

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.029

## ĐẶC ĐIỂM CỦA CÁC DÒNG LỢI KHUẨN *Bacillus* spp. TỪ TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) Ở TỈNH KIÊN GIANG

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm\* và Huỳnh Văn Thịnh

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm (email: hnttam@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 24/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 26/02/2020

Ngày duyệt đăng: 29/04/2020

### Title:

Characteristics of *Bacillus* spp. from white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Kien Giang province

### Từ khóa:

*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, enzyme ngoại bào, khả năng kháng khuẩn, tôm thẻ chân trắng

### Keywords:

Antibacterial activity, *Bacillus*, *Bacillus subtilis*, extracellular enzymes, white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*

### ABSTRACT

This study is aimed to isolate beneficial *Bacillus* spp. strains for producing biological products to control pathogens. Twenty *Bacillus* spp. strains was isolated from digestive system of white leg shrimps (*Litopenaeus vannamei*) collected from shrimp ponds in Kien Giang province. The results show that 11 isolates acted as an antagonist of at least one of pathogenic strains including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* sp., and *Pseudomonas* sp. Eleven isolates have the potential production at least two extracellular enzymes including amylase, cellulase and protease. The AM2 and AM3 were selected to examine salinity and pH tolerance ability, and both strains represented their abilities to grow at the pH ranges from 4 to 9 and the salinity ranges from 1 to 5%. The results of 16S rRNA genotype sequencing for the two strains, AM2 and AM3 indicated that the AM2 sequence was homologous up to 99% with *B. subtilis*, and AM3 strain sequence was homologous up to 99% with *Bacillus cereus* and registered on GenBank with the code consecutively MN907469 and MN907471.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập những dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có những đặc tính phù hợp để sản xuất chế phẩm sinh học nhằm kiểm soát các tác nhân gây bệnh. Từ hệ tiêu hóa của các mẫu tôm thẻ chân trắng thu từ ao nuôi thuộc địa bàn tỉnh Kiên Giang đã phân lập được 20 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. Kết quả có 11 trên tổng số 20 dòng thể hiện khả năng đối kháng với ít nhất 1 dòng vi khuẩn kiểm định gồm *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* sp. và *Pseudomonas* sp. Kết quả cũng cho thấy cả 11 dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh ít nhất 2 loại enzyme ngoại bào trong nhóm amylase, cellulase và protease. Dòng AM2 và AM3 được lựa chọn để khảo sát khả năng chịu mặn và chịu pH, kết quả cho thấy, cả 2 dòng đều có khả năng phát triển trong môi trường được bổ sung nồng độ muối từ 1 - 5% và pH từ 4 - 9, dòng AM2 và AM3 tương đồng 99% với dòng *Bacillus subtilis* và *Bacillus cereus* dựa trên kết quả giải trình tự 16S rRNA đã được đăng ký trên GenBank với mã số lần lượt là MN907469 và MN907471.

Trích dẫn: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và Huỳnh Văn Thịnh, 2020. Đặc điểm của các dòng 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(2B): 44-52.

