

PHÂN LẬP VÀ CHỌN LỌC CÁC DÒNG *Bacillus* spp. BẢN ĐỊA CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CHẤT HỮU CƠ TỪ AO NUÔI *ARTEMIA*

Lê Trung Tâm^{1,2*}, Vũ Hùng Hải¹, Nguyễn Văn Hòa¹, Huỳnh Trường Giang¹

¹Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ

²Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Cần Thơ

*Tác giả liên hệ: letrungtam1986@gmail.com

Ngày nhận bài: 25.08.2025

Ngày chấp nhận đăng: 23.10.2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và sàng lọc các chủng lợi khuẩn *Bacillus* spp. từ nước và bùn đáy ao nuôi *Artemia*. Phương pháp nghiên cứu bao gồm thu mẫu, phân lập, nhận dạng, sàng lọc sơ bộ và đánh giá các dòng *Bacillus* có khả năng sinh enzyme ngoại bào, định danh chủng vi khuẩn và đánh giá độ an toàn trên *Artemia*. Kết quả đã phân lập được 78 chủng vi khuẩn với các đặc điểm nhận dạng tương đồng với giống *Bacillus* theo hệ thống phân loại Bergey (2015) như tế bào hình que, gram âm hoặc dương, phản ứng dương tính với catalase và oxidase, tính di động và hình thành bào tử. Hầu hết các chủng phân lập đều có khả năng sinh enzyme ngoại bào (protease, amylase và cellulase) phân giải các cơ chất casein, tinh bột và CMC; chỉ 4 chủng có khả năng sinh hai loại enzyme vượt trội. Trong đó, chủng BC24.4 cho thấy hoạt tính protease và α -amylase cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) so với các chủng còn lại. Kết quả giải trình tự 16S rRNA cho thấy chủng BC24.4 đạt mức tương đồng 99,3% với loài *Bacillus subtilis* và an toàn trên *Artemia*. Vì vậy, chủng BC24.4 có tiềm năng nghiên cứu để phát triển probiotic giúp thúc đẩy quá trình phân hủy vật chất hữu cơ để cải tạo môi trường ao nuôi, đặc biệt là ao nuôi *Artemia*.

Từ khóa: *Bacillus*, phân lập, enzyme ngoại bào, ao nuôi *Artemia*.

Isolation and Selection of Indigenous *Bacillus* spp. Capable of Biodegradation of Organic Compounds from *Artemia* Ponds

ABSTRACT

This study was conducted to isolate and screen *Bacillus* spp. as probiotic strains from water and sediment of *Artemia* culture systems. The research method includes sample collection, isolation, identification, preliminary screening and evaluation of *Bacillus* strains capable of producing extracellular enzymes, bacterial strain identification and safety assessment on *Artemia*. A total of 78 strains were isolated and characterized by morphological and physiological features similar to *Bacillus* genus by the conventional taxonomic method according to Bergey's Manual (2015), which are rod-shaped cells, Gram-positive or negative, positive reactions to catalase and oxidase, motility and sporulation. Most isolates secreted extracellular enzymes (protease, amylase, and cellulase) capable of degrading casein, starch, and CMC, but 4 strains exhibited strong secretion of two types of extracellular enzymes by the spot-inoculated method. Notably, strain BC24.4 showed significantly higher protease and α -amylase activities ($P < 0.05$) compared to the others. The result of the 16S rRNA gene sequencing showed that BC24.4 shared 99.3% similarity with *Bacillus subtilis* and safe on *Artemia*. Hence, strain BC24.4 is considered as potential for developing probiotic for enhancing degradation of organic matter in aquaculture systems, especially in *Artemia* culture ponds.

Keywords: *Bacillus*, isolation, extracellular enzymes, *Artemia* culture ponds.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Artemia được coi là nguồn thức ăn tươi sống không thể thiếu trong quy trình sản xuất giống các đối tượng thủy sản có giá trị kinh tế như các

loài giáp xác (tôm sú, tôm thẻ, tôm hùm) và các loài cá biển (Sorgeloos & cs., 1998; 2001). So với các loài động vật phù du khác như luân trùng (Rotifera), trứng nước (Cladocera) hay giáp xác chân chèo (Copepoda) thì *Artemia* được thương

mại hóa rộng rãi hơn nhờ giá trị dinh dưỡng cao và khả năng hình thành bào xác (trứng nghì). Đặc điểm này mang lại ưu thế trong quá trình bảo quản và sử dụng (Stappen & cs., 2024). Trong sản xuất trứng bào xác *Artemia* tại Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), hoạt động bón phân hữu cơ (như phân gà, cám gạo) hoặc vô cơ (Urea, DAP và NPK) kích thích sự phát triển của tảo và duy trì mật độ tảo ổn định (tạo màu “nước xanh”), qua đó cải thiện chất lượng môi trường ao nuôi và cung cấp nguồn thức ăn tự nhiên dồi dào cho *Artemia* (Nguyễn Thị Ngọc Anh & cs., 2014; Le & cs., 2018). Tuy nhiên, do đặc tính môi trường độ mặn cao (80-100‰), làm các thành phần dinh dưỡng hòa tan dạng nitơ (N) và lân (P) sẽ dễ bị kết tủa hoặc hấp thu vào trong đất đáy ao, gây khó khăn cho quá trình gây màu nước (Boyd, 2020). Vì vậy, việc bổ sung nhóm vi sinh vật có lợi nhằm thúc đẩy quá trình khoáng hóa trong nước và bùn đáy ao là cần thiết, qua đó góp phần phóng thích dinh dưỡng từ bùn trở lại môi trường nước.

