

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG *BACILLUS* SPP CÓ KHẢ NĂNG KIỂM SOÁT *VIBRIO PARAHAEOLYTICUS* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY Ở TÔM

ISOLATION AND SELECTION OF *BACILLUS* SPP. WITH ANTIMICROBIAL PROPERTY AGAINST *VIBRIO PARAHAEOLYTICUS* CAUSING ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE IN MARINE SHRIMP

Lê Thành Cường¹, Nguyễn Thị Anh Thu², Văn Hồng Cẩm²

¹ Viện Nuôi trồng Thủy Sản, Trường Đại học Nha Trang

² Viện Công nghệ Sinh học & Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Lê Thành Cường (Email: cuonglt@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 01/02/2023; Ngày phản biện thông qua: 27/02/2023; Ngày duyệt đăng: 28/03/2023

TÓM TẮT

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND – acute hepatopancreatic necrosis disease) hay bệnh chết sớm (EMS) ở tôm gây ra bởi các chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mang gen độc tố *pir^{AB}* và làm thiệt hại nghiêm trọng cho ngành tôm nuôi toàn cầu. Sử dụng vi sinh vật có lợi thay thế kháng sinh được xem là một trong số biện pháp hiệu quả trong việc ngăn ngừa AHPND cho các hệ thống nuôi tôm hiện nay. Nghiên cứu hiện tại đã đánh giá tiềm năng làm chế phẩm sinh học đối kháng *V. parahaemolyticus pir^{AB}* của 33 chủng *Bacillus* phân lập từ mẫu bùn rừng ngập mặn và tôm nuôi tại tỉnh Khánh Hòa. Trong số 9 chủng *Bacillus* có tính đối kháng, CCT-Ba9 và CCT-Ba42 tạo ra vạch đối kháng lớn nhất và có khả năng sinh enzyme ngoại bào tốt bao gồm cellulase, amylase, protease. Cả hai chủng đều được đánh giá an toàn khi cho thấy không có khả năng tan huyết. Kết quả định danh bằng đặc điểm sinh hóa và giải trình tự gen 16S rRNA xác định chúng lần lượt là loài *B. pumilus* and *B. subtilis*. Cả 2 loài đều cho thấy phát triển tốt ở độ pH từ 4.0 đến 8.0 and độ mặn từ 0 đến 50‰. Kết quả của nghiên cứu cho thấy tiềm năng sử dụng *Bacillus* CCT-Ba9 và CCT-Ba42 để ngăn ngừa hoặc kiểm soát sự bùng phát của AHPND ở tôm nuôi.

Từ khóa: *Bacillus*; enzyme ngoại bào, kháng *Vibrio parahaemolyticus pir^{AB}*

ABSTRACT

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) or early mortality syndrome (EMS) is caused by *Vibrio parahaemolyticus* strains carrying the toxin gene *pir^{AB}* and has caused severe losses for the global shrimp industry. Using beneficial microbes as an alternative to antibiotics is considered one of the most effective methods in preventing the outbreak of AHPND in shrimp production systems today. In the present study, 33 *Bacillus* isolates obtained from mangrove sediment and grown-out shrimp samples in Khanh Hoa Province were screened for their probiotic properties against *pir^{AB}*-bearing *V. parahaemolyticus* strains. Among the investigated isolates, nine strains showed clear antagonistic activity and extracellular enzyme productions such as amylase, protease, cellulase. No hemolytic activity was detected in *Bacillus* CCT-Ba9 and CCT-Ba42, indicating their safety as good probiotic candidates. Biochemical and 16S rRNA sequencing analysis identified them as *B. pumilus* and *B. subtilis*, respectively. Both species could grow within a pH range from 4.0 to 8.0 and salinity from 0 to 50‰. Our results demonstrated that *Bacillus* CCT-Ba9 and CCT-Ba42 are promising probiotic strains and may have applications to prevent/control the outbreak of AHPND in shrimp aquaculture.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND, *Bacillus*, Shrimp, Disease

I. LỜI MỞ ĐẦU

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) ở tôm, còn được gọi là hội chứng tôm chết sớm (EMS), xuất hiện lần đầu ở Trung Quốc

vào năm 2009 và đã lây lan sang Việt Nam, Malaysia, Thái Lan, Mexico và Philippines, cũng như khắp Nam Mỹ và Hoa Kỳ [1]. AHPND gây chết 100% trên tôm thẻ và tôm

sú và làm thiệt hại cho nghề nuôi tôm hàng năm ước tính hơn 1 tỷ đô la [2]. Bệnh do các chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mang plasmid chứa gen cho độc tố nhị phân liên quan đến côn trùng Photorhabdus, PirAB, còn được gọi là Pir-like AB và PirVP [3]. AHPND gây chết ở hai loài tôm được nuôi nhiều nhất trong ngành nuôi trồng thủy sản là *Penaeus monodon* và *Litopenaeus vannamei* [2].

Hiện nay, bệnh do vi khuẩn trên động vật nuôi thủy sản thường được kiểm soát bởi thuốc kháng sinh. Một số kháng sinh thường được dùng để điều trị bệnh AHPND làm tăng khả năng kháng những loại kháng sinh này, ví dụ, oxytetracycline, quinolon và amoxicillin [4]. Việc sử dụng lâu dài kháng sinh không những gây ô nhiễm môi trường mà còn đe dọa sức khỏe con người. Vì vậy, sử dụng chế phẩm sinh học đối kháng với *V. parahaemolyticus* là một chiến lược thay thế cho thuốc kháng sinh và xu hướng chung để kiểm soát mầm bệnh *V. parahaemolyticus* trong nuôi trồng thủy sản [5].

