

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG VÀ KHÁNG KHUẨN *Flavobacterium columnare* CỦA MỘT SỐ CHỦNG PROBIOTICS PHÂN LẬP TỪ AO NUÔI THỦY SẢN

Trương Đình Hoài^{1*}, Đặng Thị Hoà¹, Trần Thị Trinh¹,
Đoàn Thị Ninh¹, Đỗ Thị Hồng², Đỗ Thị Chung², Nguyễn Thị Hải Yến²

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Phòng Nghiên cứu và Phát triển, Công ty TNHH Bio-floc

*Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.02.2025

Ngày chấp nhận đăng: 18.05.2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, sàng lọc các chủng vi khuẩn có lợi có khả năng xử lý môi trường nước và kháng vi khuẩn *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên một số loài cá nước ngọt. Tổng số 11 chủng *Bacillus* sp. và 08 chủng *Lactobacillus* sp. được phân lập từ 15 mẫu bùn ao nuôi tôm, cá nước ngọt và hồ tự nhiên. Kết quả đánh giá khả năng phân giải protein, cellulose, tinh bột của *Bacillus* sp. và CaCO_3 của *Lactobacillus* sp. cho thấy 04/19 chủng có khả năng phân giải cao. Quá trình định danh 4 chủng thông qua giải trình tự gene 16S rRNA cho kết quả 2 chủng là *B. subtilis*, 1 chủng là *B. amyloliquefaciens* và 1 chủng là *L. plantarum*. Kết quả đánh giá khả năng đối kháng của 4 chủng với 6 chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập từ cá nước ngọt ghi nhận đường kính vòng vô khuẩn dao động 9,9-11,5mm với *B. subtilis*, 13,1-14,9mm với chủng *B. amyloliquefaciens*, 24,8-28,4mm với chủng *L. plantarum*. Kết quả của thử nghiệm cho thấy 4 chủng vi sinh phân lập trong nghiên cứu này có tiềm năng sử dụng để sản xuất chế phẩm xử lý môi trường và phòng bệnh do vi khuẩn *F. columnare* gây ra trên cá nước ngọt.

Từ khóa: *Bacillus*, *Lactobacillus*, xử lý môi trường, kháng khuẩn, *Flavobacterium columnare*.

Evaluation of Environmental Treatment and Antimicrobial Activity of Probiotic Bacteria from Aquaculture Ponds Against *Flavobacterium columnare*

ABSTRACT

This study aimed to evaluate beneficial bacterial strains with the potential for environmental water treatment and resistance to the bacterium *Flavobacterium columnare*, which poses a threat to various species of freshwater fish. A total of 11 strains of *Bacillus* sp. and 8 strains of *Lactobacillus* sp. were successfully isolated from 15 sediment samples from cultured shrimp, fish and natural lakes. Assessment of the protein, cellulose, and starch degradation capabilities of *Bacillus* strains, along with the calcium carbonate dissolution activity of *Lactobacillus* strains, indicated that 4 out of the 19 strains exhibited significant degradation potential. Identification of these 4 strains through 16S rRNA sequencing revealed 2 strains of *Bacillus subtilis*, 1 strain of *Bacillus amyloliquefaciens*, and 1 strain of *Lactobacillus plantarum*. The evaluation of the antagonistic effects of these strains against 6 *F. columnare* strains isolated from freshwater fish demonstrated inhibition zone diameters ranging from 9.9 to 11.5 mm for *B. subtilis*, 13.1 to 14.9mm for *B. amyloliquefaciens*, and 24.8 to 28.4mm for *L. plantarum*. The results highlight the potential of these four isolated microbial strains for developing formulations aimed at environmental remediation and prevention disease related to *F. columnare* in freshwater aquaculture.

Keywords: *Bacillus*, *Lactobacillus*, water treatment, bactericidal, *Flavobacterium columnare*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong nuôi trồng thủy sản, chế phẩm sinh học được sử dụng phổ biến giúp phân hủy các hợp chất hữu cơ để cải thiện và làm sạch môi trường

nước, tăng cường tiêu hoá, hấp thu, kích thích tăng trưởng và miễn dịch cho động vật thủy sản (Rengpipat & cs., 2003). Ngoài ra, nhiều loài vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* và *Lactobacillus* là những chủng vi khuẩn có lợi, có khả năng phân

huỷ hữu cơ và có khả năng tiết ra các enzyme để ức chế vi khuẩn gây bệnh (Adel & cs., 2017). Hiện nay tình hình dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản khá phức tạp, đặc biệt là các bệnh do vi khuẩn do sự phát triển mạnh của các mô hình nuôi mật độ cao, ô nhiễm môi trường và biến đổi khí hậu. Việc sử dụng kháng sinh sai mục đích hay lạm dụng thuốc kháng sinh trong kiểm soát bệnh làm gia tăng nhanh vi khuẩn kháng kháng sinh, tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thủy sản, tăng chi phí và khó khăn cho điều trị bệnh (Từ Thanh Dung & cs., 2012). Do vậy, sàng lọc các chủng vi sinh có lợi vừa có khả năng xử lý môi trường vừa có khả năng ức chế tác nhân gây bệnh trực tiếp trong nước nuôi đang là một xu hướng tất yếu trong của thực tế sản xuất thủy sản hiện nay. Gần đây một số chủng vi sinh có lợi mang cả hai đặc tính này đã được tập trung nghiên cứu và ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản như chủng *B. Subtilis*, *B. velezensis* có khả năng làm sạch môi trường và ức chế nhiều loại vi khuẩn trong ao nuôi như *Pseudomonas* spp. *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* và *Vibrio parahaemolyticus* (Yi & cs., 2018; Zhang & cs., 2021).