## 1 GIỚI THIỆU

*Bacillus* là trực khuẩn Gram dương, tế bào hình que thẳng, kích thước 0,5 - 2,5  $\mu\text{m}$  x 1,2 - 10  $\mu\text{m}$  và thường được sắp xếp thành từng cặp hoặc chuỗi, có đầu tròn. *Bacillus* có phổ chịu nhiệt, pH và độ mặn rộng, con đường biến dưỡng bằng hình thức lên men hoặc hô hấp, hầu hết có catalase dương tính (Holt *et al.*, 1994). Vi khuẩn *Bacillus* có thể sản xuất một số hợp chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn cạnh tranh. Trong số các hợp chất này, các bacteriocin là quan trọng nhất (Farzanfar, 2006). Bên cạnh đó, *Bacillus* còn sản xuất kháng sinh polypeptide, chẳng hạn như bacitracin, gramicidin S, polymyxin và tyrotricidin có khả năng chống lại nhiều loài vi khuẩn Gram dương và Gram âm (Balcázar and Luna, 2007). Chúng có thể sử dụng các enzyme ngoại bào do quá trình phân giải polysaccharide, nucleic acid và lipid làm nguồn carbon và chất cho điện tử (Nguyễn Lâm Dũng và *ctv.*, 1975). Các loài thuộc chi *Bacillus* được biết đến là vi sinh vật có khả năng sản xuất các loại enzyme có lợi trong công nghiệp. Enzyme sản xuất bởi các dòng vi khuẩn thuộc chi này chiếm khoảng 50% tổng thị trường enzyme. Các loài *Bacillus* khác nhau có thể sản xuất một số enzyme quan trọng như amylase, cellulase, tannase, pectinase và betaglucosidase (Kakou *et al.*, 2017). Ngoài ra, *Bacillus* được sử dụng rộng rãi nhất làm probiotic bao gồm *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* và *B. licheniformis*. Các bào tử ổn định nhiệt của *Bacillus* có nhiều ưu điểm hơn so với những loài không sinh bào tử khác như *Lactobacillus* spp. Các chế phẩm sinh học chứa bào tử đang được sử dụng rộng rãi ở người như là chất bổ sung dinh dưỡng, ở động vật như chất kích thích tăng trưởng và các chất cạnh tranh chống vi sinh vật gây bệnh, trong nuôi trồng thủy sản để tăng cường sự phát triển và chống chịu bệnh tật của tôm nuôi (Cutting, 2011). Các yếu tố về sự chống chịu pH và độ mặn của *Bacillus* cũng được quan tâm. Độ muối tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của tôm là 15 - 25‰, pH thích hợp cho tôm nuôi từ 7,5 - 8,35 (Phạm Thị Tuyết Ngân và Trương Phú Quốc, 2010). Nồng độ muối thích hợp là 7,5 - 8,2 và giá trị pH phù hợp với điều kiện ao nuôi tôm nước lợ ở nước ta là 7,5 - 8,2 (Nguyễn Văn Hào, 2004). Do đó, nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát một số đặc tính có lợi (khả năng đối kháng với các dòng vi khuẩn gây bệnh, khả năng sinh enzyme ngoại bào, khả năng chịu pH và chịu mặn) của các dòng *Bacillus* spp. phân lập từ hệ tiêu hóa của tôm thẻ chân trắng tại một số huyện thuộc tỉnh Kiên Giang nhằm ứng dụng các dòng vi khuẩn này trong sản

xuất các chế phẩm probiotic phục vụ cho nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu tôm thẻ chân trắng là tôm trưởng thành được thu tại các ao nuôi tôm ở các huyện: An Minh, An Biên, U Minh Thượng và Vĩnh Thuận thuộc tỉnh Kiên Giang. Mỗi huyện thu mẫu tại một ao nuôi tôm với khối lượng mẫu khoảng 200 g (khoảng 80 con/kg). Mẫu được bảo quản lạnh bằng cách ướp đá trong thùng xốp trong suốt quá trình vận chuyển đến phòng thí nghiệm.

Vi khuẩn kiểm định: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* sp. và *Pseudomonas* sp. được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Sinh học Vi sinh vật, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2 Phương pháp

#### 2.2.1 Phân lập các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp.

Mẫu tôm được rửa sạch bằng nước cất và khử trùng bên ngoài bằng ethanol 70%. Tiến hành mổ và thu hệ tiêu hóa của tôm cho vào bình tam giác chứa 100 mL môi trường LB (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 10/L g NaCl) có bổ sung 1,5% NaCl và xử lý ở nhiệt độ 80°C trong 30 phút, ủ lã ở 37°C trong 48 giờ. Sau 48 giờ, tiến hành pha loãng dịch nuôi cấy trong dung dịch nước muối sinh lý 0,3% về các nồng độ  $10^{-4}$  và  $10^{-5}$  tế bào/mL Thu 100  $\mu\text{L}$  các dung dịch mẫu và trải trên đĩa chứa môi trường LB agar, đậy kín và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ, quan sát và chọn những khuẩn lạc tiêu biểu để tiến hành cấy chuyển trên môi trường LB agar. Quá trình cấy chuyển được lặp lại nhiều lần cho đến khi độ thuần vi khuẩn được xác định (Nguyễn Trọng Nghĩa và *ctv.*, 2015).