Chế phẩm sinh học là bất kỳ chế phẩm sinh học vi sinh nào hoặc sản phẩm của vi sinh vật có lợi cho sức khỏe của vật chủ [6]. Hiệu quả chế phẩm sinh học trên vi khuẩn gây bệnh thủy sản chủ yếu gồm: loại trừ cạnh tranh (vị trí liên kết, dinh dưỡng, năng lượng và chất mang sắt), tiêu hóa tăng cường trong vật chủ của nó, sản xuất hoạt chất kháng khuẩn (chẳng hạn như kháng sinh, enzym phân giải vi khuẩn), tăng cường khả năng miễn dịch bẩm sinh không đặc hiệu trong nuôi trồng thủy sản, cải thiện chất lượng nước, v.v. [7]. *Bacillus* phân bố rộng rãi trong thế giới tự nhiên, bao gồm môi trường biển và phân loại dựa trên phân tích trình tự rRNA 16S [8]. *Bacillus* có thể tạo ra một lượng lớn các enzym thủy phân và peptide kháng khuẩn tạo ra sự kiểm soát sinh học. Bào tử của *Bacillus* có thể chịu được nhiệt độ cao trong suốt quá trình sản xuất thức ăn thủy sản do đó *Bacillus* trở thành một trong những nguồn quan trọng của chế phẩm sinh học [9]. Sử dụng *Bacillus* spp. trong nuôi trồng thủy sản nhằm chống lại các tác nhân gây bệnh vẫn đang thu hút nhiều nhà nghiên cứu nhằm tạo ra chế phẩm kiểm

soát mầm bệnh hiệu quả, bền vững và an toàn [10].

Mục tiêu của nghiên cứu này là sàng lọc và phát triển dòng *Bacillus* có tiềm năng làm chế phẩm sinh học để kiểm soát *V. parahaemolyticus* mang gen pir^{AB} gây bệnh AHPND trên tôm, các chủng được phân lập và sàng lọc từ bùn đất ở rừng ngập mặn ở Khánh Hòa. Các chủng phân lập tiềm năng đã được sàng lọc và nghiên cứu đánh giá khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* mang gen pir^{AB}, khả năng tan huyết và hoạt tính sinh enzyme ngoại bào thủy phân cellulase, amylase và protease. Chủng vi khuẩn *Bacillus* tiềm năng được định danh bằng test kit sinh hóa và giải trình tự 16sRNA.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu bùn được thu từ rừng ngập mặn ở Tân Đảo - Ninh Ích - Khánh Hòa. Mẫu được chứa trong lọ thủy tinh đã được vô trùng, bảo quản lạnh bằng ướp đá và vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích.

- Mẫu tôm được thu từ các ao tôm nuôi tại tỉnh Khánh Hòa. Tôm được sục khí và vận chuyển về phòng thí nghiệm Đại học Nha Trang để tiến hành phân lập vi khuẩn.

- Bốn chủng *Vibrio parahemolyticus* mang gen pir^{AB} (A23, H7, P1, P3) thu từ ao tôm nhiễm AHPND tại Khánh Hòa năm 2019-2021 và được lưu giữ tại phòng thí nghiệm trường Đại học Nha Trang.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phân lập vi khuẩn *Bacillus* spp.

Bacillus được phân lập từ mẫu bùn và ruột tôm theo phương pháp của Purivirojkul và cộng sự [11]. Mẫu được nghiền bằng chày vô trùng và hòa với dung dịch 2% NaCl trước khi được gia nhiệt ở 80°C trong 15 phút. Mẫu sau gia nhiệt được pha loãng hệ số 10 với dung dịch 2% NaCl và cấy trải trên đĩa môi trường chọn lọc HiCrome™ *Bacillus* Agar (Himedia). Sau 24-48 giờ ủ ở 30°C, các khuẩn lạc đặc trưng của *Bacillus* được cấy thuần nhiều lần trên môi trường chọn lọc HiCrome™ *Bacillus* Agar [12], [13] và LB agar. Các dòng *Bacillus*

thuần được lưu giữ ở -80°C trong glycerol 25% sau khi kiểm tra bằng nhuộm Gram, hình thái tế bào, nhuộm bào tử, thử nghiệm catalase bằng dung dịch H_2O_2 3%, thử nghiệm oxidase trên đĩa giấy có tấm N-dimethyl-para-phenylenediamine, thử nghiệm khả năng di động trong môi trường thạch mềm và khả năng lên men đường D-glucose.

2.2 Đánh giá khả năng kháng *V. parahaemolyticus* pir^{AB}

Sử dụng phương pháp cấy vạch thẳng vuông góc (Cross-streak) [14]–[16] và phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch [11], để khảo sát đặc tính đối kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*: vi khuẩn gây bệnh được cấy thẳng vạch lên đĩa môi trường Muller Hinton agar (MHA, Himedia) 1,5% NaCl. 4 chủng *Vibrio parahaemolyticus* pir^{AB} được cấy thẳng vạch vuông góc với vạch *Bacillus* sp. đầu tiên, ủ ở 30°C , quan sát sau 24 giờ [16].

Phương pháp giếng khuếch tán: trải 50 μl dịch *V. parahaemolyticus* pir^{AB} (đã nuôi cấy qua 24h với mật độ 10^8CFU/ml) lên đĩa môi trường MHA bổ sung 1,5% NaCl. Tạo 5 giếng với đường kính 6 mm. Sử dụng 50 μl dịch thô *Bacillus* (sau 48h nuôi cấy lỏng trong LB 1,5%NaCl, ly tâm 13.000 rpm trong 15 phút ở 4°C , loại cặn tế bào và thu dịch thô) bơm vào các giếng của đĩa thạch đã chứa *V. parahaemolyticus* pir^{AB}. Tiến hành ủ mẫu ở 4°C trong 15 phút cho dung dịch trong giếng khuếch tán. Sau đó, đĩa được ủ ở 30°C trong 24 giờ để vi khuẩn chỉ thị phát triển. Quan sát và đo đường kính vòng vô khuẩn. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại [14].