Vi khuẩn *F. columnare* là tác nhân gây bệnh trắng da, bạc đuôi được báo cáo một thập kỷ trước đây, gây ảnh hưởng nghiêm trọng trên cá tra nuôi với tỷ lệ chết 80-100% cá hương, cá giống và 35-60% cá trưởng thành (Từ Thanh Dung & cs., 2012). Hiện nay tác nhân này đang gây ra nhiều vụ dịch với tỷ lệ chết cao và được coi là bệnh tái nổi nguy hiểm và gây thiệt hại nặng nề cho người nuôi cá nước ngọt tại miền Bắc như cá nheo Mỹ (Trương Đình Hoài & cs., 2022), cá rô phi (Đoàn Thị Ninh & cs., 2023), cá trắm cỏ (Trương Đình Hoài & cs., 2022), cá trắm đen (Hoai & cs., 2025). Vi khuẩn này thường tồn tại và gây tổn thương, hoại tử bên ngoài cơ thể như da, mang, đuôi cá tạo ra triệu chứng điển hình như trắng da, trắng đuôi, bạc mang và rất khó điều trị bằng kháng sinh theo đường thức ăn. Đặc biệt, nếu mật độ vi khuẩn cao, gây hoại tử mang nghiêm trọng, dẫn đến cá thiếu oxy và chết nhanh với tỷ lệ cao (Trương Đình Hoài & cs., 2022). Do vậy, để phòng bệnh chủ động do tác nhân này gây ra, giải pháp sử

dụng chế phẩm vi sinh vừa có tác dụng làm sạch môi trường nhưng đồng thời có tác dụng ức chế tác nhân là rất cần thiết.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và lựa chọn các chủng vi sinh có lợi vừa có khả năng xử lý môi trường và vừa có khả năng kháng khuẩn *F. columnare* để ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu bùn ao nuôi tôm, cá và hồ tự nhiên nước ngọt; các chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập từ cá rô phi, cá trắm cỏ nhiễm bệnh đang được lưu giữ tại Phòng Thí nghiệm Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Các trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất phục vụ cho quá trình thu mẫu, nuôi cấy, phân lập và định danh vi khuẩn và đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tổng số 15 mẫu bùn được thu thập từ 03 hệ thống thủy vực bao gồm 05 mẫu bùn ao nuôi tôm, 05 mẫu bùn ao nuôi cá nước ngọt ở giai đoạn thương phẩm và 05 bùn ở hồ tự nhiên. Phương pháp thu mẫu bùn được thực hiện theo hướng dẫn của tiêu chuẩn TCVN 6663-13:2000. Mẫu sau khi thu được vận chuyển và phân tích tại phòng thí nghiệm bằng phương pháp vận chuyển lạnh trong các thùng giữ nhiệt có nhiệt độ từ 3-5°C và được xử lý trong vòng 24h sau thu.

Mẫu bùn được chia làm hai phần, phần một được xử lý gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C bằng bể ủ nhiệt khô (Biologix) trong 20 phút nhằm loại bỏ tế bào sinh dưỡng và các chủng vi sinh vật không sinh bào tử. Sau khi gia nhiệt, mẫu bùn được pha loãng bằng NaCl 0,9% theo tỷ lệ 10g mẫu cho vào 90ml dung dịch NaCl 0,9% và vortex 30 phút ở 28°C. Tiếp tục pha loãng mẫu bùn đến 10^{-6} và hút 0,1ml dung dịch pha loãng nhỏ lên môi trường nuôi cấy Luria-Bertani agar (LB, Hymedia, Ấn Độ) và LB agar bổ sung 1% muối với chủng từ mẫu bùn ao tôm, sử dụng que

chang vô trùng chang đều đến khô, thực hiện lặp lại 3 lần. Phần mẫu còn lại không xử lý gia nhiệt được hoà loãng và chang cấy trên Man Rogosa Sharpe agar (MRS, Hymedia, Ấn Độ). Các đĩa sau trang cấy được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24h-48h trong điều kiện hiếu khí.

2.2.1. Phân lập và sàng lọc chủng probiotics có hoạt lực phân giải cao

Sau khi chang cấy, tiến hành tách và nuôi cấy thuần khuẩn lạc chiếm ưu thế trên các môi trường thạch tương ứng. Những khuẩn lạc rời phát triển trên môi trường LB agar được nghi ngờ là vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và được kiểm tra hình thái khuẩn lạc (màu sắc, hình dạng, rìa, độ đồng nhất), cấy thuần, nhuộm Gram, thử đặc tính di động qua kính hiển vi soi nổi, khả năng sinh bào tử, thử nghiệm oxidase, thử nghiệm catalase theo mô tả của Logan & Rodríguez-Díaz (2006). Trong khi đó, những khuẩn lạc rời phát triển trên môi trường MRS agar được nghi ngờ là vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và được nuôi thuần, nhuộm Gram, thử Catalase, phân giải CaCO_3 và hình thành Indole theo mô tả của Messi & cs. (2001) và Adhikari & Kwon (2017).