Bacillus là nhóm vi khuẩn được ứng dụng phổ biến trong cải thiện chất lượng nước và đất ao nuôi thủy sản. Nhóm vi khuẩn này có đặc điểm phân bố rộng rãi trong đất, khả năng chịu nhiệt cao, phát triển nhanh trong môi trường nuôi cấy lỏng và dễ dàng hình thành bào tử bền vững chịu nhiệt. Bên cạnh đó, *Bacillus* tiết ra các hợp chất kháng khuẩn (bacteriocin, peptide kháng khuẩn) giúp tăng khả năng cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh, sản xuất nhiều loại enzyme ngoại bào (amylase, protease, cellulase,...), góp phần thúc đẩy quá trình phân hủy vật chất hữu cơ và khoáng hóa trong ao nuôi (Kamilya & Devi, 2022; Soltani & cs., 2019). Phần lớn các nghiên cứu phân lập và đánh giá hoạt tính các dòng lợi khuẩn *Bacillus* thường tập trung chủ yếu trên các loài thủy sản nước ngọt và lợ mặn có giá trị kinh tế như cá tra, cá rô phi và tôm thẻ chân trắng (Jame & cs., 2021). Do đó, nghiên cứu về phân lập các dòng *Bacillus* spp. bản địa từ ao nuôi *Artemia* có khả năng chịu mặn và phân hủy vật chất hữu cơ mạnh là cần thiết và cung cấp hướng phát triển probiotic tiềm năng trong cải thiện môi trường nuôi *Artemia* tại khu vực ĐBSCL.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm thu mẫu

Mười chín ao nuôi *Artemia* ở khu vực Vĩnh Châu, Sóc Trăng được chọn để tiến hành thu mẫu nước và bùn đáy. Theo đó, mẫu nước và mẫu bùn sẽ được thu tại 3 vị trí khác nhau (đầu, giữa, cuối) trong một ao nuôi. Mẫu nước được thu bằng ống falcon khử trùng với dung tích 50ml. Trong khi mẫu bùn đáy ao (khoảng 100g) được thu bằng bộ dụng cụ ống PVC theo mô tả bởi Somsiri & cs. (2006). Tất cả các mẫu sẽ ký hiệu thông tin ao nuôi và bảo quản ở 4°C, sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập.

2.2. Phân lập và đặc điểm nhận dạng

Mẫu sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm được tiến hành đồng nhất và pha loãng với nước muối tiệt trùng (3% NaCl) để đạt các nồng độ pha loãng khác nhau (10^{-1} - 10^{-4}) và tiến hành phân lập theo các bước được mô tả bởi Phạm Thị Tuyết Ngân & cs. (2021) với một vài thay đổi. Cụ thể là các mẫu pha loãng được xử lý nhiệt ở 80°C trong bể điều nhiệt khoảng 20 phút nhằm loại bỏ tế bào sinh dưỡng (Song & cs., 2011), kế tiếp trải đều 100µl mẫu trên môi trường thạch Tryptone Soya Agar (TSA, Himedia, Ấn Độ) bổ sung 3% NaCl và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc đơn với các đặc điểm hình thái, màu sắc khác nhau được chọn và cấy rìa nhiều lần trên đĩa thạch TSA đến khi đạt được khuẩn lạc đơn đồng nhất. Sau đó, các chủng phân lập được nuôi tăng sinh trong môi trường Tryptone Soya Broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) ở 30°C và được bảo quản âm sâu ở -80°C với 20% glycerol cho các thí nghiệm đánh giá sau. Các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và sinh hóa của các chủng phân lập được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan and Steel (Barrow & Feltham, 1993) và so sánh với các đặc điểm nhận dạng thuộc giống *Bacillus* theo hệ thống phân loại Bergey (Logan & Vos, 2015).

2.3. Sàng lọc sơ bộ các dòng *Bacillus* có khả năng sinh enzyme ngoại bào

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus* được đánh giá bằng phương pháp cấy chấm điểm trên môi trường Luria

Bertani (LB, gồm peptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l và NaCl 10 g/l) bổ sung 1,5% agar có bổ sung từng loại cơ chất 1% casein, 1% starch và 0,5% Na-CMC tương ứng để khảo sát khả năng sinh enzyme protease, amylase và cellulase. Sau đó, tiến hành ủ đĩa ở 37°C trong 48 giờ và quan sát vòng thủy phân xung quanh khuẩn lạc (Đỗ Thị Thanh Dung & cs., 2017). Nhằm thể hiện vòng phân giải trên đĩa thạch, dung dịch Lugol và dung dịch TCA 25% được sử dụng để nhuộm môi trường bổ sung cơ chất Starch và Casein. Đối với vòng phân giải CMC, nhuộm đĩa môi trường với dung dịch Congo Red 0,1% trong 15 phút và rửa lại bằng 1M NaCl. Những dòng có khả năng sinh enzyme ngoại bào sẽ xuất hiện vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc. Khả năng phân giải được xếp loại dựa vào đường kính vòng phân giải như: (-, yếu) < 10mm; (++, trung bình) 10-19mm và (+++, mạnh) ≥ 20mm (Samson & cs., 2020). Kết quả sàng lọc được đánh giá 3 lần lặp lại ở cùng điều kiện thí nghiệm.