#### 2.2.2 Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Sử dụng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch của Zokaeifar *et al.* (2012) có hiệu chỉnh để kiểm tra khả năng kháng khuẩn của các dòng *Bacillus* spp. Các dòng vi khuẩn kiểm định được nuôi tăng sinh trong môi trường LB agar (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 10/L g NaCl, 20 g/L agar) trong 24 giờ, khuẩn lạc được cho vào cất nước vô trùng và tiến hành pha loãng dịch nuôi để xác định mật số vi khuẩn. Chuẩn bị dịch huyền phù của dòng chỉ thị đã được nuôi cấy qua 24 giờ với mật số  $10^8$  tế bào/mL. Sử dụng 50  $\mu\text{L}$  dịch huyền phù rồi cấy trải, để ráo, tạo 5 giếng với đường kính 4 mm sao cho mỗi giếng cách nhau 2-3 cm. Những dòng

vi khuẩn *Bacillus* spp. được nuôi tăng sinh trong 10mL môi trường LB ở điều kiện hiếu khí, ở 37°C trong 48 giờ (với mật số khoảng 10<sup>8</sup> tế bào/mL), ly tâm 13.000 rpm trong 15 phút ở 5°C. Thu phần trong của dung dịch sau ly tâm, loại bỏ phần cặn chứa tế bào vi khuẩn, trữ lạnh ở 4°C, thu được dung dịch có khả năng có bacteriocin thô (cách xác định là thu dịch và thử khả năng kháng khuẩn). Sử dụng 50 µL dịch bacteriocin thô bơm vào mỗi giếng của đĩa thạch đã chứa dòng chỉ thị với 3 lần lặp lại, dung dịch Ampicilin (5 mg/mL) được sử dụng làm đối chứng dương và nước cất là đối chứng âm. Tiến hành ủ mẫu ở 4°C trong 15 phút cho dung dịch trong giếng khuếch tán. Sau đó, đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ để vi khuẩn chỉ thị phát triển. Quan sát và đo đường kính vòng vô khuẩn.

### 2.2.3 Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào

Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào trên môi trường LB agar có bổ sung cơ chất thích hợp theo phương pháp của Trần Thị Bích Quyên (2012) có hiệu chỉnh để phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Tế bào của các dòng *Bacillus* spp. được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37°C trong 36-48 giờ. Sau 36-48 giờ nuôi cấy, tiến hành ly tâm dịch tăng sinh ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút để thu phần dịch trong (enzyme thô). Chuẩn bị đĩa môi trường LB agar có bổ sung từng loại cơ chất: 1% CMC (carboxymethyl cellulose), 1% tinh bột, 1% gelatin tương ứng cho khảo sát khả năng sinh các enzyme cellulase, amylase và protease. Tạo 3 giếng trên đĩa thạch, sau đó dùng micropipet thu 100 µL dịch enzyme thô bơm vào các giếng, ủ các đĩa khảo sát ở 37°C trong 24 giờ. Sử dụng các thuốc nhuộm Lugol và TCA 25% tương ứng với cơ chất tinh bột, CMC và gelatin để hiện vòng phân giải trên đĩa thạch. Những dòng có khả năng sinh enzyme ngoại bào khi xuất hiện vòng phân giải xung quanh giếng thạch.

### 2.2.4 Khảo sát khả năng chịu mặn

Khảo sát khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn theo phương pháp của Trần Vũ Đình Nguyên và ctv. (2014) có hiệu chỉnh để phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Chuẩn bị môi trường LB được biến đổi thành phần như sau: NaCl (1, 2, 3, 4, 5% (w/v)). Nuôi tăng sinh các dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. tuyển chọn được trong 10 mL môi trường LB ở 37°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ, tiến hành đo OD ở bước sóng 600 nm để xác định và điều chỉnh mật số vi khuẩn nằm trong khoảng 10<sup>8</sup> tế bào/mL. Thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm 2.000 vòng/phút trong 15 phút. Hòa tan sinh khối bằng 1 mL môi trường được bổ sung các nồng độ muối khác nhau sau đó chuyển

dịch huyền phù vi khuẩn vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường LB với thành phần được biến đổi tương ứng, lắc ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó 24 giờ, tiến hành xác định mật số vi khuẩn trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp pha loãng mẫu và đếm sống (Hoben and Somasegaran, 1982).

