tự, đặc biệt về khả năng sinh tổng hợp lipopeptide kháng khuẩn như surfactin, iturin và fengycin (Markelova & Chumak, 2025).



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của B10 và các loài gần gũi được xây dựng bằng trình tự 16S rRNA.

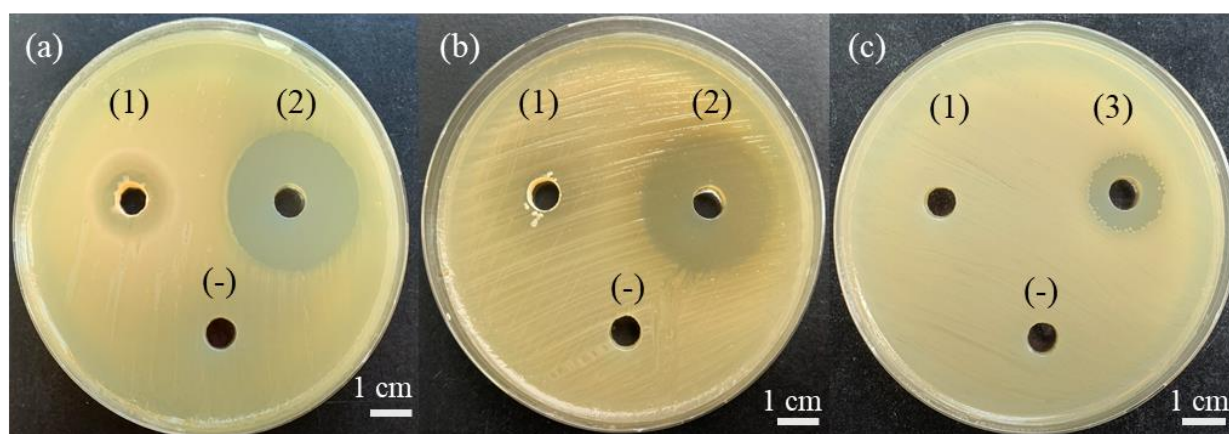
3.3. Tiềm năng kháng khuẩn của *Bacillus* sp. B10

Kết quả khảo sát tiềm năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy ngoại bào cho thấy chủng *Bacillus* sp. B10 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trung bình đối với *V. alginolyticus* với đường kính vùng ức chế đạt $11,3 \pm 0,4$ mm, trong khi không ghi nhận được vùng ức chế đối với *E. hormaechei* và chỉ ức chế yếu đối với *P. damsela* ($3,9 \pm 0,2$ mm) (bảng 2).

Bảng 2. Đường kính vòng vô khuẩn của *Bacillus* sp. B10 với các chủng vi khuẩn kiểm định

Vi sinh vật kiểm định	Đường kính vòng kháng khuẩn Mean $\pm$ SD (mm)
<i>V. alginolyticus</i>	$11,3 \pm 0,4$
<i>P. damsela</i>	$3,9 \pm 0,2$
<i>E. hormaechei</i>	0 ± 0

Điều này chứng tỏ *Bacillus* sp. B10 có thể có khả năng sinh ra các hợp chất kháng khuẩn chuyên biệt tác động chọn lọc vi khuẩn Gram âm thuộc chi *Vibrio* nhưng phạm vi tác động hẹp, không có hiệu quả rõ rệt (Sreedharan et al. 2023). Sự khác biệt này có thể xuất phát từ cấu trúc màng ngoài của vi khuẩn đích, đặc tính khuếch tán của hợp chất kháng khuẩn hoặc cơ chế đề kháng tự nhiên của vi sinh vật kiểm định (Rouvier et al., 2025).



Hình 5. Đường kính vòng vô khuẩn (a): *V. alginolyticus*, (b): *P. damsela* và (c): *E. hormaechei* (1): Dịch ngoại bào của chủng B10; (2): doxycycline 20 µg; (3): levofloxacin 30 µg (-): LB broth.