2.4. Đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng phân lập

Các chủng sau khi sàng lọc sơ bộ có ít nhất hai loại enzyme đạt vòng phân giải > 10mm sẽ được chọn để tiếp tục đánh giá. Cụ thể, các chủng vi khuẩn chọn lọc được nuôi trong môi trường Minimal Broth (MB, gồm Na₂HPO₄ 6 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l) bổ sung lần lượt 1% casein/starch/ Na-CMC (Fernandes & cs., 2019). Sau 48 giờ nuôi cấy trên máy lắc ở 30°C với tốc độ 150 vòng/phút, huyền phù được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C nhằm loại bỏ tế bào vi khuẩn. Phần dịch nổi phía trên được sử dụng để xác định hoạt tính của các enzyme protease, α-amylase và cellulase. Mỗi chủng được đánh giá 3 lần lặp lại ở cùng điều kiện thí nghiệm.

2.4.1. Hoạt tính protease

Hoạt tính protease được xác định theo phương pháp của Huynh & cs. (2018) với một số điều chỉnh như sau: 100μl dịch enzyme được ủ với 100μl dung dịch casein 1% (hòa tan trong đệm Tris-HCl, pH 7,0) trong 10 phút ở 37°C. Sau đó, thêm 500μl dung dịch trichloroacetic acid (TCA) 5% vào hỗn hợp để dừng phản ứng.

Sau 20 phút, tiến hành ly tâm hỗn hợp ở tốc độ 3.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và thu phần dịch nổi để xác định hoạt tính theo phương pháp Lowry (Lowry & cs., 1951). Một đơn vị (U) hoạt tính protease được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng 1μg tyrosine/ml/phút trong điều kiện thí nghiệm chuẩn.

2.4.2. Hoạt tính α-amylase

Hoạt tính α-amylase được xác định bằng phương pháp starch-iodine theo Abd-Elhalem & cs. (2015) với một số điều chỉnh. Cụ thể, 1ml dịch enzyme được ủ với 1ml dung dịch soluble starch 1% (hòa tan trong đệm phosphate 0,1M, pH 7,0) ở 60°C trong 30 phút. Phản ứng được dừng bằng cách thêm 1ml HCl 1M, kế tiếp thêm 1ml dung dịch iodine (5mM I₂ và 5mM KI) để tạo phức màu. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 620 nm bằng máy so màu quang phổ UV-1900i (Shimadzu, Nhật Bản). Một đơn vị (U) hoạt tính α-amylase được định nghĩa là lượng enzyme thủy phân 1mg tinh bột trong một phút dưới điều kiện thí nghiệm chuẩn.

2.4.3. Hoạt tính cellulase

Hoạt tính cellulase được xác định theo phương pháp của Ghose (1987) với một số điều chỉnh. Phản ứng bao gồm 0,5ml dung dịch carboxymethyl cellulose (CMC) 1% (hòa tan trong đệm citrate 0,05M, pH 5) và 0,5ml dịch enzyme, được ủ ở 50°C trong 30 phút. Sau đó, 1,5ml dung dịch thuốc thử dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) được bổ sung và hỗn hợp được đun nóng ở 100°C trong 10 phút. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 540nm bằng máy so màu quang phổ UV-1900i (Shimadzu, Nhật Bản). Một đơn vị (U) hoạt tính cellulase được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng 1 μmol-Glucose/ml/phút trong điều kiện thí nghiệm.

2.5. Định danh chủng vi khuẩn

Chủng tiềm năng thể hiện hoạt tính enzyme vượt trội nhất sẽ được gửi đến Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa để tiến hành ly trích và giải trình tự gen 16S rRNA bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả giải trình tự được so sánh bằng công cụ BLAST search trên ngân hàng gen của NCBI để định danh chính xác loài vi khuẩn. Các đoạn trình tự

tương đồng cao được sử dụng để xây dựng cây phả hệ bằng phần mềm Mega (phiên bản 11) theo phương pháp Neighbor Joining và độ tin cậy của các mối quan hệ phả hệ được tính toán bằng kỹ thuật “bootstrap” với 1.000 lần lặp lại.

2.6. Đánh giá độ an toàn của chủng phân lập trên *Artemia*

Thí nghiệm được bố trí dựa theo Shinde & cs. (2022) với một vài thay đổi như sau: cân khoảng 200 mg trứng *Artemia* và ấp trong 500ml nước mặn 20‰ đã được xử lý tiệt trùng, trong quá trình ấp duy trì sục khí và chiếu sáng liên tục ở nhiệt độ phòng ($29 \pm 1^\circ\text{C}$) cho đến khi ấu trùng *Artemia* đạt giai đoạn Instar I. Sau đó, 20 cá thể ấu trùng sẽ được bố trí vào các ống falcon chứa 35ml nước mặn 20‰ tiệt trùng và đặt trên máy lắc (100 vòng/phút) ở nhiệt độ phòng ($29 \pm 1^\circ\text{C}$). Để đánh giá tính an toàn, bơm 100μl huyền phù tế bào của chủng phân lập ở giá trị $\text{OD}_{600} = 0,5$ vào các ống falcon (tương ứng với mật độ $1,8 \times 10^5$ CFU/ml và 100μl nước muối tiệt trùng được sử dụng vào nhóm đối chứng. Mật độ *Bacillus* ban đầu được kiểm tra lại bằng phương pháp cấy trải trên môi trường TSA (Phạm Thị Tuyết Ngân & cs., 2021). Tỷ lệ sống *Artemia* được xác định trong 5 ngày thí nghiệm và mỗi nhóm nghiệm thức được lặp lại 5 lần. Chủng vi khuẩn phân lập không gây chết *Artemia* trong thời gian thí nghiệm được xem là an toàn.