### 2.2.5 Khảo sát khả năng chịu pH

Chuẩn bị môi trường LB được thay đổi pH về các mức 4, 5, 6, 7, 8, 9 (do điều kiện pH thích hợp cho tôm nuôi từ 7,5 - 8,35). Cách tiến hành tương tự mục 2.2.4.

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

Xác định loài của dòng vi khuẩn đã phân lập có khả năng kháng khuẩn, sinh enzyme ngoại bào cao, chịu mặn, chịu pH bằng kỹ thuật sinh học phân tử phương pháp giải trình tự đoạn gene 16S rRNA với mồi xuôi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và mồi ngược 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3') (Senthilraj et al., 2016) tại Công ty Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam). Sau đó, trình tự các đoạn gen được so sánh với trình tự gen 16S trên GenBank và định danh các dòng vi khuẩn nghiên cứu với chương trình BLAST/NCBI.

### 2.2.7 Phương pháp xử lý số liệu

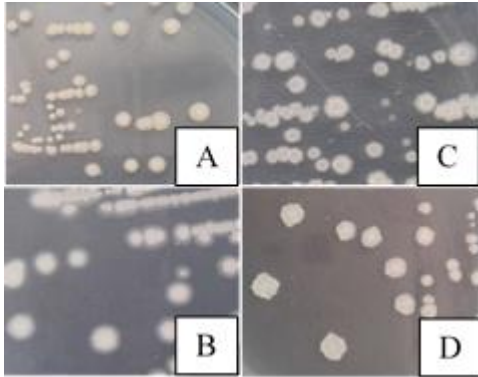
Các số liệu được nhập liệu, xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel 2010. Phần mềm Minitab 16 được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA) và hệ số biến động (CV). So sánh trung bình sự khác biệt bằng kiểm định Tukey.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Phân lập các dòng vi khuẩn có đặc điểm giống *Bacillus* spp.

Tổng số 20 dòng vi khuẩn thuần từ hệ tiêu của hóa tôm thẻ chân trắng thu ở 4 huyện An Biên, An Minh, Vĩnh Thuận và U Minh Thượng thuộc tỉnh Kiên Giang. Trong đó, có 6 dòng vi khuẩn phân lập được ở huyện Vĩnh Thuận (chiếm 30%), 5 dòng ở huyện An Biên (chiếm 25%), 5 dòng ở huyện An Minh (chiếm 25%) và 4 dòng phân lập được huyện U Minh Thượng (chiếm 20%). Các vi khuẩn sau khi được phân lập thuần, tiến hành quan sát và mô tả tế bào, khuẩn lạc. Trên môi trường LB agar, sau 24 giờ ủ ở 37°C trong điều kiện hiếu khí, trong tổng số 20 dòng vi khuẩn đã phân lập, khuẩn lạc của 19 dòng có màu trắng đục (chiếm 95%) và 1 dòng có màu trắng ngà (chiếm 5%). Khuẩn lạc của 11 dòng *Bacillus* spp. có dạng tròn (chiếm 55%) và 9 dòng

có dạng không đều (chiếm 45%). Khuẩn lạc của 12 dòng có dạng bìa nguyên (chiếm 60%), 5 dòng có dạng chia thùy (chiếm 25%) và 3 dòng có dạng bìa răng cưa (chiếm 15%) (Hình 1). Đường kính khuẩn lạc của 20 dòng vi khuẩn dao động từ 1 đến 4 mm.



**Hình 1: Một số hình thái khuẩn lạc phổ biến của các dòng vi khuẩn có đặc điểm giống *Bacillus* spp. đã phân lập**

Chú thích: A: dạng tròn, bìa nguyên; B: dạng tròn, bìa răng cưa; C: dạng không đều, chia thùy; D: dạng không đều, bìa răng cưa

Kết quả kiểm tra một số đặc điểm hình thái và sinh hóa của các dòng vi khuẩn phân lập được cho thấy, khuẩn lạc sau khi cấy trên môi trường LB agar sau 24 giờ, ở 37°C đều có dạng hình tròn hoặc không