2.3 Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng trên môi trường LB agar có bổ sung cơ chất thích hợp theo phương pháp của Phạm Văn Ty [17] có hiệu chỉnh để phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Tế bào của các dòng *Bacillus* spp. được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37°C trong 36-48 giờ. Sau 36-48 giờ nuôi cấy, tiến hành ly tâm dịch tăng sinh ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút để thu phần dịch trong (enzyme thô). Chuẩn bị đĩa môi trường LB agar có bổ sung từng loại

cơ chất: 1% CMC (carboxymethyl cellulose), 1% tinh bột, 1% casein tương ứng cho khảo sát khả năng sinh các enzyme cellulase, amylase và protease. Tạo 3 giếng trên đĩa thạch, sau đó dùng micropipet thu 50 μL dịch enzyme thô bơm vào các giếng, ủ các đĩa khảo sát ở 37°C trong 24 giờ. Sử dụng các thuốc nhuộm Lugol 1% và congo red 1% tương ứng với cơ chất tinh bột, CMC và casein để hiện vòng phân giải trên đĩa thạch. Những dòng có khả năng sinh enzyme ngoại bào khi xuất hiện vòng phân giải xung quanh giếng thạch.

Vi khuẩn *Bacillus* kháng *V. parahaemolyticus* pir^{AB} được thử nghiệm khả năng tán huyết bằng cách cấy lên môi trường thạch máu Blood Agar (bổ sung 5% máu cừu). Tiến hành với vi khuẩn đối chứng không tan huyết. Đọc kết quả sau khi ủ ở 30°C trong 24 giờ [18].

2.4 Khảo sát khả năng chịu mặn

Khảo sát khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn theo phương pháp của Arici và cộng sự [19] có hiệu chỉnh để phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Chuẩn bị môi trường LB được biến đổi thành phần như sau: NaCl (0; 1; 2; 3; 4; 5% (w/v)). Nuôi tăng sinh các dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. tuyển chọn được trong 10 mL môi trường LB ở 37°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ, tiến hành đo OD ở bước sóng 600 nm để xác định và điều chỉnh mật số vi khuẩn nằm trong khoảng 10^8 tế bào/mL. Thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm 2.000 vòng/phút trong 15 phút. Hòa tan sinh khối bằng 1 mL môi trường được bổ sung các nồng độ muối khác nhau sau đó chuyển dịch huyền phù vi khuẩn vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường LB với thành phần được biến đổi tương ứng, lắc ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó 24 giờ, tiến hành xác định mật số vi khuẩn trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp pha loãng mẫu và đếm sống.

2.5 Khảo sát khả năng chịu pH

Chuẩn bị môi trường LB được thay đổi pH về các mức 4, 5, 6, 7, 8, 9 (do điều kiện pH thích hợp cho tôm nuôi từ 7,5 - 8,35). Cách tiến hành tương tự mục 2.4 [19].

2.6 Định danh các dòng vi khuẩn đã chọn lọc bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

Chủng vi khuẩn *Bacillus* được sàng lọc sơ bộ được định danh tiếp bằng định danh sinh hóa bằng HiBacillus Identification Kit (Himedia) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Chủng sau khi định danh sinh hóa được lựa chọn và tiến hành định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA. Vi khuẩn có lợi được tách chiết bằng bộ kit Toppure® genomic DNA extraction kit của công ty ABT theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vi khuẩn có lợi phân lập được từ tôm sẽ được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA bằng cặp mồi 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1495R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3' [20]. Các phản ứng được thực hiện theo kit MyTaq (Bioline) và máy luân nhiệt Thermal cycler (BioRad). Quan sát sản phẩm PCR trong

gel agarose có nhuộm Ethidium bromide. Sản phẩm PCR được tinh chế và giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm Geneious.

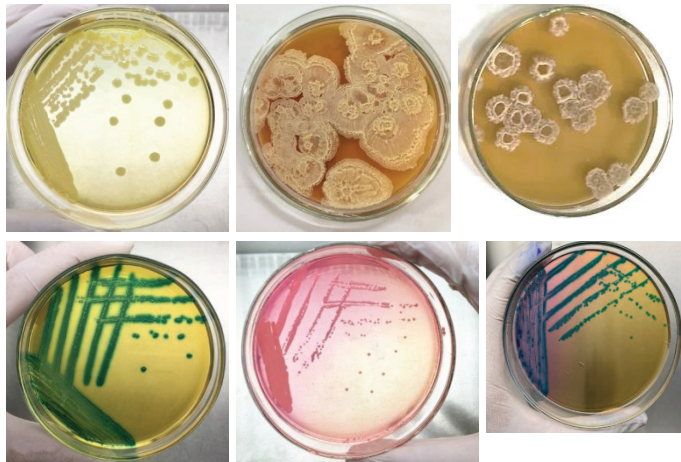
2.7. Phương pháp xử lý số liệu:

Số liệu thu thập được tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức theo phương pháp phân tích Anova 2 nhân tố với phép thử Duncan thông qua phần mềm SPSS với mức ý nghĩa ($p < 0,05$).

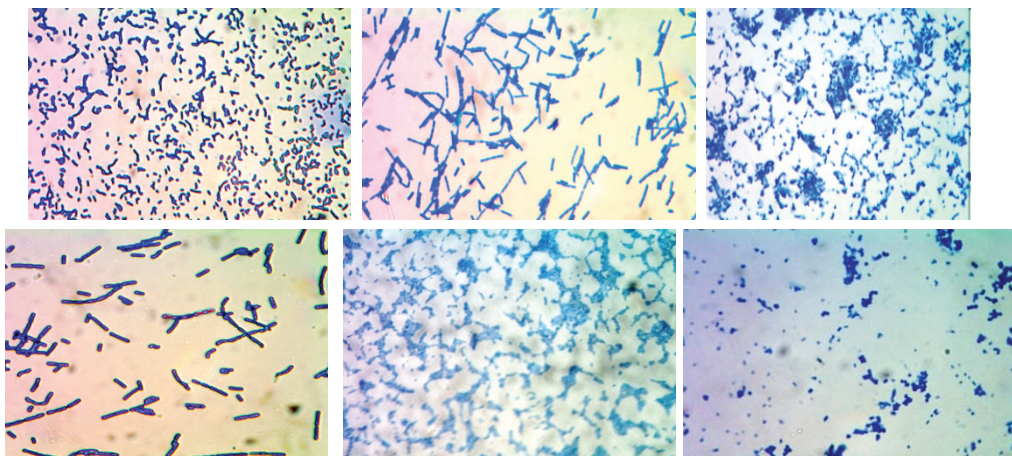
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập các dòng *Bacillus* spp.