2.2.2. Phương pháp sàng lọc chủng probiotics có hoạt lực phân giải cao

Xác định hoạt tính enzyme ngoại bào bằng phương pháp đục giếng thạch (đường kính 6mm). Đối với các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp., tiến hành thử hoạt tính phân giải protein, cellulose và tinh bột tương ứng với khả năng sinh enzyme protease, cellulase và amylase. Môi trường LB agar được bổ sung 1% cơ chất là casein, carboxymethyl cellulose (CMC) hoặc tinh bột bắp, tương ứng, để đánh giá hoạt tính phân giải protein, cellulose và tinh bột theo phương pháp của Bonev & cs. (2008). Các chủng thuần *Bacillus* sp. được tăng sinh trên môi trường LB broth ở 28°C trong 24h. Hút 100µl dịch tăng sinh vi khuẩn nhỏ vào giếng đã đục trên đĩa thạch tương ứng và ủ ở 28°C trong 48h. Kiểm tra hoạt tính phân giải CMC và tinh bột bằng thuốc thử lugol và hoạt tính phân giải casein bằng axit acetic 10% theo phương pháp

của da Cruz & cs. (1985). Môi trường MRS agar được bổ sung 0,5% CaCO_3 và sử dụng phương pháp rìa cấy đánh giá khả năng phân giải CaCO_3 của *Lactobacillus* sp. do axit lactic sinh ra phân hủy CaCO_3 có trong môi trường theo mô tả của Kandler & Wiss (1986).

Hoạt tính của enzyme ngoại bào được đánh giá dựa vào kích thước đường kính vòng phân giải cơ chất xung quanh giếng thạch, D – d. Trong đó: D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính giếng thạch (6mm) hoặc độ rộng của đường cấy sau khi vi khuẩn phát triển. Các chủng lợi khuẩn có đường kính phân giải lớn nhất được chọn lọc để định danh bằng sinh học phân tử và thử nghiệm khả năng ức chế đối với vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá nước ngọt bao gồm 03 chủng phân lập từ cá rô phi (FC-HB3, FC-HN4, FC-HD7) và 03 chủng trên cá trắm cỏ (FC-TC-HD02, FC-TC-HN03, FC-TC-BN05) đã được phân lập và giám định từ nghiên cứu trước đó (Đoàn Thị Ninh & cs., 2023; Trương Đình Hoài & cs., 2022). Các chủng lợi khuẩn có đường kính phân giải lớn nhất được chọn lọc để định danh bằng sinh học phân tử và thử nghiệm khả năng ức chế đối với vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá nước ngọt.

2.2.3. Phương pháp giải trình tự đoạn gene 16S rRNA định danh vi khuẩn

Các chủng có hoạt lực phân giải cao được lựa chọn để giải trình tự gene 16S rRNA nhằm định danh loài vi khuẩn. Quá trình tách DNA từ vi khuẩn cấy thuần trên đĩa thạch sử dụng bộ kit InstaGene Matrix (Bio-Rad, USA) theo các bước hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm DNA sau khi tách được bảo quản ở nhiệt độ âm sâu (-20°C). Đoạn gen 16S-rRNA được tách ra từ bộ gen vi khuẩn gây bệnh sử dụng cặp mồi đặc hiệu 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') theo mô tả của (Rainey & cs., 1996). Hỗn hợp 20µl đưa khuếch đại DNA bao gồm 1µl mỗi mồi, 10µl Gotaq green master mix (Promega, USA), 5µl DNA của chủng vi khuẩn đang phân tích, 3µl nước không DNA. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR là 95°C trong 3 phút, 30 chu kỳ 94°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút và

chu kỳ cuối là 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR sẽ được cắt từ bản gel sau khi chạy điện di và tinh sạch sử dụng kit FastGene Gel/PCR extraction kit (Nippon Genetic Co., Ltd). Sản phẩm DNA tinh sạch được gửi đi giải trình tự tại First Base (Singapore). Trình tự nucleotide của các đoạn gen được so sánh để đánh giá mức độ tương đồng với các loài trên dữ liệu ngân hàng gen sử dụng phép so sánh the Blast N algorithm, các chủng được xác định loài khi có dữ liệu trình tự gen 16S-rRNA tương đồng > 97% với chủng chuẩn ATCC đã được công bố.

2.2.4. Phương pháp thử khả năng đối kháng của lợi khuẩn đối với vi khuẩn *F. columnare*

Khả năng đối kháng giữa các chủng vi khuẩn có lợi có hoạt lực phân giải tốt nhất với 06 chủng vi khuẩn *F.columnare*, được đánh giá dựa vào phương pháp khuếch tán trên thạch (Bonev & cs., 2008). Các vi khuẩn *F. columnare* đã được định danh và giám định bằng kỹ thuật PCR từ các công bố trước đó được sử dụng để nghiên cứu bao gồm 03 chủng phân lập từ cá trắm cỏ (Trương Đình Hoài & cs., 2022) và 03 chủng phân lập từ cá rô phi (Đoàn Thị Ninh & cs., 2023).

Các chủng vi khuẩn *F.columnare* được nuôi cấy phục hồi và tăng sinh trên môi trường Tryptone yeast extract salt (TYES, Tryptone 4g; Yeast Extract 0,4g; CaCl₂ 2H₂O 0,5g; MgSO₄ 7H₂O 0,5g) ở nhiệt độ 28°C trong 48h. Sinh khối các chủng vi khuẩn được thu, rửa và làm đồng nhất trong Phosphate-buffered saline (PBS). Mật độ vi khuẩn được điều chỉnh về khoảng $\sim 1 \times 10^8$ CFU/ml bằng phương pháp so màu theo thang McFarland (mức 0,5) và cấy đều lên TYES agar (TYES + 1,5% agar). Đặt các tấm kháng sinh trắng (không chứa kháng sinh) lên bề mặt đĩa thạch sau cấy vi khuẩn.

Các chủng lợi khuẩn được tăng sinh trên môi trường tương ứng ở 28°C trong 48h. Sau đó, enzyme thô thu được bằng cách ly tâm dịch tăng sinh tốc độ 10.000 vòng/phút, ở 4°C trong 10 phút và thu dịch nổi. Hút 50µl dung dịch sau ly tâm nhỏ lên tấm giấy kháng sinh trắng trên đĩa thạch đã chuẩn bị và ủ ở nhiệt độ 28°C. Đối chứng âm là giấy kháng sinh nhỏ PBS và đối chứng dương là tấm kháng sinh chứa

Oxytetracycline (OT30) có hàm lượng 30µg (Oxoid, Anh). Thử nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau 36h tiến hành đo kích cỡ vòng vô khuẩn để đánh giá khả năng kháng khuẩn.