Kết quả ghi nhận trong nghiên cứu này cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy ngoại bào chủng B10 tương đối thấp so với một số báo cáo trước đó về các chủng *B. velezensis* và *B. subtilis*, vốn đã được chứng

minh có khả năng tiết ra lipopeptide kháng khuẩn (như surfactin, iturin, fengycin) ức chế mạnh các vi khuẩn gây bệnh thủy sản thuộc chi *Vibrio*. Các hợp chất này có khả năng phá vỡ màng tế bào, gây mất mất ion và protein qua màng tế bào, từ đó làm mất cân bằng nội môi, ức chế quá trình sinh trưởng hoặc dẫn đến chết tế bào đích (Markelova & Chumak, 2025; Zhou, 2025). Trong nghiên cứu của (Yu et al., 2022) chủng *B. velezensis* YA215 được xác định chứa ba nhóm lipopeptide (surfactin, iturin và fengycin) và có phổ hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm rộng. Chủng này có tác dụng ức chế mạnh đối với các vi khuẩn gram dương như *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* CGMCC26003, *Bacillus nanotuberculosis*, *Bacillus subtilis* CGMCC1.14985 và *Bacillus subtilis* CGMCC1.15792 và đối với các vi khuẩn gram âm như *Escherichia coli* CGMCC44102, *Salmonella typhimurium* CGMCC11190 và *Shigella flexneri* CGMCC110599. Trong thử nghiệm khả năng kháng nấm, YA215LE cũng thể hiện tác dụng ức chế mạnh đối với *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense, *Rhizopus stolonifer* CGMCC3.31 và *Penicillium expansum* CICC 40658. Chủng *B. velezensis* D-18 trong nghiên cứu của (Monzón-Atienza et al., 2024) có khả năng phá vỡ tín hiệu giao tiếp vi khuẩn và sinh biofilm của *V. anguillarum* - tức là cơ chế ức chế ngoài việc gây chết trực tiếp còn có cơ chế gián tiếp, cho thấy tiềm năng ứng dụng cao trong phòng ngừa bệnh vi khuẩn ở thủy sản.

Bacillus sp. B10 không gây ức chế đối với *E. hormaechei* có thể do sự ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy và sinh trưởng, bao gồm thành phần môi trường, giai đoạn phát triển của tế bào, pH, nhiệt độ, cũng như nồng độ và thời gian ủ của dịch nuôi cấy ngoại bào. Những yếu tố này chi phối quá trình tổng hợp và tiết ra các hợp chất kháng khuẩn thứ cấp, điển hình như lipopeptide hoặc bacteriocin, vốn đóng vai trò chính trong hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Bacillus* spp. (Shi et al., 2024). Ngoài ra, giá trị sai số chuẩn thấp ($SD < 0,4$ mm) phản ánh tính lặp lại cao và độ tin cậy tốt của kết quả giữa ba lần thí nghiệm lặp lại.

4. KẾT LUẬN

Chủng *Bacillus* sp. B10 được định danh thuộc phức hợp *B. subtilis*, gần nhất với *B. velezensis*, với các đặc điểm sinh hóa điển hình của chi *Bacillus* và trình tự 16S rRNA tương đồng cao với *B. velezensis* FZB42 ($G+C = 55,5\%$), cho thấy tính ổn định về phân loại. Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* cho thấy dịch ngoại bào của B10 có khả năng ức chế *V. alginolyticus* ở mức trung bình và ức chế yếu *P. damsela*, trong khi không ảnh hưởng đến *E. hormaechei*, phản ánh khả năng kháng khuẩn ở mức trung bình. Kết quả này cung cấp cơ sở khoa học ban đầu cho việc nghiên cứu chủng B10, đồng thời gợi ý các nghiên cứu tiếp theo nên đánh giá hiệu quả *in vivo*, khảo sát khả năng ứng dụng trong kiểm soát vi khuẩn gây bệnh, và thử nghiệm các điều kiện nuôi cấy hoặc bổ sung nhằm tăng cường hoạt tính kháng khuẩn của chủng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế trong khuôn khổ đề tài mã số T.25.TN.106.06. Chân thành cảm ơn Quý Thầy Cô CB-GV Khoa Sinh học đã giúp đỡ nhóm tác giả hoàn thành nghiên cứu này.