đều, bìa nguyên hoặc răng cưa, lồi, có màu trắng đục. Tế bào có dạng hình que ngắn hoặc dài, di động, Gram dương, catalase dương tính, oxidase dương tính hoặc âm tính. Các đặc tính này của các dòng vi khuẩn phân lập phù hợp với công bố của Holt *et al.* (1994) và Lee *et al.* (2017) về đặc điểm của dòng *Bacillus* sp. như khuẩn lạc có màu trắng đục, bìa nguyên hoặc răng cưa, mô hoặc lồi, tế bào có dạng hình que thẳng, dài hoặc ngắn, di động, Gram dương, catalase và oxidase dương tính hoặc âm tính. Vì vậy, có thể kết luận được rằng 20 dòng vi khuẩn được từ hệ tiêu hóa tôm thẻ chân trắng ở 4 huyện của tỉnh Kiên Giang là vi khuẩn *Bacillus* spp. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của NavinChandran *et al.* (2014) và Orozova *et al.* (2017) về đặc tính hình thái và sinh hóa của các dòng *Bacillus* spp.

**3.2 Đánh giá khả năng kháng khuẩn của các dòng *Bacillus* spp.**

Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của bacteriocin thô sản xuất bởi 20 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. đối với các dòng vi khuẩn kiểm định cho thấy có 11 trên tổng số 20 dòng vi khuẩn khảo sát thể hiện được khả năng đối kháng với các dòng vi khuẩn kiểm định ở những mức độ khác nhau (Bảng 1).

**Bảng 1: Khả năng kháng khuẩn của bacteriocin sản xuất bởi các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. đối với các dòng vi khuẩn kiểm định**

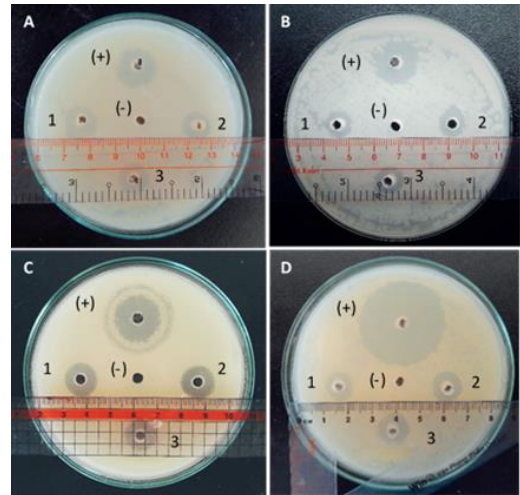
Dòng vi khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
AB4	6,8 <sup>bcd</sup>	-	-	-
AB8	7,3 <sup>bc</sup>	-	7,3 <sup>d</sup>	5,7 <sup>d</sup>
AM1	7,5 <sup>bc</sup>	-	-	-
AM2	7,3 <sup>bc</sup>	3,3 <sup>c</sup>	10,8 <sup>c</sup>	11,3 <sup>c</sup>
AM3	8,3 <sup>ab</sup>	-	9 <sup>cd</sup>	16,2 <sup>a</sup>
AM19	4,8 <sup>cde</sup>	-	14,5 <sup>b</sup>	13,2 <sup>bc</sup>
AM21	3,7 <sup>de</sup>	-	-	-
UM4	3,3 <sup>e</sup>	-	-	-
UM8	-	-	10,7 <sup>c</sup>	14,2 <sup>ab</sup>
VT11	8,7 <sup>ab</sup>	-	-	-
VT14	-	12,7 <sup>b</sup>	-	-
Đối chứng (+)	11 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>
Đối chứng (-)	-	-	-	-

Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Giữa các mẫu (các dòng vi khuẩn), trong cùng một cột, các giá trị trung bình có cùng chữ cái thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% theo kiểm định Tukey. Đối chứng dương (+): Ampicillin 5 mg/mL, đối chứng âm (-): nước cất vô trùng.

Kết quả cho thấy chỉ có dòng AM2 thể hiện khả năng đối kháng với cả 4 dòng vi khuẩn kiểm định, 3 dòng AM3, AB8 và AM19 có khả năng kháng đối với 3 dòng vi khuẩn kiểm định. Khả năng đối kháng

của các dòng vi khuẩn khảo sát đối với các vi khuẩn gây bệnh là do chúng có khả năng sản xuất bacteriocin. Bacteriocin có thể ức chế vi khuẩn Gram dương và Gram âm như các loài *Salmonella*