2.7. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn bằng phần mềm Microsoft Excel và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức theo phương pháp phân tích ANOVA một nhân tố với phép thử Tukey bằng phần mềm thống kê SPSS 21.0 ở mức ý nghĩa ($P < 0,05$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và các đặc điểm nhận dạng

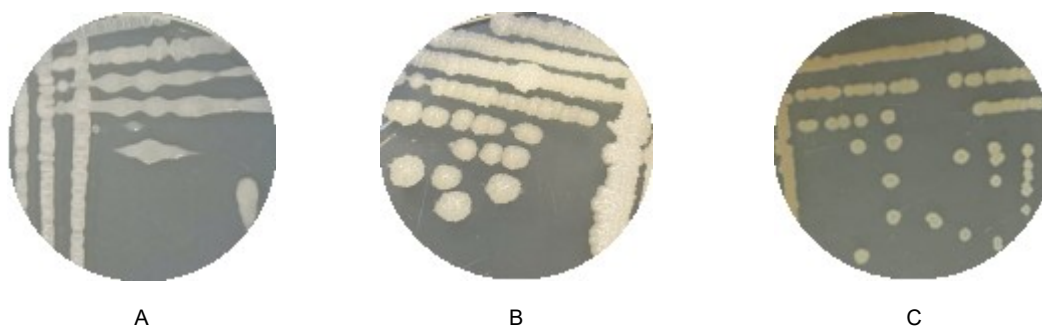
Tổng cộng 78 chủng vi khuẩn phân lập từ 19 mẫu nước và bùn đáy ao nuôi *Artemia* có khả năng chịu nhiệt (80°C) và phát triển tốt trên môi trường TSA (3% NaCl). Theo đó, hình thái khuẩn lạc của các chủng phân lập có dạng hình tròn

(chiếm 73%) hoặc bất định hình (27%), với rìa khuẩn lạc đều (62%) hoặc gợn sóng - răng cưa (38%) và độ nổi ở dạng mô (42%) hoặc lồi (58%). Khuẩn lạc có màu trắng ngà - trắng đục (46%) hoặc vàng nhạt (54%) với kích thước khuẩn lạc dao động từ 2-4mm (Bảng 1 và Hình 1).

Phần lớn tế bào có dạng hình que (chiếm 79,5%), trong khi số tế bào còn lại có dạng hình cầu đơn hoặc cầu dạng chuỗi (20,5%). Hơn nữa, hầu hết các chủng phân lập thuộc nhóm tế bào Gram dương (74,4%) và thể hiện phản ứng dương tính đối với catalase, oxidase, đồng thời có khả năng di động và sinh bào tử (Bảng 1). Đáng chú ý, giống *Bacillus* được biết đến là nhóm vi sinh vật có khả năng hình thành bào tử trong điều kiện bất lợi, giúp nhóm sinh vật này tồn tại được cả trong môi trường hiếu khí và yếm khí. Do đó, *Bacillus* được tìm thấy ở nhiều điều kiện môi trường khác nhau như trong nước, đất, bùn, phân hữu cơ, cũng như trong các môi trường khắc nghiệt có độ mặn, nhiệt độ hoặc pH cao và cả trong hệ tiêu hóa của vật nuôi thủy sản (Soltani & cs., 2019). Trong nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân & cs. (2021) đã phân lập được 88 chủng *Bacillus* spp. từ mẫu bùn đáy ao nuôi tôm quảng canh. Các chủng này thể hiện sự đa dạng về đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường Nutrient Agar, với dạng hình tròn nhỏ hoặc tròn lớn, bờ đều hoặc răng cưa, kích thước dao động từ 0,3-3,1mm và màu sắc thay đổi từ trắng đục đến trắng trong. Về đặc điểm tế bào, phần lớn vi khuẩn có dạng hình que ngắn, thuộc nhóm Gram dương (53%) hoặc Gram âm (47%), có khả năng di động, sinh bào tử và dương tính với phản ứng catalase và oxidase. Nghiên cứu khác của Đỗ Thị Thanh Dung & cs. (2017) đã phân lập và nhận diện được 83 chủng từ mẫu đất, nước và tôm trên môi trường LB, Các chủng này có đặc điểm nhận dạng khuẩn lạc chủ yếu là dạng tròn, bờ răng cưa, màu vàng xám. Trong đó, 54 chủng thể hiện các đặc tính điển hình của *Bacillus*, bao gồm hình thái trực khuẩn, Gram dương, phản ứng dương tính với catalase và oxidase, có khả năng sinh nội bào tử và di động. Nhìn chung, các chủng phân lập trong nghiên cứu hiện tại có sự tương đồng với kết quả nhận dạng từ các nghiên cứu trước và phù hợp với đặc điểm hình thái, sinh hóa của giống *Bacillus* được mô tả trong hệ thống phân loại của Bergey (Logan & Vos, 2015).

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và đặc điểm sinh hóa của các chủng phân lập

Đặc điểm		Số lượng chủng (n = 78)	Tỷ lệ (%)
A. Hình thái khuẩn lạc			
Hình dạng	Tròn	57	73%
	Bất định hình	21	27%
Rìa	Đều	48	62%
	Gợn sóng/răng cưa	30	38%
Độ nổi	Mô	33	42%
	Lài	45	58%
Màu sắc	Trắng ngà - trắng đục	36	46%
	Vàng nhạt	42	54%
Đường kính	2-4mm	78	100%
B. Đặc điểm sinh lý - sinh hóa			
Hình dạng tế bào	Que	62	79,5%
	Cầu	16	20,5%
Gram	Dương (+)	58	74,4%
	Âm (-)	20	25,6%
Catalase	Dương (+)	78	100%
Oxidase	Dương (+)	78	100%
Di động	Dương (+)	78	100%
Bào tử	Dương (+)	78	100%



Ghi chú: (A) Dạng bất định hình, rìa đều, mô nổi, màu trắng đục; (B) Dạng tròn, rìa gợn sóng, mô nổi, màu trắng ngà; (C) Dạng tròn, rìa gợn sóng, mô nổi, màu vàng.

Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc *Bacillus* spp. trên môi trường TSA

3.2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng phân lập

Kết quả vòng phân giải các loại cơ chất của 15 chủng chọn lọc được trình bày ở bảng 2. Hầu hết các chủng phân lập có khả năng tiết ra ít nhất một loại enzyme ngoại bào (protease, α -amylase hoặc cellulase) khi nuôi cấy trên các

môi trường bổ sung riêng biệt từng loại cơ chất Casein, Starch và CMC. Tuy nhiên, chỉ 15/78 chủng thể hiện khả năng sinh ít nhất một loại enzyme ở mức trung bình (11-19mm) và không ghi nhận được bất kỳ chủng nào có mức độ phân giải mạnh (≥ 20 mm) các nguồn cơ chất (Hình 2). Vi khuẩn *Bacillus* spp. đóng vai trò quan trọng trong quá trình làm sạch môi trường ao nuôi

thủy sản, góp phần duy trì ổn định chất lượng nước dựa vào đặc tính sinh enzyme ngoại bào mạnh giúp phân giải nhiều loại cơ chất có nguồn gốc từ thực vật và động vật, bao gồm protein, tinh bột, cellulose và hydrocarbon (Soltani & cs., 2019). Khi đó, quá trình khoáng hóa trong ao nuôi diễn ra nhờ hoạt động của các enzyme ngoại bào như protease, amylase và cellulase, phân giải các đại phân tử thành những phân tử nhỏ hơn và dễ hòa tan (Ramu & cs., 2017). Trong nghiên cứu của Đỗ Thị Thanh Dung & cs. (2017), từ 54 chủng *Bacillus* spp. được khảo sát, có 7 chủng thể hiện khả năng sinh enzyme amylase thông qua đường kính phân giải cơ chất tinh bột từ 6,33-15mm, trong khi 30/54 chủng có khả năng phân giải cellulose với đường kính vòng thủy phân từ 6,5-16,33mm và 23 chủng cho thấy khả năng sinh enzyme protease với vòng thủy phân từ 6,33-13mm. Tương tự, nghiên cứu của Fernandes & cs. (2019) đã chọn lọc được 6 chủng *Bacillus* (SK07, SK27, ABSK55, FSK444, TSK17, TSK71) dựa trên khả năng sinh ít nhất hai loại enzyme ngoại bào (protease, amylase, cellulase và lipase) với đường kính vòng phân giải lớn hơn 10mm bằng phương pháp cấy chấm điểm. Trong khi đó, nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân & cs. (2021) đã đánh giá sơ bộ và chọn lọc được 5/88 chủng (CM3.1, TV3.1, BT1.2, CM2.2 và TV1.2) có khả năng đồng thời tiết ra cả ba enzyme ngoại bào protease, amylase và cellulase. Đáng chú ý, bốn chủng *Bacillus* spp. (BC12.1, BC12.7, BC24.1 và BC24.4) trong nghiên cứu hiện tại thể hiện đồng thời hai hoạt tính enzyme ngoại bào với đường kính vòng phân giải lớn 10mm. Do đó, các chủng này được lựa chọn để tiếp tục đánh giá hoạt tính enzyme trong điều kiện *in vitro*.

3.3. Hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng chọn lọc

Hoạt tính enzyme protease giữa các chủng chọn lọc khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$), trong đó chủng BC24.4 đạt giá trị cao nhất với trung bình $180,3 \pm 13,4$ U/ml, tiếp theo là chủng BC12.7 với hoạt tính trung bình $140,4 \pm 15,2$ U/ml và thấp nhất là hai chủng BC12.1 và BC24.1 tương ứng với hoạt tính trung bình $53,8 \pm 11,1$ U/ml và $72,7 \pm 8,6$ U/ml (Hình 3A).

Đối với enzyme phân giải tinh bột, hoạt tính amylase tiết ra bởi chủng BC24.4 đạt trung bình $70,6 \pm 4,5$ U/ml, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so hoạt tính enzyme của ba chủng BC12.1, BC12.7 và BC24.1 tiết ra với trung bình lần lượt là $51,3 \pm 7,1$; $57 \pm 5,2$ và $39,3 \pm 3,2$ U/ml (Hình 3B). Tuy nhiên, hoạt tính cellulase khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) giữa các chủng phân lập, với mức dao động 11,7-21 U/ml (Hình 3C). Kết quả tương đồng với nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân & cs. (2021) khi đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào của năm chủng *Bacillus* (CM3.1, TV3.1, BT1.2, CM2.2, TV1.2), cho thấy thì hoạt tính α -amylase cao nhất ở chủng CM3.1 và TV3.1 (khoảng 153,7 U/ml) và thấp nhất ở chủng TV1.2 (18,3 UI/ml), hoạt tính protease cao nhất ở chủng CM3.1 (140,9 UI/ml) và thấp nhất là chủng TV1.2 (129,7 UI/ml). Đặc biệt, chủng TV3.1 thể hiện hoạt tính cellulase vượt trội nhất (943,4 UI/ml). Sự khác biệt trên có thể do sự khác biệt về thành phần dinh dưỡng trong môi trường, điều kiện nuôi cấy (pH, nhiệt độ, hàm lượng oxy), cũng như đặc điểm của vi khuẩn (giai đoạn phát triển, tính thấm của màng tế bào và quá trình phân chia tế bào) (Gale, 1943). Việc ứng dụng enzyme có ý nghĩa quan trọng đối với phát triển bền vững trong nuôi trồng thủy sản, không chỉ nâng cao hiệu quả tiêu hóa và hấp thu dinh dưỡng của vật nuôi, mà còn thúc đẩy quá trình phân giải các hợp chất cao phân tử gây ô nhiễm môi trường ao nuôi (Soltani & cs., 2019). Trong đó, protease là nhóm enzyme xúc tác quá trình thủy phân liên kết peptide bên trong phân tử protein (endopeptidase) hoặc chuỗi protein (exopeptidase). Amylase đóng vai trò phân giải tinh bột (starch) - loại polysaccharide chính trong thực vật, trong khi cellulase xúc tác thủy phân các liên kết β -1,4 glycosidic trong cellulose, giải phóng glucose dạng đường đơn (Liang & cs., 2022). Qua đó cho thấy hoạt tính enzyme có sự khác biệt đáng kể giữa các chủng vi khuẩn nên việc chọn lọc dòng vi khuẩn có khả năng tiết đồng thời nhiều loại enzyme, tiêu biểu là chủng BC24.4 được xem là ứng viên tiềm năng để phát triển probiotic ứng dụng trong quản lý và nâng cao chất lượng môi trường nước ao nuôi.

