Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2025, 23(11): 1445-1454 https://doi.org/10.31817/tckhnnvn.2025.23.11.04
vie.vjas.vn

SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VÀ HOẠT TÍNH ENZYME NGOẠI BÀO CỦA VI KHUẨN *Bacillus* sp. PHÂN LẬP TỪ AO NUÔI TÔM QUẢNG CANH Ở KIÊN GIANG

Hồng Mộng Huyền[1*], Nguyễn Thị Phường[1], Nguyễn Hữu Dự[1], Hồng Phúc Ngươn[2], Nguyễn Thị Trúc Linh[3], Trần Thị Tuyết Hoa[4]

[1]Khoa Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Trường Đại học Kiên Giang
[2]Trung tâm Xúc tiến đầu tư và Hỗ trợ doanh nghiệp Cà Mau
[3]Khoa Nông nghiệp Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh
[4]Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

[*]Tác giả liên hệ: hmhuyen@vnkgu.edu.vn

Ngày nhận bài: 12.03.2025 Ngày chấp nhận đăng: 31.10.2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* (tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp - Vp_{AHPND}) và khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ của *Bacillus* sp. Các chủng vi khuẩn này phân lập từ mẫu nước, bùn và tôm ở ao nuôi tôm quảng canh tại huyện An Minh, An Biên và U Minh Thượng thuộc tỉnh Kiên Giang. Từ 68 mẫu thu được, 15 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. được phân lập và định danh. Bằng phương pháp vạch vuông góc, phát hiện 10 chủng *Bacillus* có khả năng ức chế sự phát triển của *V. parahaemolyticus*. Đặc biệt, chủng AB5 có khả năng ức chế vi khuẩn tốt nhất với đường kính kháng khuẩn là 12mm trong thử nghiệm khuếch tán trên đĩa thạch. Chủng này duy trì khả năng ức chế vi khuẩn Vp_{AHPND} trong các điều kiện môi trường khác nhau về pH, nhiệt độ và độ mặn. Chủng AB5 cho thấy khả năng phân giải protein, cellulose và tinh bột với đường kính lần lượt là 25mm; 21,5mm và 18,66mm trong thử nghiệm enzyme ngoại bào. Nghiên cứu này đã sàng lọc và tuyển chọn được chủng *Bacillus* bản địa có khả năng kháng khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm và phân giải hợp chất hữu cơ, đây là bước đầu của quy trình phát triển các sản phẩm vi sinh phục vụ nuôi tôm.

Từ khóa: *Bacillus*, phân giải hữu cơ, kháng khuẩn, *Vibrio parahaemolyticus*, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, nuôi tôm quảng canh.

Investigation of Antibacterial and Extracellular Enzyme Activity of *Bacillus* sp. Isolated from Extensive Shrimp Farming Ponds in Kien Giang

ABSTRACT

The study aimed to evaluate biological activities of *Bacillus* sp. isolated from extensive shrimp ponds in Kien Giang province, including antibacterial capability against *Vibrio parahaemolyticus*, the pathogen responsible for acute hepatopancreatic necrosis disease (Vp_{AHPND}) as well as its ability to decompose organic compounds. *Bacillus* bacteria were isolated from water, sediment, and shrimp samples in extensive shrimp farming ponds in An Minh, An Bien, and U Minh Thuong districts of Kien Giang province. Out of 68 samples obtained, 15 isolates of *Bacillus* sp. were isolated and identified. Using the streaked perpendicular method, 10 *Bacillus* strains were found to have inhibition ability on the growth of *V. parahaemolyticus*. Notably, AB5 isolate exhibited the highest antibacterial activity, demonstrating an inhibition zone of 12mm in the disc diffusion assay. This strain maintained its inhibitory capacity against Vp_{AHPND} bacteria under various environmental conditions, including differing pH levels, temperatures, and salinities. Additionally, strain AB5 showed the ability to degrade proteins, cellulose, and starch, with inhibition diameters of 25mm, 21.5mm, and 18.66mm, respectively, in extracellular enzyme tests. The study had screened and selected *Bacillus* local isolates with antibacterial properties against the pathogen causing acute hepatopancreatic necrosis in shrimp and the capability to decompose organic compounds, marking an important first step in the development of microbial products for shrimp farming.

Keywords: *Bacillus*, organic decomposition, antibacterial, *Vibrio parahaemolyticus*, acute hepatopancreatic necrosis disease, extensive shrimp farming.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) hay còn gọi là hội chứng chết sớm, bệnh xuất hiện lần đầu tiên tại Trung Quốc vào năm 2009. Ở Việt Nam năm 2010, dịch bệnh ảnh hưởng đến sản lượng tôm nuôi ở các tỉnh Tiền Giang, Bến Tre, Kiên Giang, Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau (Đặng Thị Hoàng Oanh & Nguyễn Thanh Phương, 2012). Tác nhân được xác định là do *Vibrio parahaemolyticus* (Tran & cs., 2013), vi khuẩn này mang plasmid có sự hiện diện gen độc tố *PirA, PirB*. Cho đến nay bệnh được ghi nhận có hơn 5 loài *Vibrio* mang gen độc lực này và được biết bệnh đã gây thiệt hại lớn đối với tôm nuôi (Kondo & cs., 2015; Dong & cs., 2017; Xiaosha & cs., 2020). Bệnh có khả năng gây chết cao, lên đến 100% cho đàn tôm, bệnh xuất hiện trên tôm ở giai đoạn 30 đến 35 ngày từ giai đoạn postlarvae và giai đoạn tôm ở 46-96 ngày nuôi (FAO, 2013; Hong & cs., 2016; De la Peña & cs., 2015).