Nghiên cứu đã phân lập được 43 dòng vi khuẩn khác nhau với nhiều hình thái khác nhau trên môi trường chọn lọc Hicrome Bacillus



Hình 1: Đặc điểm khuẩn lạc một số dòng *Bacillus* spp. trên môi trường Hicrome Bacillus agar.



Hình 2: Đặc điểm hình thái hiển vi một số dòng *Bacillus* spp. (100x).

agar (Hình 1) từ 20 mẫu bùn đất thu ở rừng ngập mặn và 20 mẫu tôm tại Khánh Hòa. Dựa vào hình thái khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc, các chủng thu nhận được có khả năng là *B. subtilis* (khuẩn lạc màu trắng đục, bìa không đều, có nếp nhăn; hoặc khuẩn lạc tròn có màu xanh lục); *B. pumilus* (khuẩn lạc tròn có màu xanh lục); *B. megaterium* (Khuẩn lạc vàng, nhầy, to tròn); *B. cereus* (khuẩn lạc xanh lá chuyên xanh dương, môi trường chuyển màu hồng); *B. coagulans* (khuẩn lạc nhỏ, màu hồng) [12], [13]. 33/43 dòng vi khuẩn này có các đặc điểm điển hình của *Bacillus* bao gồm

Gram dương, sinh bào tử, tế bào dạng hình que thẳng, dài hoặc ngắn, di động, catalase dương tính (Hình 2) [21].

2. Đánh giá khả năng kháng *V. parahaemolyticus* pir^{AB}

Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của dịch nuôi cấy 33 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. đối với 4 dòng *parahaemolyticus* pir^{AB} cho thấy có 9 trên tổng số 33 dòng vi khuẩn khảo sát thể hiện được khả năng đối kháng với các dòng vi khuẩn kiểm định ở những mức độ khác nhau (Bảng 1; Hình 3, Hình 4).

Bảng 1: Khả năng kháng khuẩn dịch nuôi cấy *Bacillus* spp. đối với các dòng vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* pir^{AB}

Dòng vi khuẩn	Nguồn phân lập	Chiều dài vạch kháng khuẩn (mm)			
		P1	P3	H7	A23
CCT-Ba2	Hệ tiêu hóa tôm	-	12,33 ^a	-	11,50
CCT-Ba5	Đất bùn rừng ngập mặn Khánh Hòa	13,33 ^a	10,17 ^b	-	5,83
CCT-Ba8	Đất bùn rừng ngập mặn Khánh Hòa	14,67 ^a	-	4,17	-
CCT-Ba9	Hệ tiêu hóa tôm	13,00 ^a	11,17 ^{ab}	5,17	9,50
CCT-Ba14	Đất bùn rừng ngập mặn Khánh Hòa	-	4,17 ^c	11,17	7,17
CCT-Ba17	Hệ tiêu hóa tôm	-	-	12,30	6,83
CCT-Ba24	Hệ tiêu hóa tôm	6,50 ^b	17,67 ^d	-	-
CCT-Ba29	Hệ tiêu hóa tôm	16,67 ^c	8,17 ^c	-	6,67
CCT-Ba42	Đất bùn rừng ngập mặn Khánh Hòa	16,17 ^c	12,33 ^a	14,33	-

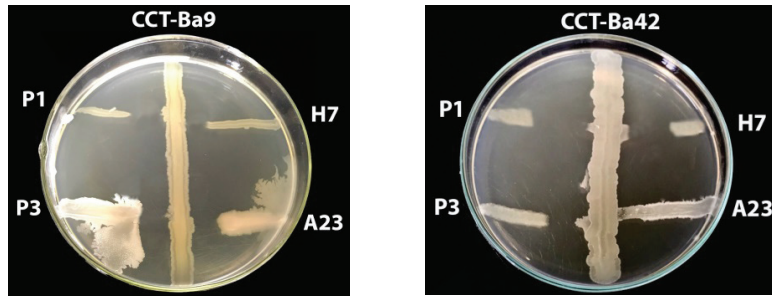
Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Giữa các mẫu (các dòng vi khuẩn), trong cùng một cột, các giá trị trung bình có cùng chữ cái thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% theo kiểm định Tukey.

9/33 dòng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* mang gen pir^{AB}. Với phương pháp vạch thẳng vuông góc, chủng có đối kháng khi đường cấy của chủng *V. parahaemolyticus* mọc cách xa đường cấy chủng *Bacillus* khảo sát (Hình 3). Khoảng cách vạch kháng cao nhất đạt 17,67mm (chủng CCT-Ba24 kháng *V. parahaemolyticus* pir^{AB} P3). Chủng CCT-Ba9 kháng với cả 4 chủng *V. parahaemolyticus* mang gen pir^{AB}. Chủng CCT-Ba42 kháng mạnh với 3 chủng *V. parahaemolyticus* mang gen pir^{AB} (12,33-16,17mm).

3. Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào

Các vi sinh vật có khả năng tiết các enzyme ngoại bào để phân hủy các chất cặn bã, thức ăn thừa tồn đọng trong ao, hạn chế khả năng

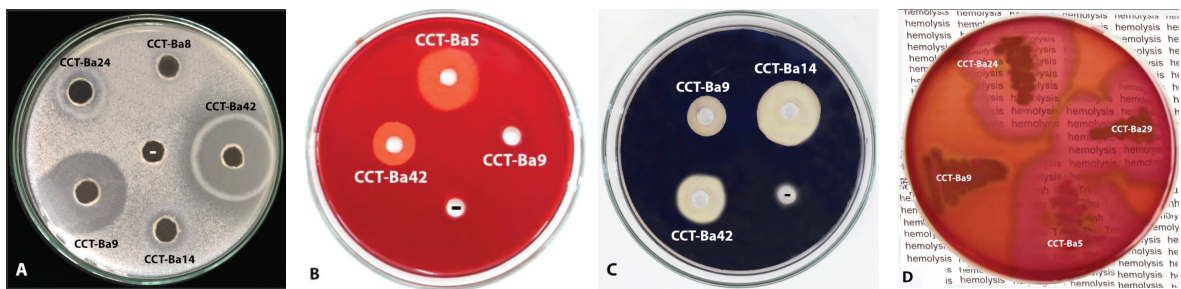
gây bệnh của các dòng vi khuẩn gây bệnh. Đồng thời, các enzyme này còn đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp thức ăn dễ hấp thu và vật nuôi tăng trưởng tốt. Do đó, khả năng sinh enzyme ngoại bào là một tiêu chí quan trọng khi chọn lọc các dòng vi khuẩn làm probiotic [22]. Vì vậy, 9 dòng vi khuẩn có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* mang gen pir^{AB} từ thí nghiệm trên sẽ được tiến hành khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Khả năng sinh các enzyme ngoại bào (protease, amylase, cellulase và β-hemolysis) được thể hiện ở Bảng 2. 9 chủng khảo sát đều có khả năng phân giải ít nhất một enzyme ngoại bào. Tất cả các dòng vi khuẩn khảo sát đều có khả năng sinh amylase. 7/9 dòng vi khuẩn khảo



Hình 3: Kết quả đối kháng của chủng CCT-Ba9 và CCT-Ba42 lên 4 chủng *V. parahemolyticus* pir^{AB} bằng phương pháp vạch thẳng vuông góc.

sát có khả năng sinh protease trong đó CCT-Ba9 và CCT-Ba42 tạo vòng phân giải lớn nhất (~20mm). 4/9 dòng vi khuẩn khảo sát có khả năng sinh cellulose trong đó CCT-Ba14 tạo vòng phân giải lớn nhất (~17mm). 2/9 dòng vi khuẩn khảo sát sinh không sinh β-hemolysis nên không tán huyết trên môi trường thạch

máu. Tiêu chí quan trọng của chủng lợi khuẩn bổ sung vào ao nuôi là không gây độc cho vật nuôi, và tính độc của chủng lợi khuẩn được đánh giá dựa trên đặc tính tan huyết trên môi trường máu nhằm loại trừ những chủng có khả năng gây độc cho vật chủ khi phối trộn vào chế phẩm sinh học.



Hình 4. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của một số dòng vi khuẩn thử nghiệm: protease (A); cellulose (B); amylase (C); β-hemolysis (D)

Bảng 2: Kết quả đánh giá khả năng tan huyết và khả năng sinh enzyme ngoại bào của các 9 chủng *Bacillus* spp.

STT	Chủng vi khuẩn	Nguồn phân lập	Khả năng sinh enzyme ngoại bào			
			β-hemolysis (tan huyết)	Amylase	Cellulose	Protease
1	CCT-Ba2	Hệ tiêu hóa tôm	+	+	-	+
2	CCT-Ba5	Rừng ngập mặn	+	+	+	-
STT	Chủng vi khuẩn	Nguồn phân lập	Khả năng sinh enzyme ngoại bào			
			β-hemolysis (tan huyết)	Amylase	Cellulose	Protease
4	CCT-Ba9	Hệ tiêu hóa tôm	-	+	-	+
5	CCT-Ba14	Rừng ngập mặn	+	+	+	+
6	CCT-Ba17	Hệ tiêu hóa tôm	+	+	-	+
7	CCT-Ba24	Hệ tiêu hóa tôm	+	+	-	+
8	CCT-Ba29	Hệ tiêu hóa tôm	+	+	-	+
9	CCT-Ba42	Rừng ngập mặn	-	+	+	+

Ghi chú: (+) những dòng có khả năng sinh enzyme ngoại bào, (-) những dòng có khả năng sinh enzyme ngoại bào

Khả năng sinh enzyme ngoại bào khác nhau giữa các chủng khác nhau phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ramesh và cộng sự [23]. Nhóm nghiên cứu khảo sát tiềm năng probiotic của 2 dòng *B. licheniformis* và *B. pumilus* chọn lọc từ 26 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ ruột của cá trôi Ấn Độ, cả hai dòng đều thể hiện hoạt tính enzyme amylase, tuy nhiên chỉ có dòng *B. licheniformis* thể hiện hoạt tính protease.

4. Đánh giá khả năng chịu muối, chịu pH

Căn cứ trên kết quả sinh hóa, tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mang gen pir^{AB} và đặc tính sinh enzyme ngoại bào, không có khả năng tan huyết, chủng CCT-Ba9 và CCT-Ba42 được lựa chọn để khảo sát khả năng chịu muối và pH nhằm đánh giá khả năng sử dụng 2 chủng này cho môi trường ao nuôi tôm. Chủng vi khuẩn CCT-Ba9 và CCT-Ba42 đều có khả năng phát triển trong môi trường bổ sung NaCl từ 0% đến 3%. Khả năng sinh trưởng của cả 2 dòng vi khuẩn đều giảm trong môi trường được bổ sung NaCl với nồng độ từ 4% trở lên.