2.2.5. Xử lý số liệu

Số liệu đường kính vòng phân giải cơ chất và đường kính vòng vô khuẩn của các chủng vi khuẩn được tổng hợp, phân tích. So sánh khác biệt kích cỡ vòng phân giải cơ chất và đường kính vòng kháng khuẩn của các chủng lợi khuẩn được thực hiện bằng phép thử ANOVA, Tukey post-hoc với mức ý nghĩa $P < 0,05$ sử dụng phần mềm SPSS 20.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nuôi cấy, phân lập và xác định hình thái vi khuẩn probiotics từ mẫu bùn

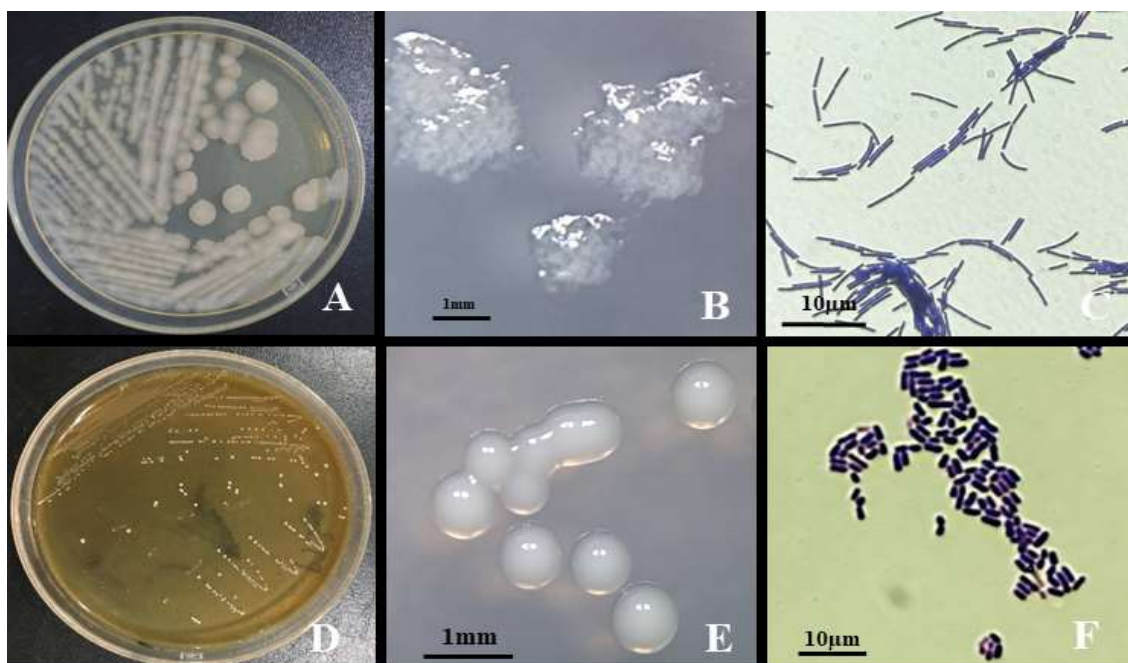
Từ 15 mẫu bùn thu ở 05 ao nuôi cá, 05 ao nuôi tôm và 05 hồ tự nhiên, đã phân lập được 34 chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường LB agar và 29 chủng phát triển trên môi trường MRS agar sau 48h nuôi cấy ở 28°C trong điều kiện hiếu khí. Kết quả thử đặc tính hình thái và sinh hoá cho thấy 11/34 chủng phát triển trên môi trường LB agar có khuẩn lạc hình tròn hoặc rìa răng cưa; phẳng hoặc dấp nổi; màu trắng đục hoặc vàng kem trên LB agar (Hình 1A, B), bắt màu Gram dương, hình que, kích thước dao động từ $0,5-0,9 \times 3,2-7,6\mu\text{m}$ (Hình 1C). Các chủng đều có khả năng di động và hình thành nội bào tử; vị trí bào tử nằm giữa hoặc lệch tâm tế bào. Sau khi đối chiếu với khoá phân loại, định danh vi khuẩn theo hình thái, sinh hoá của Logan & Rodríguez-Díaz (2006) 11 chủng được định danh là *Bacillus* sp. (Ba01 - Ba11; Bảng 1, Hình 1). Trong khi đó, 8 chủng phân lập trên môi trường MRS khuẩn lạc hình tròn, màu trắng hoặc màu kem, bề mặt bóng, tâm nhô, viền nguyên (Hình 1D, E), vi khuẩn hình que, kích thước dao động từ $0,6-1,2 \times 1,5-3,3\mu\text{m}$, bắt màu Gram dương (Hình 1.F), dương tính với phản ứng Catalase, có khả năng phân giải CaCO₃ và hình thành Indole, đối chiếu với khoá phân loại của Adhikari & Kwon (2017) cho kết quả 8/29 chủng phát triển trên môi trường MRS là *Lactobacillus* sp. (L01 đến L08; Bảng 1, Hình 1).