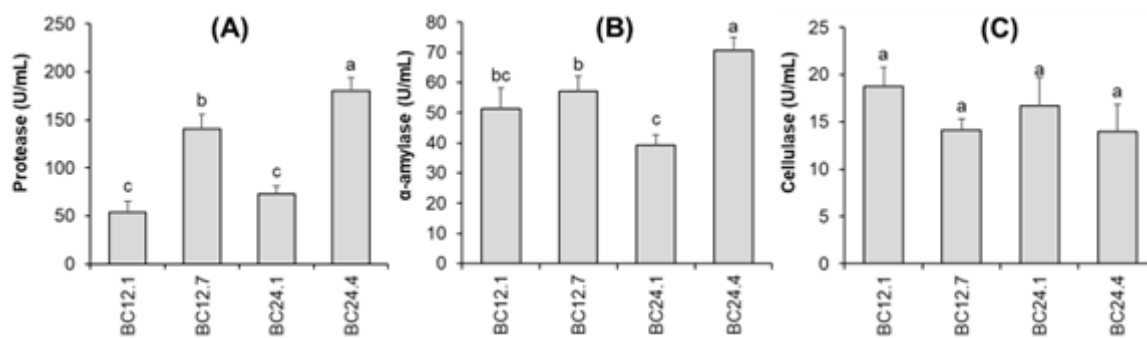
Bảng 2. Vòng phân giải (mm) các loại cơ chất của 15 chủng chọn lọc

Chủng	Protease		Amylase		Cellulase	
	Vòng phân giải (mm, n = 3)	Mức độ	Vòng phân giải (mm, n = 3)	Mức độ	Vòng phân giải (mm, n = 3)	Mức độ
BC3.2	6,8 ± 0,4	-	1,5 ± 0,7	-	12,5 ± 0,7	++
BC3.4	0,5 ± 0,7	-	6,8 ± 0,4	-	11,8 ± 0,4	++
BC4.2	7,8 ± 0,4	-	6,8 ± 0,4	-	14,5 ± 0,7	++
BC5.9	4,8 ± 0,4	-	6,8 ± 0,4	-	16,5 ± 0,7	++
BC6.4	10,5 ± 0,7	++	0,5 ± 0,7	-	0,5 ± 0,7	-
BC8.9	2,8 ± 0,4	-	1,5 ± 0,7	-	15,5 ± 0,7	++
BC12.1	9,5 ± 0,7	-	11,8 ± 1,1	++	11,5 ± 0,7	++
BC12.7	8,8 ± 0,4	-	11,3 ± 1,1	++	14,8 ± 1,1	++
BC14.1	12,5 ± 0,7	++	2,3 ± 0,4	-	0,5 ± 0,7	-
BC18.5	13,5 ± 0,7	++	2,8 ± 0,4	-	4,5 ± 0,7	-
BC18.8	10,8 ± 0,4	++	0,5 ± 0,7	-	1,5 ± 0,7	-
BC2.3	11,5 ± 0,7	++	0,5 ± 0,7	-	1,8 ± 0,4	-
BC22.1	12,5 ± 0,7	++	3,8 ± 0,4	-	5,5 ± 0,7	-
BC24.1	10,5 ± 0,7	++	6,5 ± 0,7	-	10,5 ± 0,7	++
BC24.4	15,5 ± 0,7	++	6,8 ± 1,1	-	14,5 ± 0,7	++

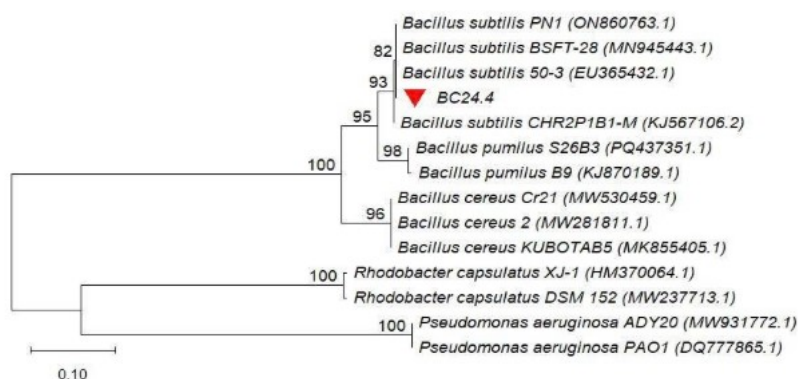
Ghi chú: (-): Yếu; (++) : Trung bình và (+++): Mạnh.