Probiotics được xem là liệu pháp thay thế đầy hứa hẹn cho việc sử dụng hóa chất và kháng sinh ở động vật thủy sinh và hỗ trợ bảo vệ các loài nuôi trồng thủy sản khỏi bệnh tật (Hai, 2015). Trong đó, *Bacillus* được xem là một trong những chủng vi khuẩn được xem là nổi bật nhất, vì chúng có thể sản xuất một số hợp chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm, bao gồm gramicidin S, polymyxin và tyrothricin, đặc biệt là các bacteriocin (Balcázar & Luna, 2007). Các loài *Bacillus* khác nhau có thể sản xuất một số enzyme quan trọng như amylase, cellulase, tannase, pectinase và beta glucosidase (Kakou & cs., 2017). Hiện nay có nhiều báo cáo về khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm của chủng *Bacillus*, như *B. cereus* (Vidal & cs., 2018), *Bacillus* sp. phân lập tại các tỉnh Trà Vinh, Bạc Liêu và Cà Mau (Phạm Thị Tuyết Ngân & cs., 2021); chủng *Bacillus* CCT-Ba9 và CCT-Ba42 (Phạm Minh Tuấn & cs., 2018). Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn được chủng *Bacillus* từ ao nuôi tôm quảng canh tại tỉnh Kiên Giang, có hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính và phân giải hữu cơ.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Bacillus* phân lập ở ao nuôi tôm quảng canh tại huyện An Minh, An Biên và U Minh Thượng thuộc tỉnh Kiên Giang.

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (CM1) được lấy từ bộ sưu tập bệnh phẩm của Bộ môn Thủy sản, Khoa Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Trường Đại học Kiên Giang.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và nhận dạng vi khuẩn Bacillus

Phương pháp thu mẫu bùn, nước, tôm

Thu 68 mẫu bùn, nước, tôm ở các ao nuôi tôm nước lợ mặn ở huyện An Minh (n = 36), An Biên (n = 26) và U Minh Thượng (n = 6) thuộc tỉnh Kiên Giang, các ao này được chọn ngẫu nhiên. Huyên An Biên và An Minh là hai huyện giáp biển nên hoạt động nuôi tôm theo hình thức quảng canh diễn ra nhiều hơn. Tại mỗi ao, mẫu bùn, nước, tôm được thu ở 5 điểm bao gồm 4 góc và giữa ao, sau đó trộn điều các mẫu ở mỗi điểm với nhau và cho vào chai đã được tiệt trùng. Mẫu được giữ lạnh và chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập *Bacillus.*

Phân lập vi khuẩn Bacillus

Lấy 1g (1ml) mẫu cho vào ống nghiệm có chứa 9ml nước muối sinh lý (0,85% NaCl), trộn đều, ủ ở nhiệt độ 80°C trong 20 phút. Để nguội sau đó pha loãng mẫu với các nồng độ thích hợp (10^{-1}, 10^{-2}), rút 100µl dung dịch mẫu đã pha loãng, trải đều các mẫu trên đĩa thạch Tryptic Soy Agar (M290-500G, Himedia, Ấn Độ) có bổ sung NaCl 1,5% (TSA^{+}), ủ ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Nhận diện khuẩn lạc *Bacillus* sp. theo mô tả của Boottanun & cs. (2017). Các khuẩn lạc rời được chọn sẽ tiến hành tách ròng cho đến thuần.

Tất cả các khuẩn lạc nghi ngờ là vi khuẩn *Bacillus* thông qua hình dạng khuẩn lạc được miêu tả sẽ được dùng để nhuộm Gram, kiểm tra

tính di động, thử nghiệm oxidase, thử nghiệm catalase, khả năng sinh bào tử, nhằm định danh các chủng vi khuẩn này đến chi *Bacillus.*

Phương pháp kiểm tra khả năng sinh bào tử

Dùng que cấy tiệt trùng lấy một ít vi khuẩn hòa vào 1 giọt nước cất ở giữa phiến kính, làm khô trong không khí, hơ nhanh vết bôi trên ngọn lửa đèn cồn 2-3 lần để vi khuẩn gắn chặt vào phiến kính. Nhuộm bằng dung dịch xanh malachite trong 10 phút, rửa nước cất. Nhuộm lại bằng dung dịch safranin trong 30 giây, rửa nước cất, thấm khô. Quan sát tiêu bản trên kính hiển vi quang học với vật kính 100X. Bào tử bắt màu xanh, tế bào chất bắt màu đỏ hồng (Oktari & cs., 2017).

2.2.2. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của Bacillus

Phương pháp vạch cấy vuông góc

Các chủng vi khuẩn được xác định là *Bacillus* được sử dụng để xác định hoạt tính kháng khuẩn. Cụ thể, vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* (CM1) được cấy thẳng vạch lên đĩa môi trường TSA^+. Sau đó tiếp tục cấy *Bacillus* thẳng vạch vuông góc với vạch đầu tiên, ủ ở 28°C, quan sát sự đối kháng sau 24 giờ (Kuebutornye & cs., 2019). Mỗi chủng vi khuẩn được thực hiện với 3 lần lặp lại.