Đánh giá khả năng xử lý môi trường và kháng khuẩn *Flavobacterium columnare* của một số chủng probiotics phân lập từ ao nuôi thủy sản

Bảng 1. Thông tin các chủng *Bacillus* sp. và *Lactobacillus* sp. phân lập trong nghiên cứu

Môi trường phân lập	Phân loại sơ bộ	Ký hiệu chủng	Nguồn gốc phân lập
LB	<i>Bacillus</i> sp.	B01	AC02
LB	<i>Bacillus</i> sp.	Ba02	AC03
LB	<i>Bacillus</i> sp.	Ba03	AC04
LB	<i>Bacillus</i> sp.	Ba04	AT01
LB	<i>Bacillus</i> sp.	Ba05	AT02
LB	<i>Bacillus</i> sp.	Ba06	AT03
LB	<i>Bacillus</i> sp.	Ba07	AT05
LB	<i>Bacillus</i> sp.	Ba08	HTN1
LB	<i>Bacillus</i> sp.	Ba09	HTN2
MRS	<i>Lactobacillus</i> sp.	L01	AC01
MRS	<i>Lactobacillus</i> sp.	L02	AC03
MRS	<i>Lactobacillus</i> sp.	L03	AT02
MRS	<i>Lactobacillus</i> sp.	L04	AT03
MRS	<i>Lactobacillus</i> sp.	L05	AT05
MRS	<i>Lactobacillus</i> sp.	L06	HTN01
MRS	<i>Lactobacillus</i> sp.	L07	HTN02
MRS	<i>Lactobacillus</i> sp.	L08	HTN04

Ghi chú: AC: Ao nuôi cá; AT: Ao nuôi tôm; HTN: Hồ tự nhiên.



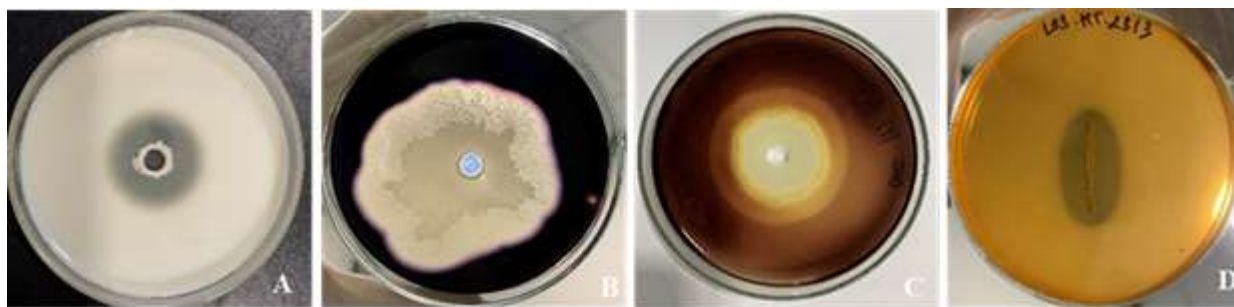
Ghi chú: A, B: Hình thái khuẩn lạc *Bacillus* sp. phát trên môi trường LB; C: Hình thái *Bacillus* sp. nhuộm Gram; D, E: Hình thái khuẩn lạc *Lactobacillus* sp. phát triển trên môi trường MRS; F: Hình thái vi khuẩn *Lactobacillus* sp. nhuộm Gram.

Hình 1. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn thuần phân lập được trong nghiên cứu

Bảng 2. Đường kính vòng phân giải các loại cơ chất của các chủng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu

Chủng lợi khuẩn	Đường kính vòng phân giải (mm)				
	<i>Bacillus</i> sp.			<i>Lactobacillus</i> sp.	
	Protein	Tinh bột	Cellulose	Kí hiệu chủng	CaCO ₃
Ba01	1 ^f ± 0,9	0 ^g ± 0,0	0 ^f ± 0,0	L01	6 ^d ± 0,0
Ba02	23^a ± 1,0	17^b ± 1,7	10^c ± 1,0	L02	0 ^f ± 0,0
Ba03	19^b ± 1,3	18^b ± 0,9	21^a ± 1,3	L03	16^a ± 1,0
Ba04	1,5 ^f ± 0,7	0 ^g ± 0,0	6 ^d ± 0,5	L04	14 ^b ± 0,5
Ba05	20 ^b ± 1,6	3 ^f ± 1,0	11 ^c ± 1,7	L05	12 ^c ± 1,7
Ba06	5 ^e ± 0,5	6 ^e ± 0,5	7 ^d ± 1,5	L06	11 ^c ± 1,0
Ba07	16 ^c ± 1,0	13 ^c ± 1,0	10 ^c ± 1,0	L07	2 ^e ± 0,5
Ba08	11 ^d ± 1,8	8 ^d ± 1,3	3 ^e ± 0,0	L08	0 ^f ± 0,0
Ba09	21^a ± 1,7	30^a ± 0,9	17^b ± 0,9^b	-	-
Ba10	8,5 ^e ± 0,7	1,5 ^f ± 0,7	0 ^f ± 0,0 ^f	-	-
Ba11	18 ^b ± 0,5	15 ^c ± 1,5	6 ^d ± 0,5	-	-

Ghi chú: Chủng in đậm là các chủng được chọn lọc để đưa vào định danh bằng sinh học phân tử; Trong cùng một cột, các giá trị mang các chữ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.



Ghi chú: A: Phân giải protein; B: Phân giải tinh bột; C: Phân giải cellulose D: Phân giải CaCO₃.

Hình 2. Thử khả năng phân giải cơ chất của vi khuẩn *Bacillus* sp. (A-C) và vi khuẩn *Lactobacillus* sp. (D)

3.2. Kết quả sàng lọc chủng probiotics có khả năng phân giải hữu cơ cao

Kết quả đánh giá khả năng phân giải của 11 chủng *Bacillus* sp. và 08 chủng *Lactobacillus* sp. với các cơ chất là protein, tinh bột, cellulose và CaCO₃ được thể hiện ở bảng 2.