PHỤ LỤC

Trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng *Bacillus* sp. B10:

```
AGACGACGCTGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTG
ATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTT
CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTT
AAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGCGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG
TTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTT
CGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC
```

CCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGG
TGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAC

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bách, Đ. G., Linh, Đ. T. T., Ngân, L. T. T., & Hội, L. T. (2024). Phân lập, tuyển chọn và đánh giá đặc tính các chủng *Bacillus* tiềm năng ứng dụng cho chế phẩm probiotic. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam (MOST)*, 66(5B). <https://vjol.info.vn/index.php/most/article/view/96428/81473>
- Brenner, D. J., Staley, J. T., & Krieg, N. R. (2006). *Bergey's Manual® of systematic bacteriology*. In G. M. Garrity (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume two: The Proteobacteria, Part A: Introductory essays* (2nd ed.). Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-28021-9_4
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Cơ, N. T. K., & Dung, T. Q. (2019). Phân lập và sàng lọc một số chủng *Bacillus* sp. sinh protease từ nước thải. *Tạp chí Khoa học – Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế*, 3(55), 100–108. <https://vjol.info.vn/index.php/TCKH-DHH/article/view/54004/44658>
- Dũng, N. L. (2003). *Giáo trình vi sinh vật học*. NXB Giáo dục Việt Nam.
- Hân, L. T. N., Điệp, V. T. N., Hoa, T. T. T., & Thành, N. V. (2021). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp protease từ các sản phẩm đậu nành lên men. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam – B*, 63(8B), 49–54. [https://doi.org/10.31276/VJST.63\(8\).49-54](https://doi.org/10.31276/VJST.63(8).49-54)
- Harirchi, S., Sar, T., Ramezani, M., Aliyu, H., Etemadifar, Z., & Taherzadeh, M. J. (2022). Bacillales: From taxonomy to biotechnological and industrial perspectives. *Microorganisms*, 10(12), 2355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122355>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Kenfaoui, J., Dutilloy, E., Benchli, S., Lahlali, R., Ait-Barka, E., & Esmaeel, Q. (2024). *Bacillus velezensis*: A versatile ally in the battle against phytopathogens—Insights and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 439. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13255-7>
- Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Yousuf, Z., Iqbal, R., & Daraz, U. (2022). *Bacillus* spp. as bioagents: Uses and application for sustainable agriculture. *Biology*, 11(12), 1763. <https://doi.org/10.3390/biology11121763>
- Liang, X., Ishfaq, S., Liu, Y. (2024). Identification and genomic insights into a strain of *Bacillus velezensis* with phytopathogen-inhibiting and plant growth-promoting properties. *Microbiological Research*, 285, 127745. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127745>
- Liu, Y., Yin, C., Zhu, M., Zhan, Y., Lin, M., & Yan, Y. (2024). Comparative genomic analysis of *Bacillus velezensis* BRI3 reveals genes potentially associated with efficient antagonism of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Genes*, 15(12), 1588. <https://doi.org/10.3390/genes15121588>
- Markelova, N., & Chumak, A. (2025). Antimicrobial activity of *Bacillus* cyclic lipopeptides and their role in the host adaptive response to changes in environmental conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(1), 336. <https://doi.org/10.3390/ijms26010336>
- Monzón-Atienza, L., Bravo, J., Torrecillas, S., Gómez-Mercader, A., Montero, D., Ramos-Vivas, J., Galindo-Villegas, J., & Acosta, F. (2024). An in-depth study on the inhibition of quorum sensing by *Bacillus velezensis* D-18: Its significant impact on *Vibrio* biofilm formation in aquaculture. *Microorganisms*, 12(5), 890. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050890>
- Ngamsurach, P., & Praipipat, P. (2022). Antibacterial activities of *Piper betle* leaf extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *RSC Advances*, 12(40), 26435–26454. <https://doi.org/10.1039/D2RA04611C>
- Palacios-Rodriguez, A. P., Espinoza-Culupú, A., Durán, Y., & Sánchez-Rojas, T. (2024). Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BS4 against Gram-negative pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 13(4), 304. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13040304>
- Petkova, M., Marche, M., Petrova, A.-L., Slavova, V., & Shilev, S. (2025). Plant growth-promoting and biocontrol characteristics of four *Bacillus* strains and evaluation of their effects on wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Plant Biology*, 16(1), 1. <https://doi.org/10.3390/ijpb16010001>
- QIAGEN. (2023). *DNeasy Blood & Tissue Handbook*. QIAGEN.
- Rouvier, F., Brunel, J. M., Pagès, J. M., & Vergalli, J. (2025). Efflux-mediated resistance in Enterobacteriaceae. *Antibiotics*, 14(8), 778. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14080778>