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính kháng khuẩn ở thí nghiệm vạch cấy vuông góc sẽ được sử dụng để khảo sát hoạt tính khuẩn *V. parahaemolyticus* (CM1) bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, nhằm xác định khả năng sản sinh chất diệt khuẩn của *Bacillus*. Cụ thể, trải dịch *V. parahaemolyticus* gây bệnh (CM5) (10^7 CFU/ml) lên đĩa môi trường TSA^+. Vi khuẩn *Bacillus* nuôi trong môi trường Nutrient broth (M002-500G, Himedia, Ấn Độ) bổ sung 1,5% NaCl (NB^+) sau 24 giờ được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Sau đó, rút 100µl dịch nổi sau ly tâm cho vào giếng có đường kính 8mm trên đĩa thạch đã trải vi khuẩn gây bệnh. Đo đường kính vòng kháng khuẩn tạo thành sau 24 giờ ủ ở 28°C. Mỗi chủng vi khuẩn được thực hiện lặp lại 3 lần (Chythanya & cs., 2002).

Thí nghiệm khảo sát khả năng kháng khuẩn của Bacillus (AB5) đồng nuôi cấy với V. parahaemolyticus (CM1) trong điều kiện độ mặn, pH và nhiệt độ khác nhau

Độ mặn khác nhau: Khảo sát khả năng kháng *V. parahaemolyticus* (CM1) của *Bacillus* (AB5) đồng nuôi cấy trong điều kiện độ mặn khác nhau theo phương pháp của Arici & cs. (2004) có điều chỉnh. Chuẩn bị ống nghiệm chứa 10ml môi trường Nutrient broth (M002-500G, Himedia, Ấn Độ) có các nồng độ muối NaCl khác nhau, lần lược 1%, 2%, 3% và 4% (w/v). Nuôi tăng sinh riêng biệt chủng *Bacillus* (AB5) và *V. parahaemolyticus* (CM1) trong môi trường NB^+ ở 28°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm 7.000 vòng/phút trong 5 phút để thu sinh khối hai chủng vi khuẩn này. Tiếp tục hòa tan riêng biệt sinh khối hai chủng vi khuẩn trong 1ml nước muối sinh lý, đồng thời điều chỉnh mật số *Bacillus* (AB5) về 10^9 CFU/ml, mật số *V. parahaemolyticus* (CM1) về 10^6 CFU/ml. Sau đó rút 100µl mỗi loại vi khuẩn cho vào ống nghiệm 1%, 2%, 3% và 4% NaCl và nuôi lắc ở 28°C (mật số vi khuẩn trong ống nghiệm AB5 10^7 CFU/ml + CM1 10^4 CFU/ml). Sau 24 giờ, tiến hành xác định mật độ *V. parahaemolyticus* (CM1) bằng phương pháp trải đĩa đếm khuẩn lạc trên môi trường TCBS Agar (thiosulfate citrate bile salt sucrose, môi trường đặc trưng cho vi khuẩn *Vibrio*) (M870-500G, Himedia, Ấn Độ). Mỗi ống nghiệm độ mặn khác nhau được lặp lại 3 lần, đồng thời chuẩn bị ống nghiệm ở các độ mặn khác nhau có bổ sung riêng *Bacillus* (AB5) để làm mẫu đối chứng âm, ống nghiệm bổ sung riêng *V. parahaemolyticus* (CM1) để làm mẫu đối chứng dương.

pH khác nhau: Chuẩn bị môi trường NB được thay đổi pH về các mức 4, 5, 6, 7, 8, 9. Cách tiến hành tương tự như ở độ mặn.

Nhiệt độ khác nhau: Nuôi cấy vi khuẩn thử nghiệm, vi khuẩn gây bệnh sau đó nuôi lắc ở các mức 25, 30, 35, 40°C. Cách tiến hành tương tự như ở độ mặn.

2.2.3. Phương pháp xác định hoạt tính phân giải protein, tinh bột, cellulose của Bacillus

Mười chủng *Bacillus* có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* (CM1) được sử dụng để

thực hiện thí nghiệm này. Cụ thể, chuẩn bị đĩa môi trường CMC Agar (GRM9354-500G, Himedia, Ấn Độ), Starch Agar (M107-500G, Himedia, Ấn Độ) và SM Agar (M763-500G, Himedia, Ấn Độ) tương ứng cho khảo sát khả năng sinh các enzyme cellulase, amylase và protease. Sau đó chấm điểm chủng *Bacillus* được nuôi cấy có cơ chất, sau đó ủ ở 28°C trong 24 giờ. Thử nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại. Sử dụng các thuốc nhuộm lugol để hiện vòng phân giải trên đĩa thạch đối với xác định khả năng sinh enzyme cellulase, amylase phân giải cellulose và tinh bột của *Bacillus*. Chủng có khả năng phân giải hữu cơ khi xuất hiện vòng phân giải xung quanh điểm chấm vi khuẩn trên đĩa thạch (Trần Thị Bích Quyên, 2012).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập *Bacillus* từ ao nuôi tôm

Nghiên cứu đã tiến hành thu được 68 mẫu, từ các mẫu này đã phân lập được 15 chủng *Bacillus* (Bacillus). Các chủng *Bacillus* có các đặc điểm tương đồng với các kết quả công bố trước đó như về hình dạng khuẩn lạc (Hình 1A), vi khuẩn Gram dương hình que (Hình 1B), phản ứng dương tính với catalase, oxydase, có tính di động và sinh bào tử (Hình 1C). Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Boottanu & cs. (2017), Phạm Thị Tuyết Ngân & cs. (2021) về đặc điểm hình thái khuẩn lạc và đặc điểm sinh hoá.