Trong nghiên cứu, có 8/11 chủng *Bacillus* sp. có khả năng phân giải cả 3 loại cơ chất, cho thấy chúng đều có khả năng sản sinh enzyme ngoại bào proteases, amylase và cellulase. Trong đó, 3 chủng được lựa chọn có vòng phân giải protein

đạt từ 19-23mm, lớn hơn so với vòng phân giải của các chủng *Bacillus* khác được nhóm nghiên cứu Lê Thị Ngọc Hân & cs. (2021) báo cáo, nhưng thấp hơn so với dòng *B. subtilis* C10 của Thu & cs. (2020). Enzyme proteases giúp thủy phân, cắt đoạn protein thành các đoạn, mảnh nhỏ và cuối cùng thành các axit amin để tế bào vi sinh vật có thể hấp thụ được. Đối với khả năng sản sinh enzyme amylase, enzyme này giúp *B. subtilis* thủy phân tinh bột để tạo thành năng lượng và nguồn carbon cho quá trình nhân lên của chúng. Có 9/11 chủng có khả năng sản sinh vòng phân

giải, trong đó 3 chủng được lựa chọn có vòng phân giải cao là Ba02 (17mm), Ba03 (18mm), tương đương với khả năng thủy phân của các chủng trong báo cáo của Ngô Thị Tường Châu & cs. (2016) và chủng Ba09 có hoạt lực nổi trội, tạo vòng phân giải 30mm, cao hơn vượt trội so với chủng được báo cáo trước đó (Ngô Thị Tường Châu & cs., 2016; Đặng Quang Hải & Trần Thị Thanh Thủy, 2022) và tương đương với chủng C10 trong nghiên cứu của Thu & cs. (2019) ghi nhận được. Enzyme cellulase giúp vi sinh vật phân cắt polysaccharides thành các đoạn saccharides mạch ngắn. Kết quả nghiên cứu cũng ghi nhận, 9/11 chủng có khả năng tạo vòng phân giải đối với test thử cellulose, cho thấy chúng có khả năng sản sinh enzyme cellulase, trong đó 3 chủng có vòng phân giải 10mm (Ba02), 21mm (Ba03) và 17mm (Ba09), tương đương với khả năng phân giải của một số chủng được nghiên cứu trước đó (Ngô Thị Tường Châu & cs., 2016; Đặng Quang Hải & Trần Thị Thanh Thủy, 2022), nhưng thấp hơn so với báo cáo của Artha & cs. (2019). Như vậy, các chủng này đều có tiềm năng xử lý chất thải hữu cơ trong môi trường nuôi thủy sản. Đối với vi khuẩn *Lactobacillus*, khả năng phân giải CaCO_3 thể hiện khả năng thủy phân đường để sản sinh axit lactic. Kết quả đánh giá cho thấy 6/8 chủng thể hiện khả năng phân giải CaCO_3 , trong đó có 4 chủng tạo vòng phân giải trên 10mm, đặc biệt chủng La03 tạo vòng đạt 16mm, cao hơn vượt trội so với báo cáo của Nguyễn Vũ Phong & cs. (2020). Đây là một trong những đặc tính quan trọng của vi khuẩn *Lactobacillus* bởi axit lactic sản sinh ra có thể ngăn chặn sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh (Jones & cs., 2008). Bốn chủng Ba02, Ba03, Ba09 và L03 có khả năng phân giải tốt với các cơ chất được lựa chọn để giám định loài và đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *F. columnare*.

3.3. Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA

Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA của 04 chủng Ba02, Ba03, Ba09 và L03 thu được các trình tự gene có độ dài từ 1401-1478bp. Sử dụng phép BLAST trình tự gene thu được trên Genbank cho kết quả 2 chủng Ba02 và Ba03 có

mức độ tương đồng gene với chủng chuẩn *Bacillus subtilis* ATCC6051 lần lượt là 99,86 và 99,67%, chủng Ba09 có mức độ tương đồng gen với chủng chuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC23350 đạt 99,65%, trong khi chủng L03 có mức độ tương đồng gen với chủng chuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 202195 đạt 99,86% (Bảng 3). Như vậy, kết hợp với kết quả định danh bằng hình thái, sinh hoá và dựa theo quy định về định danh vi khuẩn dựa trên mức độ tương đồng gen 16S rRNA (Stackebrandt, 2006) đã khẳng định được 2 chủng Ba02 và Ba03 là *B. subtilis*, chủng Ba09 là *B. amyloliquefaciens* và chủng La03 là *L. plantarum*.

3.4. Kết quả xác định khả năng đối kháng đối với vi khuẩn *F. columnare*

Kết quả thử khả năng đối kháng của các chủng lợi khuẩn đối với 06 chủng vi khuẩn *F. columnare* cho thấy, các chủng lợi khuẩn đều có khả năng tạo vòng vô khuẩn với các mức độ khác nhau. Hai chủng *B. subtilis* Ba02 và Ba03 tạo ra vòng vô khuẩn trung bình tương ứng đạt 11,5 và 10,7mm đối với chủng *F. columnare* gây bệnh trên cá rô phi, trong khi đạt mức 9,9mm và 10,5mm đối với chủng gây bệnh trên cá trắm cỏ (Bảng 3). Dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có khả năng ức chế tốt hơn, tạo ra vòng kháng khuẩn có kích cỡ lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với 2 chủng *B. subtilis*, đạt tương ứng 14,9mm và 13,1mm đối với các chủng phân lập từ cá rô phi và cá trắm cỏ. Trong khi đó, dịch chiết từ dịch nuôi cấy vi khuẩn *L. plantarum* tạo ra vòng vô khuẩn lớn nhất, đạt trung bình 28,4mm đối với chủng gây bệnh trên cá rô phi và 24,8mm đối với các chủng phân lập từ cá trắm cỏ, tương đương với vòng vô khuẩn mà kháng sinh OTC tạo ra.