- Shi, X., Zhou, W., Lu, X., Cao, C., Sheng, D., Ren, X., Jin, N., Zhang, Y., Guo, Z., Cao, S., & Ye, S. (2024). Screening of antagonistic bacteria against three aquatic pathogens and characterization of lipopeptides in *Bacillus cereus* BA09. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(10), 2023–2032. <https://doi.org/10.4014/jmb.2404.04017>
- Shleeve, M. O., Kondratieva, D. A., & Kaprelyants, A. S. (2023). *Bacillus licheniformis*: A producer of antimicrobial substances, including antimycobacterials, which are feasible for medical applications. *Pharmaceutics*, 15(7), 1893. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071893>
- Sreedharan, S. M., Rishi, N., & Singh, R. (2023). Microbial lipopeptides: Properties, mechanics and engineering for novel lipopeptides. *Microbiological Research*, 271, 127363. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127363>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for diverse applications. *Microbial Cell Factories*, 19, 173.
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *Purification of genomic DNA using PureLink silica columns*. Thermo Fisher Scientific.
- Trang, T. T., Nguyệt, N. T. Ánh, Châm, L. T. M., Đức, N. T., Hoàng, P. N. Đức, & Xô, D. H. (2020). Phân lập và tuyển chọn *Bacillus subtilis* đối kháng *Colletotrichum scovillei*. *Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh – Kỹ thuật và Công nghệ*, 15(1), 72–86. <https://doi.org/10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.15.1.1022.2020>
- Yu, F., Shen, Y., Qin, Y., Pang, Y., Fan, H., Peng, J., Pei, X., & Liu, X. (2022). Isolation and purification of antibacterial lipopeptides from *Bacillus velezensis* YA215 isolated from sea mangroves. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1064764. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1064764>
- Zhang, N., Wang, Z., Shao, J., Xu, Z., Liu, Y., Xun, W., Miao, Y., Shen, Q., & Zhang, R. (2023). Biocontrol mechanisms of *Bacillus*. *Microbial Biotechnology*, 16(12), 2250–2263. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>
- Zhou, J., Xie, Y., Liao, Y., Li, X., Li, Y., Li, S., Ma, X., Lei, S., Lin, F., Jiang, W., & He, Y.-Q. (2022). Characterization of a *Bacillus velezensis* strain isolated from *Bolbostemma Rhizoma* displaying strong antagonistic activities against a variety of rice pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13, 983781. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983781>
- Zhou, Z., Li, X., Chen, Y., & Wang, H. (2025). Growth inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by surfactin. *Journal of Fish Diseases*, 48(3), 234–245. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(25\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(25)00032-1)

16S rRNA identification and evaluation of the antibacterial potential of *Bacillus* sp. B10

Dang Thi Thuy Ngoc, Nguyen Thi Kim Chi, Lam Giang Hong Phuc, Le Ngoc Suong,
Nguyen Thi Kim Co

University of Education, Hue University

ARTICLE INFO

Article history:

Received: 17 November 2025

Received in revised form: 25 December 2025

Accepted: 28 December 2025

Published: 20 April 2026

Keywords:

Bacillus velezensis;

16S rRNA;

Lipopeptides;

Vibrio alginolyticus.

Corresponding author:

Dang Thi Thuy Ngoc

E-mail address:

dtngoc@dhsphue.edu.vn

ABSTRACT

This study aimed to identify and evaluate the antibacterial activity of the bacterial strain *Bacillus* sp. B10. Morphological and biochemical characterization revealed that strain B10 is a Gram-positive, spore-forming bacterium exhibiting positive catalase and oxidase activities. The 16S rRNA gene sequence (1484 bp) exhibited a G+C content of 55.5% and shared 99.5% similarity with *Bacillus velezensis*, belonging to the *Bacillus amyloliquefaciens* group within the *Bacillus subtilis* complex. The antibacterial potential of the extracellular culture supernatant of strain B10, evaluated using the agar well diffusion assay, showed moderate inhibition against *Vibrio alginolyticus* (11.3 ± 0.4 mm), weak inhibition against *Photobacterium damsela* (3.9 ± 0.2 mm), and no inhibitory effect on *Enterobacter hormaechei*. These results indicate that strain B10 exhibits selective inhibitory activity against *Vibrio alginolyticus*, suggesting the production of specific antibacterial compounds, likely related to lipopeptides commonly synthesized by members of the genus *Bacillus*. The findings provide preliminary evidence for further investigation of the antibacterial mechanisms of strain B10 and its potential application in aquaculture.