Sự hiện diện của *Bacillus* khác nhau ở các mô hình nuôi tôm khác nhau. Một nghiên cứu trước đó cho thấy *Bacillus* hiện diện ở ao nuôi tôm thâm canh tại huyện Kiên Lương nhiều hơn ở huyện Hòn Đất (Hồng Mộng Huyền & cs., 2024) và cũng cho tỷ lệ cao hơn so với nghiên cứu này, nguyên nhân do trong quá trình nuôi tôm thâm canh người nuôi thường bổ sung các chế phẩm sinh học nhiều hơn so với mô hình nuôi quảng canh. Hura & cs. (2018) cho rằng trong tự nhiên, *Bacillus* có môi trường phát triển thích hợp là bùn đáy ao. Nhóm tác giả còn cho rằng nhóm *Bacillus* ngoài tự nhiên có khuynh hướng phát triển khá giống với môi trường ao nuôi. Một nghiên cứu khác cho thấy số lượng bào tử *Bacillus* trong bùn có khuynh hướng ổn định và chiếm ưu thế trong suốt quá trình nuôi tôm sú và dao động trong khoảng từ $4,3 \times 10^4$ đến $7,9 \times 10^5$ CFU/g. Mật số *Bacillus* có khuynh hướng biến động và giảm khi độ mặn tăng (Phạm Thị Tuyết Ngân & Nguyễn Hữu Hiệp, 2010; Phạm Thị Tuyết Ngân & cs., 2020).

3.2. Kết quả xác định khả năng kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của vi khuẩn *Bacillus*

Mười lăm chủng *Bacillus* được sử dụng để khảo sát khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* - Vp_{AHPND} (CM1) bằng phương pháp vạch cấy vuông góc (Hình 2A). Kết quả chỉ có 10 chủng *Bacillus* có khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn kiểm định CM1. Trong đó, số chủng *Bacillus* kháng Vp_{AHPND} phân lập tại huyện An Minh là 4 chủng (chiếm 40%) và huyện An Biên là 6 chủng (chiếm 60%) và không ghi nhận chủng nào ở U Minh Thượng.

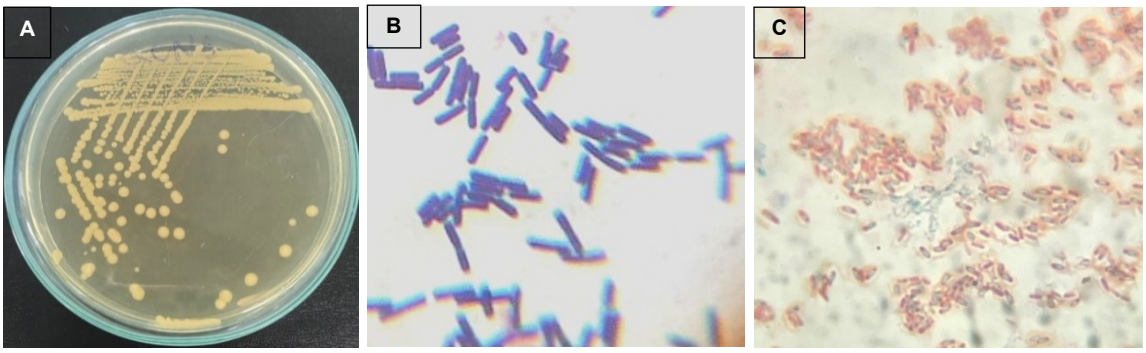
Kết quả khảo sát cho thấy 10 chủng *Bacillus* đều thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn CM1 trong thử nghiệm khuếch tán trên đĩa thạch, qua đó cho thấy hiệu quả diệt khuẩn của *Bacillus* có thể không chỉ do cơ chế cạnh tranh chỗ ở hoặc cạnh tranh về mặt nguồn dinh dưỡng, mà còn liên quan đến việc sản sinh các hợp chất kháng khuẩn. Cụ thể, các chủng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn kiểm định CM1 ở những mức độ khác nhau, bao gồm chủng AMN1.1, AMB2.1, AMB2.2, AMN2.1, ABN5, ABN7, AB4.4, AB5, AB16, AB19 với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 3,33 đến 12mm. Trong đó, chủng AB5 là chủng có khả năng kháng khuẩn cao nhất với đường kính 12mm (Bảng 2, Hình 2B).

Đã có nhiều nghiên cứu phân lập được các chủng *Bacillus* từ nhiều nguồn gốc khác nhau có hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus*. Phạm Minh Tuấn (2018) xác định có 9 chủng thể hiện đặc tính đối kháng *V. parahaemolyticus* trong 133 chủng *Bacillus*. Trong đó, chủng BV1 phân lập từ nước sông có tính kháng khuẩn mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn

17,67mm, hoạt tính bacteriocin là 4222,820 AU/ml, các chủng vi khuẩn còn lại dao động từ 6,67 đến 11,67mm. Bên cạnh đó, chủng *B. polyfermenticus* F27 đối kháng *V. parahaemolyticus* NT7 với đường kính vòng kháng khuẩn là 18,5mm (Nguyễn Văn Minh & cs., 2019). Phạm Thị Tuyết Ngân & cs. (2021) đã phân lập được chủng *Bacillus* CM3.1 có khả năng kháng với *V. parahaemolyticus* cao nhất với đường kính kháng khuẩn là 13,05mm, kế đến chủng CM2.2 là 12,50, các chủng này phân lập ao nuôi tôm tại Cà Mau; chủng TV3.1 (Trà Vinh) và chủng BT1.2 (Bến Tre) có đường kính vòng kháng khuẩn lần lược là 9,90 và 9,25mm.