Trong nuôi trồng thủy sản, các loài vi khuẩn có lợi thuộc nhóm *Bacillus*, *Lactobacillus* đã được ứng dụng phổ biến với nhiều mục đích như cải thiện hiệu quả tiêu hoá và kích thích sinh trưởng, ức chế tác nhân gây bệnh, cải thiện chất lượng môi trường nước nuôi. Để ức chế tác nhân gây bệnh, các loài lợi khuẩn có khả năng sản sinh ra các chất có tác dụng diệt khuẩn hoặc kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh.

Bảng 3. Mức độ tương đồng của các chủng nghiên cứu và chủng chuẩn ATCC

Chủng	Chủng chuẩn so sánh	Số base	Mức độ tương đồng gene (%)	Loài xác định
Ba02	<i>B. subtilis</i> ATCC6051	1461	99.86	<i>B. subtilis</i>
Ba03	<i>B. subtilis</i> ATCC6051	1401	99.67	<i>B. subtilis</i>
Ba09	<i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC23350	1431	99.65	<i>B. amyloliquefaciens</i>
L03	<i>L. plantarum</i> ATCC 202195	1478	99.86	<i>L. plantarum</i>

Bảng 4. Kết quả thử khả năng đối kháng của các chủng vi sinh có lợi đối với vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá nước ngọt

Chủng	Kết quả định danh	Kích cỡ vòng vô khuẩn (TB $\pm$ SD; mm)	
		FC-RP (n = 3)	FC-TC (n = 3)
Ba02	<i>B. subtilis</i>	11,5 ^a $\pm$ 1,34	9,9 ^a $\pm$ 1,32
Ba03	<i>B. subtilis</i>	10,7 ^a $\pm$ 1,47	10,5 ^a $\pm$ 1,42
Ba09	<i>B. amyloliquefaciens</i>	14,9 ^b $\pm$ 1,77	13,1 ^b $\pm$ 1,01
L03	<i>L. plantarum</i>	28,4 ^c $\pm$ 1,83	24,8 ^c $\pm$ 0,65
Kháng sinh OTC	-	29,6 ^c $\pm$ 1,54	25,0 ^c $\pm$ 0,97

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị mang các chữ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê; Dấu * thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị trong cùng 1 hàng với $P < 0,05$.

Trong nghiên cứu, các chủng vi khuẩn probiotics đều thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn *F. columnare* với các mức độ khác nhau. Khả năng tạo vòng vô khuẩn thu được trong nghiên cứu của 2 loài vi khuẩn Bacillus đối với vi khuẩn *F. columnare* tương đồng kết quả nghiên cứu của Li & cs. (2022). Ngoài *F. columnare*, khả năng đối kháng cao của vi khuẩn Bacillus cũng đã được chứng minh trên nhiều tác nhân gây bệnh trên các đối tượng thủy sản khác như *Pseudomonas aeruginosa*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio parahaemolyticus* và *Staphylococcus aureus* (Das & cs., 2014; Soltani & cs., 2019; Ringø & cs., 2020). Nhìn chung, tác dụng kháng khuẩn dựa trên một hoặc nhiều cơ chế như sản sinh chất kháng khuẩn, chất diệt khuẩn, siderophore, enzyme (lysozymes, proteases), hydrogen peroxide hoặc thay đổi điều kiện pH ruột vật nuôi nhờ sản sinh ra các axit hữu cơ (Verschuere & cs., 2000). Kết quả xác định khả năng ức chế vi khuẩn *F. columnare* trong điều kiện *in vitro* cho thấy tiềm năng ứng dụng các nhóm vi khuẩn probiotics trong phòng và kiểm soát bệnh do vi khuẩn này gây ra. Ngoài ra, theo nghiên cứu

của Trương Đình Hoài & cs. (2022) vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh cá nước ngọt đã có mức kháng tương đối cao đối với một số loại kháng sinh được phép sử dụng trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam. Vì vậy, có thể sử dụng những chủng vi sinh có lợi này như giải pháp để cải thiện môi trường nuôi, đồng thời phòng bệnh chủ động, giúp giảm thiểu hoặc thay thế sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản và bảo vệ môi trường sinh thái.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã phân lập, tuyển chọn và định danh được 04 chủng vi khuẩn có lợi có khả năng phân huỷ tốt chất hữu cơ trong môi trường nước nuôi thông qua đánh giá khả năng phân giải protein, tinh bột, cellulose và CaCO_3 . Các chủng probiotic phân lập được đều có khả năng đối kháng với vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá nước ngọt, trong đó chủng *B. amyloliquefaciens* Ba09 và *L. plantarum* L03 cho hiệu quả kháng khuẩn cao nhất. Kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu sử dụng chủng vi khuẩn có lợi để sản xuất chế phẩm vi sinh