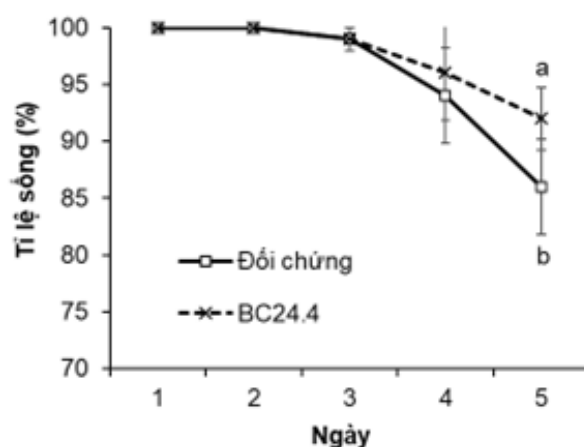
Hình 2. Vòng phân giải Casein (A), Starch (B) và CMC (C) bởi các chủng *Bacillus* spp.



Hình 3. Hoạt tính enzyme protease (A), α-amylase (B) và cellulase (C) của các chủng chọn lọc



Hình 4. Cây phả hệ từ trình tự gen 16S rRNA của chủng phân lập với các loài *Bacillus* khác



Hình 5. Tỷ lệ sống của *Artemia* trong đánh giá tính an toàn của chủng BC24.4

3.4. Định danh loài vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự 16s RNA

Kết quả hình 4 cho thấy các chuỗi trình tự nucleotide của chủng BC24.4 đạt mức tương đồng (99,3%) gần nhất với các mẫu phân lập thuộc loài *Bacillus subtilis* đã được công bố trên Ngân hàng gen NCBI. Hơn nữa, dựa trên kết quả phân tích phả hệ, chủng BC24.4 nằm cùng nhánh với các loài *Bacillus subtilis* đã được công bố trước đó.

3.5. Đánh giá độ an toàn trên *Artemia*

Một trong những tiêu chí để chọn lọc probiotic trong nuôi trồng thủy sản là không gây hại đến môi trường và vật nuôi (Pérez-Sánchez & cs., 2013), do đó đánh giá độ an toàn của chủng phân lập trên *Artemia* trong thí nghiệm *in vivo* là cần thiết. Kết quả sau 5 ngày thí nghiệm, tỷ lệ sống của *Artemia* ở nghiệm thức

đối chứng ($86 \pm 4,2\%$) thấp hơn và khác biệt đáng kể ($P < 0,05$) so với nghiệm thức bổ sung chủng BC24.4 ($92 \pm 2,7\%$). Như vậy, chủng BC24.4 trong nghiên cứu hiện tại không gây hiện tượng chết ở *Artemia*, đồng thời còn góp phần nâng cao tỷ lệ sống của đối tượng thí nghiệm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Elmnasser & cs. (2024), sáu chủng S1, S2, S3, S4, S5, và S6 thuộc dòng *Bacillus subtilis* và *Bacillus cereus* được phân lập từ ruột cá tráp đầu vàng *Sparus aurata* không gây các dấu hiệu hoặc triệu chứng gây bệnh trên *Artemia*, mà còn cải thiện tỷ lệ sống của đối tượng nuôi ($> 90\%$) khi cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh *Vibrio alginolyticus*. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh dòng *Bacillus* phân lập từ các nguồn khác nhau không chỉ mang các đặc tính probiotic mà còn an toàn đối với đối tượng nuôi có giá trị kinh tế như tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* (Phạm Thị Tuyết Ngân

& cs., 2021), tôm sú *Penaeus monodon* (Vaseeharan & Ramasamy, 2003) và cá rô phi *Oreochromis niloticus* (Aly & cs., 2008). Điều này biểu thị tính an toàn của dòng vi khuẩn *Bacillus* đối với đời sống của thủy sinh vật và tiềm năng phát triển probiotic ứng dụng trong xử lý môi trường ao nuôi thủy sản

4. KẾT LUẬN

Tổng cộng 78 chủng được phân lập từ mẫu nước và bùn đáy ao nuôi *Artemia* với các đặc điểm nhận dạng tương đồng với giống *Bacillus*. Trong đó, 15 chủng có khả năng sinh ít nhất một loại enzyme ngoại bào (protease, amylase hoặc cellulase) ở mức trung bình với vòng phân giải lớn hơn 10 mm và chỉ 4/15 chủng (BC12.1, BC12.7, BC24.1 và BC24.4) sở hữu hai loại enzyme vượt trội. Hoạt tính enzyme phân giải protein và tinh bột của chủng BC24.4 đạt cao nhất và khác biệt không đáng kể về enzyme phân giải cellulose giữa các chủng. Kết quả giải trình tự cho thấy chủng BC24.4 đạt mức tương đồng cao nhất với loài *Bacillus subtilis*. Tỷ lệ sống của *Artemia* cải thiện sau khi cảm nhiễm chủng BC24.4, cho thấy mức độ an toàn của chủng vi khuẩn.

LỜI CẢM ƠN

Các kết quả nghiên cứu của đề tài này là một phần dữ liệu của nhiệm vụ khoa học và công nghệ “Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn *Bacillus* sp., *Rhodopseudomonas* sp. bản địa từ ao nuôi thủy sản tại tỉnh Sóc Trăng phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học” cấp tỉnh Sóc Trăng (nay là thành phố Cần Thơ) 2024-2026.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abd-Elhalem B.T., El-Sawy M., Gamal R.F. & Abou-Taleb K.A. (2015). Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agroindustrial byproducts. *Annals of Agricultural Sciences*. 60(2): 193-202.