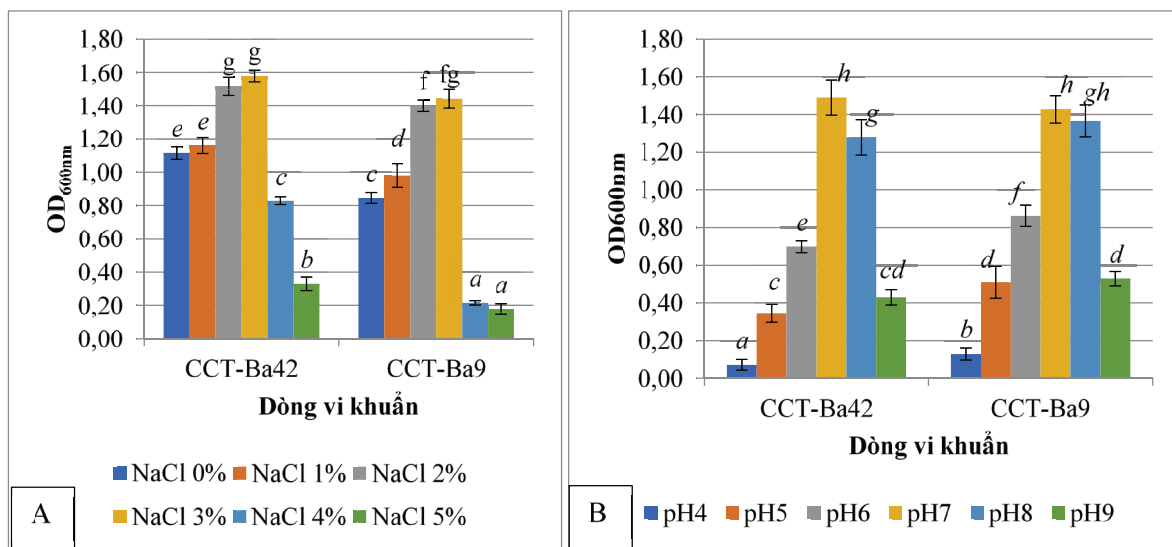
Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Văn Phúc và Phan Thị Phương Trang [22] khi khảo sát các đặc tính có lợi của 2 dòng vi khuẩn *B. subtilis* BN1 và BD23.1 phân lập từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre, cả 2 dòng đều

có khả năng sinh trưởng trong môi trường được bổ sung muối với các nồng độ từ 0-5%, rong đó chúng phát triển tốt nhất ở nồng độ muối từ 0-2% [22].

Hình 5A và 5B biểu thị kết quả đo OD600 nm sau 24 giờ và ở 37°C trên cho thấy chủng vi khuẩn CCT- CCT-Ba9 và CCT-Ba42 có khả năng sinh trưởng và phát triển ở nồng độ muối từ 0% đến 5% và khả năng thích nghi cao với pH được từ 4 đến 9, đặc biệt là sinh trưởng phát triển mạnh ở nồng độ muối là 2% và 3% và pH là 7 và 8. Với khoảng điều pH trong ao tôm nuôi nước lợ của nước ta trong khoảng từ 7,5-8,2 và nồng độ muối từ 1,5-2,55 [24], cho thấy chủng CCT-Ba9 và CCT-Ba42 có khả năng chịu khoảng pH và nồng độ muối phù hợp với điều kiện ao nuôi tôm nước ta, CCT-Ba9 và CCT-Ba42 có tiềm năng áp dụng trong nuôi nước lợ và nước mặn, thích hợp để sản xuất làm chế phẩm vi sinh học trong nuôi trồng thủy sản. CCT-Ba42 và CCT-Ba9 đều có khả năng phát triển trong môi trường có pH dao động từ 4-9, tuy nhiên ở giá trị pH dưới 5, khả năng sinh trưởng của cả 2 dòng đều giảm so với ở các giá trị pH còn lại.

3.5 Định danh sinh hóa bằng kit và định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

Cả 2 chủng CCT-Ba42 và CCT-Ba9 đều có tiềm năng sử dụng làm chế phẩm: có



Hình 5. Khả năng chịu muối và chịu pH của dòng vi khuẩn CCT-Ba42 và CCT-Ba9

Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Giữa các mẫu (các dòng vi khuẩn), trong cùng một cột, các giá trị trung bình có cùng chữ cái thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% theo kiểm định Tukey.

khả năng đối kháng với *V. parahemolyticus* mang gene độc tố pir^{AB}, không có khả năng làm tan huyết và sinh các enzyme ngoại bào (cellulose, protease, amylase) tốt. 2 chủng vi khuẩn này được định danh bằng kit HiBacillus Identification Kit (Himedia). Các đặc điểm sinh hóa của 2 dòng vi khuẩn này được thể hiện ở Bảng 3 và Hình 7. Các đặc điểm sinh hóa của CCT-Ba9 và CCT-Ba42 lần lượt phù hợp với đặc điểm của *B. pumilus* và *B. subtilis*.

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của chủng CCT-Ba9 và CCT-Ba42 trên được thể hiện ở Hình 8. Dựa vào kết quả giải trình tự gen 16S rRNA và được tra cứu trên ngân hàng Gen bằng

chương trình Blast Search đã xác định được CCT-Ba9 là *B. pumilus* và CCT-Ba42 là *B. subtilis* với mức độ tương đồng 100% với chủng *B. pumilus* KY316434.1 và *B. subtilis* MK183007.1. Cây phát sinh loài của gen 16S rRNA của chủng *Bacillus* CCT-Ba9, CCT-Ba42, và các chủng *Bacillus* khác (*B. cereus* NIBSM OsG2, *B. paramycooides* LU6, *B. pumilus* KY316434.1, *B. stratosphericus* SR119, *B. subtilis* MK183007.1, *B. thuringiensis* ISJ33, *B. tropicus* ISP161A, *B. zhangzhouensis* KLP19 và *Escherichia coli* NR_024570.1) cũng cho thấy CCT-Ba9 và CCT-Ba42 gần gũi với *B. pumilus* và *B. subtilis*.