vừa có khả năng xử lý môi trường nuôi và vừa phòng, kiểm soát bệnh do vi khuẩn *F. columnare* gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adel M., El-Sayed A.-F.M., Yeganeh S., Dadar M. & Giri S.S. (2017). Effect of potential probiotic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzyme activities, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 9: 150-156.
- Artha O., Pramono H. & Sar L. (2019). Identification of extracellular enzyme-producing bacteria (proteolytic, cellulolytic, and amylolytic) in the sediment of extensive ponds in Tanggulrejo, Gresik. *Earth and Environmental Science*. 236(1): 012003.
- Bonev B., Hooper J. & Parisot J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(6): 1295-1301.
- Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường (2000). TCVN 6663-13: 2000. (ISO 5667-13 : 1997) về chất lượng nước - lấy mẫu - phần 13 - hướng dẫn lấy mẫu bùn nước, bùn nước thải và bùn liên quan
- da Cruz Ramos G.F., Ramos P.L., Passarini M.R.Z., Vieira Silveira M.A., Okamoto D.N., de Oliveira L.C.G., Zizzo L.V., Marem A., Santos Rocha R.C., da Cruz J.B., Juliano L. & de Vasconcellos S.P. (2016) Cellulolytic and proteolytic ability of bacteria isolated from gastrointestinal tract and composting of a hippopotamus. *AMB Express*. 6(1): 17.
- Đặng Quang Hải & Trần Thị Thanh Thủy (2022). Phân lập, tuyển chọn và định danh một số chủng vi sinh vật có lợi và bước đầu ứng dụng trong xử lý chất thải rắn hữu cơ làm phân bón hữu cơ sinh học. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng*. 20(5): 56-61.
- Das B., Neha Nidhi R., Roy P., Muduli A., Swain P., Mishra S. & Jayasankar P. (2014). Antagonistic activity of cellular components of *Bacillus subtilis* AN11 against bacterial pathogens. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 3(5): 795-809.
- Đoàn Thị Ninh, Trần Thị Trinh Đặng Thị Hóa, Nguyễn Ngọc Tuấn, Nguyễn Thị Hương Giang, Kim Văn Vạn, Đặng Thị Lua & Trương Đình Hoài. (2023). Nghiên cứu phân lập và một số đặc điểm bệnh học của *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá rô phi (*Oreochromis spp.*) tại miền Bắc, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. 65(2).
- Hoai T.D., Ninh D.T., Giang N.T.H., Van Van K. & Dong H.T. (2025). First report on *Flavobacterium columnare* causing disease outbreaks in cultured black carp, *Mylopharyngodon piceus*, in Northern Vietnam. *Microbial Pathogenesis*. 202: 107413.
- Jones R.J., Hussein H.M., Zagorec M., Brightwell G. & Tagg J.R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*. 25(2): 228-234.
- Kandler O. & Weiss (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: *Bergeys Manual of system Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharp, and J.G. Holt (Eds): 2, Baltimore: Williams and Wilkins. pp. 1209-1234.
- Lê Thị Ngọc Hân, Võ Thị Ngọc Diệp, Trịnh Thị Tuyết Hoa & Nguyễn Văn Thành (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 kỹ thuật và CÔNG nghệ*. 63(8): 49-54.
- Li X., Huang Z., Liu H., Wang X., Chen J., Dai L., Dong S., Xiao Y., Yang L. & Liu W. (2022). Screening of antagonistic bacteria against *Flavobacterium columnus* and its effects on growth performance and immune function of *Carassius auratus*. *Reproduction and Breeding*. 2(4): 138-148.
- Logan N.A. & Rodríguez-Díaz M. (2006). *Bacillus* spp. and related genera. Principles and practice of clinical bacteriology. pp. 139-158.
- Messi P., Bondi M., Sabia C., Battini R. & Manicardi G. (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology*. 64(1-2): 193-198.
- Ngô Thị Tường Châu, Phạm Thị Ngọc Lan, Phan Thị Thảo Ly, Lê Văn Thiện & Nguyễn Ngân Hà (2016). Phân lập, tuyển chọn và sử dụng vi sinh vật ưa nhiệt trong phân hủy sinh khối bùn thải nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội: Các Khoa học Trái đất và Môi trường*. 32(1S).
- Nguyễn Vũ Phong, Biện Thị Lan Thanh, Lê Văn Vương, Phạm Thiên Hải, Đặng Thị Ngọc Mai & Nguyễn Thị Thảo Nguyên (2020). Phân lập và xác định vi khuẩn lactic từ đất trồng rau tại Đà Lạt, Lâm Đồng. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*. 19(4): 1-9.
- Rengpipat S., Tunyanun A., Fast A.W., Piyatiratitivorakul S. & Menasveta P. (2003). Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Diseases of aquatic organisms*. 55(2): 169-173.

- Ringø E., Van Doan H., Lee S.H., Soltani M., Hoseinifar S.H., Harikrishnan R. & Song S.K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal Of Applied Microbiology*. 129(1): 116-136.
- Soltani M., Ghosh K., Hoseinifar S.H., Kumar V., Lymbery A.J., Roy S. & Ringø E. (2019). Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 27(3): 331-379.
- Stackebrandt E. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbial Today*. 33: 152.
- Thu N.T., Khue N.T., Huy N.D., Tien N.Q. & Loc N.H. (2020). Characterizations and fibrinolytic activity of serine protease from *Bacillus subtilis* C10. *Current pharmaceutical biotechnology*. 21(2): 110-116.
- Trương Đình Hoài, Đoàn Thị Ninh, Trần Thị Trinh, Đặng Thị Hóa, Nguyễn Ngọc Tuấn & Kim Văn Vạn (2022). Phân lập và đánh giá độ nhạy với kháng sinh của vi khuẩn *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá Trắm cỏ nuôi tại miền Bắc. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 20(6): 732-740.
- Từ Thanh Dung, Freddy Haesebrouck, Partrick Sorgeloos, Margo Baele, Annemie Decostere & Nguyễn Anh Tuấn (2012). Nghiên cứu tác nhân gây bệnh trắng đuôi trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và giải pháp điều trị. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. (22c): 136-145.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. & Verstraete W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64(4): 655-671.
- Yi Y., Zhang Z., Zhao F., Liu H., Yu L., Zha J., & Wang G. (2018). Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. *Fish & shellfish immunology*. 78: 322-330.
- Zhang W., Tong Q., You J., Lv X., Liu Z. & Ni L. (2021). The application of *Bacillus subtilis* for adhesion inhibition of *Pseudomonas* and preservation of fresh fish. *Foods*. 10(12): 3093.