Aly S.M., Abd-El-Rahman A.M., John G. & Mohamed, M.F. (2008). Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. *Aquaculture*. 277(1-2): 1-6.

Barrow G.H. & Feltham R.K.A. (1993). *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*, 3rd Edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Boyd C.E. (2020). *Water quality: an introduction*, 3rd edition. Springer Publisher.

Đỗ Thị Thanh Dung, Lê Thanh Bình, Hoàng Thị Đăng Dương, Võ Đình Quang & Phan Thị Phụng Trang (2017). Tuyển chọn các chủng *Bacillus* spp. sinh enzyme và kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây hội chứng chết sớm (EMS) trên tôm. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*. 1(6): 23-31.

Elmnasser N., Hassen W., Zmantar T., Ashraf S.A., Hadj Lajimi R., Humaidi J.R., Alreshidi M., Hamadou W. S., Emira N. & Snoussi M. (2024). Antagonistic and enzymatic activities of *Bacillus* species isolated from the fish gastrointestinal tract as potential probiotics use in *Artemia* culture. *Cellular and molecular biology* (Noisy-le-Grand, France). 70(5): 48-58.

Fernandes S., Kerkar S., Leitao J. & Mishra A. (2019). Probiotic role of salt pan bacteria in enhancing the growth of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 11(4): 1309-1323.

Gale E.F. (1943). Factors influencing the enzymic activities of bacteria. *Bacteriological Reviews*. 7(3): 139-173.

Ghose T.K. (1987). Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59(2): 257-268.

Huynh T.G., Chi C.C., Nguyen T.P., Tran T.T.H., Cheng A.A. & Liu C.H. (2018). Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*. 46: 2416-2428.

James G., Das B.C., Jose S. & VJ R.K. (2021). *Bacillus* as an aquaculture friendly microbe. *Aquaculture International*. 29(1): 323-353.

Kamilya D. & Devi W.M. (2022). *Bacillus* Probiotics and Bioremediation: An Aquaculture perspective. In M. T. Islam, M. Rahman & P. Pandey, *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting* (pp. 335-347). Springer Cham.

Le T.H., Hoa N.V., Sorgeloos P. & van Stappen G. (2018). *Artemia* feeds: a review of brine shrimp production in the Mekong Delta, Vietnam. *Reviews in Aquaculture*. 11(4): 1169-1175.

Liang Q., Yuan M., Xu L., Lio E., Zhang F., Mou H. & Secundo F. (2022). Application of enzymes as a feed additive in aquaculture. *Marine Life Science & Technology*. 4(2): 208-221.

Logan N.A. & de Vos P. (2015) *Bacillus*. In: Whitman, W.B., Ed., *Bergey's Manual of Systematics of*

- Archaea and Bacteria, John Wiley & Sons, Inc., in Association with Bergey's Manual Trust, Hoboken.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-275.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.
- Nguyễn Thị Ngọc Anh, Quảng Thị Mỹ Duyên & Nguyễn Văn Hòa (2014). Khảo sát các yếu tố kỹ thuật và hiệu quả tái chánh mô hình nuôi *Artemia* ở tỉnh Sóc Trăng và Bạc Liêu. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 32: 100-112.
- Pérez-Sánchez T., Ruiz-Zarzuela I., De Blas I., & Balcázar J.L. (2013). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*. 6(3): 133-146.
- Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải, Vũ Ngọc Út & Huỳnh Trường Giang (2021). Chọn lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. từ ao nuôi tôm quảng canh có khả năng phân hủy hữu cơ và kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 57(3B): 191-199.
- Ramu D., Sigamani S., Venkatachalam H., Bommannan P. & Ramamurthy D. (2017). The role of probiotics in the control of bacterial diseases and biodegradation of organic matter in shrimp (*Penaeus vannamei*) culture ponds of South India. *Journal of Coastal Life Medicine*. 5(7): 293-298.
- Samson J.S., Choresca C.H. & Quiazon K.M.A. (2020). Selection and screening of bacteria from African nightcrawler, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867) as potential probiotics in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36(1): 16.
- Shinde A.H., Sharma A., Doshi S., Kumar M.A. & Haldar S. (2022). Isolation and screening of sulfur-oxidizing bacteria from coast of Bhavnagar, India, and formulation of consortium for bioremediation. *Environmental science and pollution research international*. 29(36): 54136-54149.
- 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.
- Somsiri T., Chinabu S., Phuong N.T., Oanh D.T.H., Shariff M., Yusoff F. Md., Bartie K., Giacomini M., Robba M., Bertone S., Huys G. & Teale A. (2006). A simple device for sampling pond sediment. *Aquaculture*. 258(1-4): 650-654.
- Song Z., An J., Fu G. & Yang X. (2011). Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture*. 319(1-2): 188-193.
- Sorgeloos P., Coutteau P., Dhert P., Merchie G. & Lavens P. (1998). Use of Brine Shrimp, *Artemia* spp. in Larval Crustacean Nutrition: A Review. *Reviews in Fisheries Science*. 6(1-2): 55-68.
- Sorgeloos P., Dhert P. & Candreva P. (2001). Use of the brine shrimp, *Artemia* spp. in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 200(1-2): 147-159. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00698-6](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00698-6).
- Stappen G.V., Sorgeloos P. & Rombaut G. (2024). Manual on *Artemia* production and use. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Papers, No. 702. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cd0313en>.
- Vaseeharan B., & Ramasamy P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in applied microbiology*. 36(2): 83-87. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01255.x>.