Bảng 1. Số chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được từ ao nuôi tôm quảng canh ở huyện An Minh, An Biên và U Minh Thượng

Địa điểm	Mẫu thu	Chủng *Bacillus*
An Minh	36	7
An Biên	26	7
U Minh Thượng	6	1
Tổng	68	15

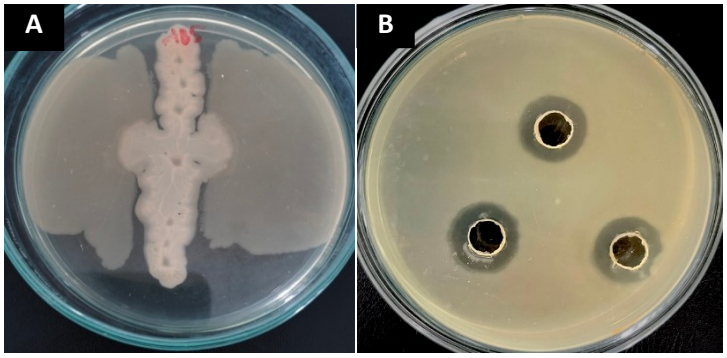


Ghi chú: A: Hình dạng khuẩn lạc, B: Hình dạng tế bào nhuộm Gram, C: Hình dạng bào tử.

Hình 1. Một số hình thái chủng *Bacillus*

Bảng 2. Kết quả kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* (CM1) của *Bacillus* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Chủng	Đường kính vòng kháng (D – d, mm)			Giá trị trung bình (mm)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	
AMN1.1	3	4	4	3,67
AMB2.1	3	5	2	3,33
AMB2.2	6	7	3	5,33
AMN2.1	5	5	3	4,33
ABN5	7	5	6	6
ABN7	3	6	4	4,33
AB4.4	4	3	3	3,33
AB5	14	10	12	12
AB16	6	6	6	6
AB19	4	5	4	4,33



Ghi chú: A: Kháng khuẩn bằng phương pháp vạch cấy vuông góc, B: Kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch.

Hình 2. Khả năng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* (CM1) **của vi khuẩn *Bacillus*** (AB5)

Bảng 3. Kết quả mật số *V. parahaemolyticus* (CM1) (CFU/ml) **sau 24 giờ đồng nuôi cấy với chủng *Bacillus*** (AB5) **ở nhiệt độ, pH và nồng độ độ mặn khác nhau**

Nhiệt độ (°C)	pH	Độ mặn (%)	Mật số vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (CM5) (CFU/ml)		Mật số *Bacillus* (AB5) (CFU/ml)
			Chủng thí nghiệm (AB5)	Đối chứng dương	Đối chứng âm
25	4	1	0	$4,9 \times 10^7$	$3,3 \times 10^9$
30	5	2	0		
35	6	3	0		
40	7	4	0		
	8		0		
	9		0		

Qua đánh giá so sanh thấy được chủng vi khuẩn *Bacillus* AB5 trong nghiên cứu này thể hiện hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* tương đối tốt (12mm), mặc dù vòng kháng khuẩn có thấp hơn hoặc bằng và cũng có cao hơn với một số chủng của các nghiên cứu trước đó. Sự khác nhau này cho thấy các chủng *Bacillus* được phân lập ở các mẫu có nguồn gốc hay vùng địa lý khác nhau thì khả năng kháng khuẩn cũng khác nhau, ngoài ra chúng còn phụ thuộc vào đặc tính khác nhau của chủng vi khuẩn gây bệnh sử dụng trong nghiên cứu. Ở mỗi nghiên cứu sử dụng một số phương pháp phân tích đánh giá khác nhau cho kết quả khác nhau, đồng thời chủng *Bacillus* AB5 trong nghiên cứu này vẫn chưa được định danh đến loài.

Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* (CM1) đồng nuôi cấy với chủng *Bacillus* AB5 ở các nồng độ pH, nhiệt độ và độ mặn khác nhau cũng được xác định, nhằm đánh giá khả năng tác động đến khả năng kháng khuẩn Vp_{AHPND} của chủng *Bacillus*. Kết quả bảng 3 cho thấy chủng AB5 có khả năng ức chế sự sinh trưởng của chủng Vp_{AHPND} ở các giá trị nhiệt độ 20, 25, 30, 35 và 40°C sau 24 giờ đồng nuôi cấy. Kết quả tương tự, chủng AB5 có khả năng ức chế hoàn toàn Vp_{AHPND} ở các giá trị pH 4, 5, 6, 7, 8 và 9. Ở độ mặn 1; 2; 3; 4% chủng AB5 cũng ức chế sự phát triển của Vp_{AHPND}, thông qua việc không ghi nhận có sự hiện diện của vi khuẩn (0 CFU/ml).