Bảng 3: Định danh sinh hóa bằng kit

Chủng	Malonate	Voges Proskauer's	Citrate	ONP G	Nitrate Reduction	Catalase	Arginine	Sucrose	Mannitol	Glucose	Arabinose	Trehalose
CC T-Ba9	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
CC T-Ba42	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+



(A)



(B)

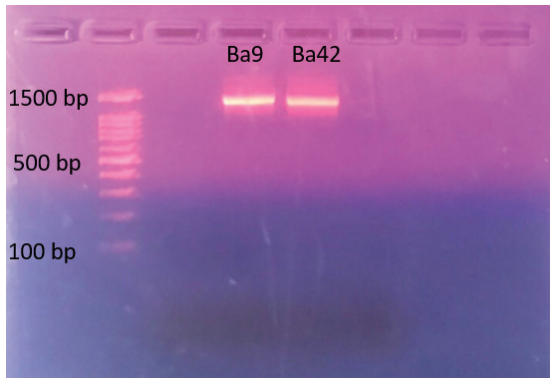
Hình 7: Kết quả kiểm tra đặc điểm sinh hóa của chủng CCT-Ba9 (A) và CCT-Ba42 (B) sử dụng bộ kit HiBacillus Identification Kit (Himedia).

B. pumilus và *B. subtilis* là hai trong số các loài lợi khuẩn được sử dụng rất phổ biến trong nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là khi thức ăn bổ sung cho *L. vannamei* ở nồng độ 10% và 15%, đặc biệt là khi bổ sung vào thức ăn cho *L. vannamei* ở nồng độ 10% và 15%, các thông số như mức glucose, mức protein và mức chất béo trung tính trong huyết tương cao hơn nhóm không bổ sung vi khuẩn này vào thức ăn [25]. 2 loài vi khuẩn này tạo ra các chất kháng khuẩn, tăng cường hệ miễn dịch, hấp thụ chất dinh dưỡng, đặc tính chống lại vi khuẩn gây bệnh khác như *V. harveyi* and *V. mimicus* [26]. Khi bổ sung

B. pumilus BP-171 vào thức ăn, tốc độ tăng trưởng, trọng lượng cơ thể cuối cùng, hiệu quả sử dụng thức ăn và tỷ lệ sống của tôm tốt hơn so với đối chứng ($p < 0,05$). Trong số đó, hiệu suất tăng trưởng tốt nhất của tôm được quan sát thấy ở nhóm BP. Nồng độ amoniac, nitrit, nitrat và tổng nitơ thấp hơn đáng kể ở nhóm bổ sung vi khuẩn *B. pumilus* BP-171 so với đối chứng ($p < 0,05$) [27].

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 33 chủng *Bacillus* từ mẫu bùn rừng ngập mặn và tôm nuôi tại tỉnh Khánh Hòa. Trong 9 chủng *Bacillus* đối kháng với *V. parahemolyticus*



Hình 8: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA của chủng *Bacillus* CCT-Ba9 và CCT-Ba42.

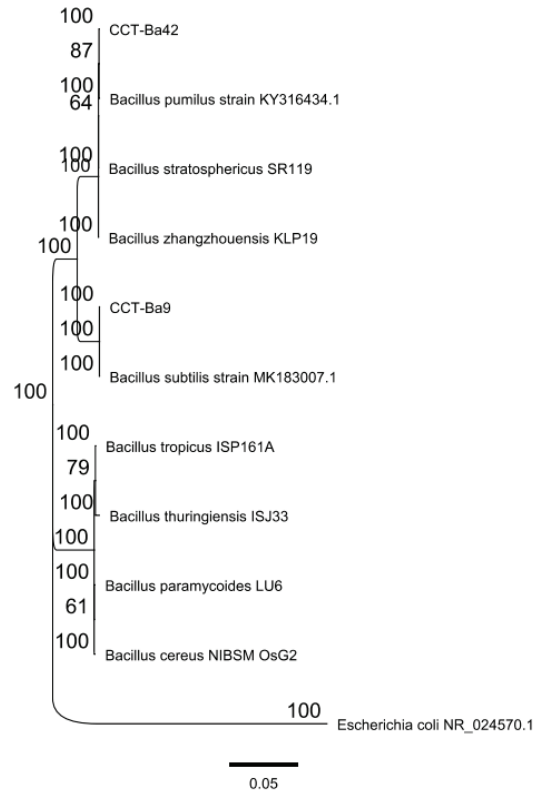
mang gen pir^{AB} , CCT-Ba9 và CCT-Ba42 tạo ra vạch đối kháng lớn nhất và có khả năng sinh enzyme ngoại bào tốt bao gồm cellulase, amylase, protease. Cả hai chủng CCT-Ba9 và CCT-Ba42 không có khả năng tan huyết. CCT-Ba9 và CCT-Ba42 định danh là *B. pumilus* and *B. subtilis* bằng kit sinh hóa và giải trình tự gen 16S rRNA. Cả 2 loài đều cho thấy phát triển tốt ở độ pH từ 4.0 đến 8.0 and độ mặn từ 0 đến 50‰. Kết quả của nghiên cứu cho thấy *Bacillus* CCT-Ba9 và CCT-Ba42 có tiềm năng phát triển thành chế phẩm sinh học để ngăn ngừa AHPND ở tôm nuôi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần của đề tài TR2021-13-08 được thực hiện với nguồn kinh phí từ Trường Đại học Nha Trang. Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Trường Đại học Nha Trang đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Peng Li, Lisa N. Kinch, Ann Ray, Ankur B. Dalia, Qian Cong, Linda M. Nunan, Andrew Camilli, Nick V. Grishin, Dor Salomon, Kim Ortha, “Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 83, no. 13, 2017, doi: 10.1128/AEM.00737-17.
2. S. A. Soto-Rodriguez, B. Gomez-Gil, R. Lozano-Olvera, M. Betancourt-Lozano, and M. S. Morales-Covarrubias, “Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico,”



Hình 9: Cây phát sinh loài của gen 16S rRNA của chủng *Bacillus* CCT-Ba9, CCT-Ba42, và các chủng *Bacillus* khác (*B. cereus* NIBSM OsG2, *B. paramycooides* LU6, *B. pumilus* KY316434.1, *B. stratosphericus* SR119, *B. subtilis* MK183007.1, *B. thuringiensis* ISJ33, *B. tropicus* ISP161A, *B. zhangzhouensis* KLP19 và *Escherichia coli* NR_024570.1).

- Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 5, pp. 1689–1699, 2015, doi: 10.1128/AEM.03610-14.
3. Shin-Jen Lin, Kai-Cheng Hsu and Hao-Ching Wang, “Structural Insights into the Cytotoxic Mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* PirA(vp) and PirB(vp) Toxins.,” *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 12, Dec. 2017, doi: 10.3390/md15120373.
 4. Joy E. M. Watts, Harold J. Schreier, Lauma Lanska and Michelle S. Hale, “The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions,” *Marine Drugs*, 15, 6., 2017. doi: 10.3390/md15060158.
 5. M. Touraki, G. Karamanlidou, P. Karavida, and K. Chrysi, “Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia nauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.),” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, no. 6, pp. 2425–2433, Jun. 2012, doi: 10.1007/s11274-012-1052-z.
 6. S Salminen, A Ouwehand, Y Benno, Y.K Lee, “Probiotics: how should they be defined?,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 10, no. 3, pp. 107–110, 1999, [Online]. Available: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00027-8).
 7. A. Newaj-Fyzul, A. H. Al-Harbi, and B. Austin, “Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture,” *Aquaculture*, vol. 431, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.08.026.
 8. C. Nithya, C. Aravindraja, and S. K. Pandian, “*Bacillus pumilus* of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria,” *Res. Microbiol.*, vol. 161, no. 4, pp. 293–304, May 2010, doi: 10.1016/j.resmic.2010.03.002.
 9. F. K. A. Kuebutornye, E. D. Abarike, and Y. Lu, “A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture,” *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 87. Academic Press, pp. 820–828, Apr. 01, 2019. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.010.
 10. J. Olmos Soto, “Feed intake improvement, gut microbiota modulation and pathogens control by using *Bacillus* species in shrimp aquaculture,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 2., 2021. doi: 10.1007/s11274-020-02987-z.
 11. W. Purivirojkul, M. Maketon, and N. Areechon, “Probiotic properties of *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon fabricius*) culture,” *Agric. Nat. Resour.*, vol. 39, no. 2, pp. 262–273, 2005.
 12. Himedia, “Technical data,” 2017.
 13. A. M. Alippi and E. Abrahamovich, “HiCrome Bacillus agar for presumptive identification of *Bacillus* and related species isolated from honey samples,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 305, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108245.
 14. R. Chythanya, I. Karunasagar, and I. Karunasagar, “Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain.” *Aquaculture* 208, 1–2, 1-10
 15. V. Mishra and D. N. Prasad, “Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 103, no. 1, pp. 109–115, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.047.
 16. W. Puri, “Application of *Bacillus* spp. isolated from the intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*) from natural habitat for control pathogenic bacteria in aquaculture genomic characterization and genomic comparison of fish infectious pathogens. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 41 : 125 - 132 (2007)
 17. Phạm Văn Ty, *Công nghệ sinh học – công nghệ vi sinh và môi trường.*. NXB Giáo Dục, Tp.HCM., 2006.

18. N. R. Smibert, R.M. and Krieg, “General Characterization,” in *Gerdhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips, G.B., Eds., Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1981, pp. 409–443.
19. M. Arici, B. Bilgin, O. Sagdic, and C. Ozdemir, “Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces,” *Food Microbiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 19–24, 2004, doi: 10.1016/S0740-0020(03)00044-3.
20. S. Selvakumaran, A. Kapley, V. C. Kalia, and H. J. Purohit, “Phenotypic and phylogenetic groups to evaluate the diversity of *Citrobacter* isolates from activated biomass of effluent treatment plants,” *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 5, pp. 1189–1195, 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.02.021.
21. Trần Linh Thuộc, *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Nhà xuất bản Giáo dục, Thành phố Hồ Chí Minh, 2010.
22. Nguyễn Văn Phúc and Phan Thị Phương Trang, “Phân lập định danh và xác định các đặc tính có lợi của chủng *Bacillus* spp. từ ao nuôi tôm ở các tỉnh Bến Tre,” *Tap chí Khoa học ĐHSP TPHCM*, vol. 64, pp. 94–102, 2014.
23. D. Ramesh, A. Vinothkanna, A. K. Rai, and V. S. Vignesh, “Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*,” *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 45, pp. 268–276, 2015.
24. Nguyễn Văn Hào, “Hướng dẫn quản lý chất lượng nước trong ao nuôi tôm sú dành cho người nuôi thủy sản,” *Bộ Thủy Sản*, pp. 3–7, 2004.
25. Sreenivasulu P, Suman Joshi DSD, Narendra K, Venkata Rao G, Krishna Satya A, “*Bacillus pumilus* as a potential probiotic for shrimp culture,” *Int. J. Fish. Aquat. Stud.*, vol. 4, no. 1, pp. 107–110, 2016.
26. J. E. Hill, J. C. F. Baiano, and A. C. Barnes, “Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens,” *J. Fish Dis.*, vol. 32, no. 12, pp. 1007–1016, Dec. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01084.x.
27. Wang, M.; Liu, Y.; Luo, K.; Li, T.; Liu, Q.; Tian, X. Effects of *Bacillus pumilus* BP-171 and Carbon Sources on the Growth Performance of Shrimp, Water Quality and Bacterial Community in *Penaeus vannamei* Culture System. *Water* **2022**, *14*, 4037. <https://doi.org/10.3390/w14244037>.