Bacillus có khoảng nhiệt độ phát triển tối ưu rộng trong khoảng giá trị 26-40°C (Nguyễn Văn Phúc & Phan Thị Phương Trang, 2014), thích hợp sinh trưởng ở môi trường giàu dinh dưỡng và có độ mặn từ 15-35‰ (Đỗ Thị Hồng Thịnh & cs., 2017). Theo nghiên cứu của Trần Đình Nguyên & cs. (2014) chủng *Bacillus* BN1 và BD23.1 sinh trưởng và phát triển tốt ở pH 5-9. Chủng *B. subtilis* BRB2.1 và *B. siamensis* BĐK2.3 phát triển đạt mật số cao nhất ở giá trị

pH là 7,0 sau 24 giờ nuôi, ngoài ra ở pH 5-8 sự phát triển của hai chủng này không khác biệt có ý nghĩa thống kê (P >0,05). Một số nghiên cứu trước đây chứng minh các chủng *Bacillus* có khả năng chịu được phổ muối từ 0,5-4% (Võ Hồng Phượng & cs., 2018; Nguyễn Văn Phúc & Phan Thị Phương Trang, 2014).

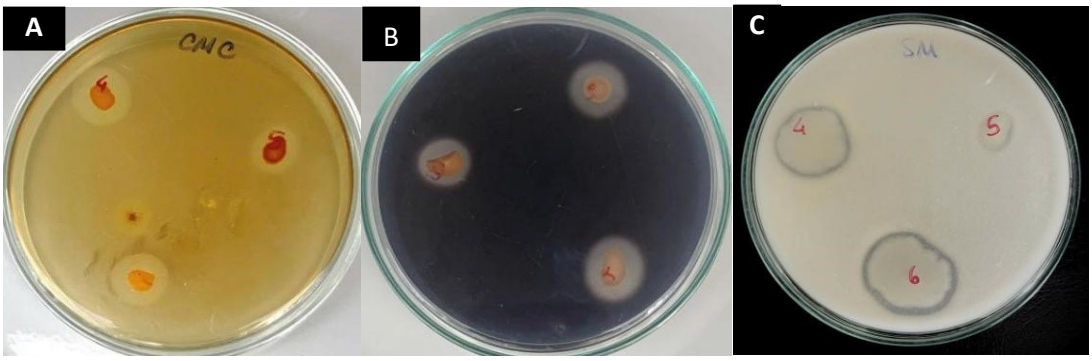
Như vậy, chủng *Bacillus* AB5 mật độ 10^7 CFU/ml có khả năng ức chế sự phát triển Vp_{AHPND} (CM1) mật độ 10^4 CFU/ml ở các giá trị pH 4, 5, 6, 7, 8 và 9; các nhiệt độ 25, 30, 35 và 40°C và các độ mặn 1; 2; 3; 4%. Đồng nghĩa với chủng *Bacillus* AB5 đều có khả năng chống chịu pH, độ mặn và nhiệt độ khá rộng và việc chủng AB5 có khả năng thích ứng với các yếu tố này và không ảnh hưởng đến khả năng sản sinh chất diệt khuẩn.

3.3. Khả năng phân giải protein, tinh bột, cellulose của vi khuẩn *Bacillus*

Mười chủng *Bacillus* đều có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* được sử dụng để kiểm tra khả năng phân giải protein, tinh bột và cellulose. Kết quả trình bày tại bảng 4 cho thấy, chủng AB5 (Hình 3) và AMN1.1 có khả năng sinh cả 3 loại enzyme ngoại bào amylase, protease và cellulase. Các chủng còn lại chỉ thể hiện 2 hoặc 1 hoạt tính, trong đó có 4 chủng có hoạt tính phân giải tinh bột và cellulose (AMB2.2, AMN2.1, ABN5, AB4.4), 2 chủng phân giải protein và tinh bột (AMB2.1, AB16), 1 chủng chỉ có khả năng phân giải protein (AB19) và 1 chủng tinh bột (ABN7).

Bảng 4. Khả năng phân giải protein, tinh bột, cellulose của 10 chủng *Bacillus*

Chủng	Kích thước vòng hoạt tính (mm)		
	Protein	Cellulose	Tinh bột
AMN1.1	12	13	18
AMB2.1	10	0	11
AMB2.2	0	9	9
AMN2.1	0	6	12
ABN5	0	12	7
ABN7	0	0	7
AB4.4	0	9,5	9
AB5	25	21,5	18,66
AB16	20	0	10
AB19	10	0	0



Ghi chú: A: Phân giải cellulose, B: Phân giải tinh bột, C: Phân giải protein.

Hình 3. Đặc điểm phân giải hữu cơ của chủng vi khuẩn *Bacillus* (AB5)

Theo nghiên cứu của Ngô Tự Thành & cs. (2009) khi khảo sát hoạt tính enzyme ngoại bào của 236 chủng *Bacillus* phân lập từ các mẫu đất và nước thải khác nhau, chỉ có 2 chủng T20 và M27 thể hiện đầy đủ hoạt tính thủy phân các cơ chất tinh bột, CMC và gelatin, các chủng còn lại chỉ biểu hiện khả năng thủy phân tinh bột và CMC. Lee & cs. (2012) cho biết chủng *Bacillus* sp. SM2 thể hiện đầy đủ hoạt tính enzyme amylase, cellulase và protease, trong khi ở 3 chủng *Bacillus* sp. T4 và *Bacillus* sp. JSP1 thể hiện hoạt tính protease và không thể hiện hoạt tính cellulase. Hai chủng *B. licheniformis* và *B. pumilus* chọn lọc từ 26 chủng *Bacillus* spp. phân lập từ ruột của cá trôi Ấn Độ, đều thể hiện hoạt tính enzyme amylase, tuy nhiên chỉ có chủng *B. licheniformis* thể hiện hoạt tính protease (Ramesh & cs., 2015).

Bacillus có khả năng tạo ra kháng sinh sinh học, như bacteriocin, gramicidin S, polymyxin và tyrothricin. Chúng là protein do vi sinh vật sinh tiết ra dùng để ức chế các vi sinh vật khác (Balcázar & Luna, 2007). Hiện nay, vẫn chưa có nghiên cứu xác định mối tương quan trong sản sinh kháng sinh sinh học với enzyme phân giải hữu cơ, cũng như cơ chế tác động hỗ trợ lẫn nhau giữa các hoạt tính này. Các nghiên cứu trước đây cho thấy chủng *Bacillus* có hoạt tính kháng khuẩn cao nhưng không có hoạt tính phân giải hợp chất hữu cơ cao và ngược lại. Như chủng *Bacillus* TCN3 phân lập từ mẫu nước nuôi tôm thâm canh có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* với đường kính kháng khuẩn 17,33mm và có năng kháng *V. parahaemolyticus* trong điều kiện môi trường khác nhau về pH, nhiệt độ, độ mặn, tuy nhiên chủng này không thể hiện khả năng phân giải protein, tinh bột, cellulose (Hồng Mộng Huyền & cs., 2024). Phạm Thị Tuyết Ngân & cs. (2021) đã phân lập được 13 chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng kháng với *V. parahaemolyticus* (2,05-13,05mm), cao nhất là chủng CM3.1, kế đến CM2.2 và TV3.1, nhưng trong số đó chỉ có chủng CM3.1 và TV1.3 có hoạt tính enzyme α-amylase, protease, cellulose cao. Phạm Minh Tuấn & cs. (2018) đã xử lý dịch lọc của các chủng vi *Bacillus* bằng enzyme proteinase K thì kết quả hoạt tính kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* trước đó không còn, tuy nhiên nhóm tác giả không đánh giá khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ, nhưng về cơ bản hai nhóm hoạt tính này thể hiện độc lập nhau.

Như vậy, nghiên cứu đã tìm được chủng AB5 là chủng *Bacillus* có khả năng kháng *V. parahaemolycus* cao nhất và cũng thể hiện đồng thời khả năng phân giải protein, cellulose và tinh bột cao nhất so với các chủng còn lại. Kết quả của nghiên cứu này củng cố thêm nhận định có thể phân lập vi khuẩn có lợi, đặc biệt là *Bacillus* từ nguồn mẫu tự nhiên để tìm ra các hợp chất kháng khuẩn và các hoạt tính sinh học khác có lợi cho động vật thủy sản.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu này đã phân lập được 15 chủng *Bacillus* sp. từ ao nuôi tôm quảng canh ở An Biên, An Minh và U Minh Thượng thuộc tỉnh Kiên Giang. Trong đó, có 10 chủng có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. Chủng *Bacillus* AB5 có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* cao nhất với đường kính kháng khuẩn 12mm và đồng thời có khả năng phân giải protein, tinh bột, cellulose. Ngoài ra, chủng này có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* trong điều kiện môi trường có pH, nhiệt độ, độ mặn khác nhau.

Tiếp tục giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA của chủng AB5 để định danh đến loài chủng này, đồng thời nghiên cứu thử nghiệm tác động của chủng AB5 lên hiệu quả sử dụng thức ăn và khả năng kháng bệnh *V. parahaemolyticus* của tôm.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài KHCN cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo "Nghiên cứu và phát triển chế phẩm synbiotic kết hợp chiết xuất thực vật và *Bacillus* giúp cải thiện tăng trưởng và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) vùng Đồng bằng sông Cửu Long", mã số đề tài B2024-TKG-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arici M., Bilgin B., Sagdic O. & Ozdemir C. (2004). Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. Food Microbiology. 21(1): 19-24.

Boottanun P., Potisap C., Hurdle J.G. & Sermswan R.W. (2017). Secondary metabolites from *Bacillus* amyloliquefaciens isolated from soil can kill Burkholderia pseudomallei. AMB express. 7(1): 1-11.

Chythanya R., Karunasagar I. & Karunasagar I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture. 208(1-2): 1-10.

Đặng Thị Hoàng Oanh & Nguyễn Thanh Phương (2012). Các bệnh nguy hiểm trên tôm nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học cần Thơ. (22c): 106-118.

De la Peña L.D., Cabillon N.A., Catedral D.D., Amar E.C., Usero R.C., Monotilla W.D., Calpe A.T., Fernandez D.D. & Saloma C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* cultured in the Philippines. Diseases of Aquatic Organisms. 116: 251-254.

Đỗ Thị Hồng Thịnh, Trần Hồng Anh, Trần Thị Tường Linh & Võ Đình Quang (2017). Đánh giá khả năng sinh trưởng của một số chủng vi sinh có khả năng phân hủy nhanh hoạt chất cypermethrin trong môi trường có độ mặn khác nhau. Tạp chí Khoa học Trường đại học sư phạm TP. Hồ Chí Minh. 14(6): 181-192.

Dong X., Wang H., Zou P., Chen J., Liu Z., Wang X. & Huang J. (2017). Complete genome sequence of *Vibrio campbellii* strain 20130629003S01 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease. Gut Pathogens, 9:31.

FAO (2013). MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp. FAO Fisheries and Aquaculture Report. pp. 25-27.

Hai N.V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. Journal of applied microbiology. 119(4): 917-935.

Hồng Mộng Huyền, Nguyễn Trường Duy, Ngô Thị Mỹ Trân, Nguyễn Thị Phường, Phạm Trọng Nghĩa, Hồng Phúc Ngươn, Trần Thị Tuyết Hoa & Nguyễn Thị Trúc Linh (2024). Sàng lọc, đánh giá khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* và hoạt tính phân giải hữu cơ của vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ ao nuôi tôm ở tỉnh Kiên Giang. TNU Journal of Science and Technology. 229(13): 102-111.

Hong X.P., Xu D., Zhuo Y., Liu H.Q. & Lu L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus* (*Litopaneus*) *vannamei* (Boone). Journal of fish diseases. 39: 1085-1097.

Hura M.U.D., Zafar T., Borana K. J.R. Prasad K. & Iqbal J. (2018). Effect of commercial probiotic *Bacillus megaterium* on water quality in composite culture of major carps. Intenational Journal Current 828, Agricultural Science. 8: 268-273.

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm & Huỳnh Văn Thịnh (2020). Đặc điểm của các chủng lợi khuẩn *Bacillus* spp. từ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở tỉnh Kiên Giang. Tạp chí Khoa học Trường Đại học cần Thơ. 56(2): 44-52.

Kakou A.C., Kambire O., Boli Z.B.A., Yoro T.D., Koffi N.R. & Koussemon M. (2017). Diversity and enzymatic characterization of *Bacillus* species isolated from traditional cassava starters used for attiéké production. International Journal of Biological and Chemical Sciences. 11(2): 531-540.

Kondo H., Van P.T., Dang L.T & Hirono I. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13. 17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. Genome announcements. 3(5): e00978-15.

Kuebutornye F.K., Abarike E.D. & Lu Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. Fish & shellfish immunology. 87: 820-828.

Ngô Tự Thành, Bùi Thị Việt Hà, Vũ Minh Đức & Chu Văn Mẫn (2009). Nghiên cứu hoạt tính enzyme ngoại bào của một số chủng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng xử lý nước thải. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 25: 101-106.

Nguyễn Văn Minh, Lê Anh Tuấn, Phan Quang Lợi, Dương Nhật Linh, Trần Kiến Đức, Võ Ngọc Yến Nhi, Trần Thị Á Ni & Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh (2019). Khả năng kiểm soát sinh học *Vibrio parahaemolyticus* NT7 phân lập từ tôm thẻ bệnh hoại tử gan tụy (AHPND) của chủng *Bacillus polyfermenticus* F27 phân lập từ giun quế. Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, 14(1): 71-83.

Nguyễn Văn Phúc & Phan Thị Phượng Trang (2014). Phân lập, định danh và xác định các đặc tính có lợi của chủng *Bacillus* spp. từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre. Tạp chí Khoa học. (64): 94.

Oktari A., Supriatin Y., Kamal M. & Syafrullah H. (2017). The bacterial endospore stain on Schaeffer Fulton using variation of methylene blue solution. In Journal of Physics: Conference Series. 812(1): 012066.

Phạm Minh Tuấn, Nguyễn Thị Hồng Phấn & Trần Anh Thư (2018). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn sinh *Bacteriocin* kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây

bệnh trên tôm. Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm. 15(1): 46-56.

Phạm Thị Tuyết Ngân & Nguyễn Hữu Hiệp (2010). Biến động mật độ vi khuẩn hữu ích trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) thâm canh. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. (14): 166-176.

Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên, Nguyễn Thanh Phương & Vũ Ngọc Út, (2020). Biến động mật độ *Bacillus, Lactobacillus* và *Vibrio* trong bùn ở tuyến sông Mỹ Thanh, tỉnh Sóc Trăng. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(1): 177-186.

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 TrườngĐại học cần Thơ. 57(3): 191-199.

Ramesh D., Vinothkanna A., Rai A.K. & Vignesh V.S. (2015). Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila.* Fish & shellfish immunology. 45(2): 268-276.

Trần Thị Bích Quyên (2012). Nghiên cứu và tuyển chọn một số chủng *Bacillus* làm Probiotic trong chăn nuôi: Luận văn Thạc sĩ Sinh học chuyên ngành Vi sinh vật. Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.

Tran L., Nunan L., Redman R.M., Mohney L.L., Pantoja C.R., Fitzsimmons K. & Lightner D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis Aquat Organ. 105: 45-55.

Vidal J.M.A., Pessoa M.N.D.C., Santos F.L.D., Mendes P.D.P. & Mendes M.S. (2018). Probiotic potential of *Bacillus cereus* against *Vibrio* spp. in post-larvae shrimps. Revista Caatinga. 31(2): 495-503.

Võ Hồng Phượng, Nguyễn Hồng Lộc, Võ Thị Hậu, Nguyễn Thái Hồng Ngọc, Nguyễn Hoàng Tuấn, Lê Thị Bích Thủy & Lê Hồng Phước (2018). Khảo sát đặc tính đối kháng của *Bacillus licheniformis* (B1) đối với *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh teo gan tụy cấp tính trên tôm (AHPND) trong điều kiện thí nghiệm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học cần Thơ. 54: 91-100

Xiaosha L., Zhou L. Shuling Y. & Yongjie W. (2020). Complete genome sequence analysis of the *Vibrio owensii* strain SH-14 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease. Archives of Microbiology. DOI: 10.1007/s00203-020-01824-z