sp., *Escherichia coli*, *Vibrio* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp. và *Pseudomonas* sp. (Feliatra *et al.*, 2018). Bacteriocin được sản xuất bởi một số vi khuẩn nhất định, chúng thể hiện khả năng ức chế đáng kể đối với một số vi khuẩn khác kể cả những dòng kháng kháng sinh, ổn định, có phổ hoạt động rộng hay hẹp và mỗi loại bacteriocin chỉ tác động đến một số loài vi khuẩn nhất định (Cotter *et al.*, 2013). Vì vậy, những dòng *Bacillus* spp. sinh ra những loại bacteriocin có phổ kháng khuẩn rộng sẽ thể hiện được khả năng ức chế đối với nhiều dòng vi khuẩn khác nhau bao gồm cả Gram âm hoặc Gram dương, ngược lại, những dòng chỉ có khả năng sinh ra những loại bacteriocin có phổ tác động hẹp thì khả năng kháng khuẩn sẽ hạn chế hơn. Điều này giải thích cho khả năng đối kháng với nhiều dòng vi khuẩn kiểm định của các dòng AM2, AM3, AB8 và AM19. Trong khi đó, dòng VT14 chỉ thể hiện khả năng đối kháng đối với vi khuẩn Gram dương và cho giá trị vòng kháng khuẩn lớn nhất, điều này ngoài việc dòng VT14 có thể sinh ra một loại bacteriocin có phổ kháng khuẩn hẹp do chỉ tác động đối với vi khuẩn Gram dương, còn có thể do dòng này sinh ra các kháng sinh trong quá trình phát triển vì hầu hết các kháng sinh sản xuất bởi *Bacillus* sp. đều có hoạt động chống lại vi khuẩn Gram dương, mặc dù có những trường hợp ngoại lệ (Slepecky and Hemphill, 2006). Những dòng không thể hiện được khả năng đối kháng có thể do chúng không có khả năng sinh ra bacteriocin hoặc các dòng vi khuẩn kiểm định trong nghiên cứu này không phải là đối tượng tác động của những bacteriocin mà chúng sinh ra. Kannahi and Eshwari (2016) đã phân lập được 4 dòng vi khuẩn *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* và *B. cereus* từ đất và nước biển đều có khả năng ức chế các dòng vi sinh vật thử nghiệm *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* và *Enterobacter aerogenes*. Hoạt động ức chế *E. coli* cao nhất được ghi nhận ở *Bacillus subtilis* và thấp nhất ở *Bacillus pumilus*. Một nghiên cứu khác của Navin-Chandran *et al.* (2014) khi khảo sát các đặc tính probiotic của các dòng *Bacillus* spp. phân lập từ ruột tôm sú (*Penaeus monodon*) cho thấy trong 8 dòng *Bacillus* spp. phân lập được chỉ có dòng *B. cereus* có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao đồng thời thể hiện khả năng đối kháng với cả các dòng vi khuẩn kiểm định gồm *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis* và *Vibrio harveyi*.



**Hình 2: Khả năng kháng khuẩn của bacteriocin sản xuất bởi dòng AM2 đối với *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *Pseudomonas* sp. (C) và *Aeromonas* sp. (D)**

Ghi chú: Đối chứng dương (+): Ampicillin 5 mg/mL, đối chứng âm (-): nước cất vô trùng; Giếng 1, 2, 3: 3 lần lặp lại của mẫu dịch bacteriocin thử.

### 3.3 Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào của các dòng *Bacillus* spp.

Các vi sinh vật có khả năng tiết các enzyme ngoại bào để phân hủy các chất cặn bã, thức ăn thừa tồn đọng trong ao, hạn chế khả năng gây bệnh của các dòng vi khuẩn gây bệnh. Đồng thời, các enzyme này còn đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp thức ăn dễ hấp thu và vật nuôi tăng trưởng tốt. Do đó, khả năng sinh enzyme ngoại bào là một tiêu chí quan trọng khi chọn lọc các dòng vi khuẩn làm probiotic (Nguyễn Văn Phúc và Phan Thị Phương Trang, 2014). Vì vậy, 11 dòng vi khuẩn có khả năng kháng khuẩn từ thí nghiệm trên sẽ được tiến hành khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Các dòng vi khuẩn khác nhau có khả năng sinh ra các loại enzyme ngoại bào khác nhau phân giải các cơ chất tương ứng được bổ sung vào môi trường.

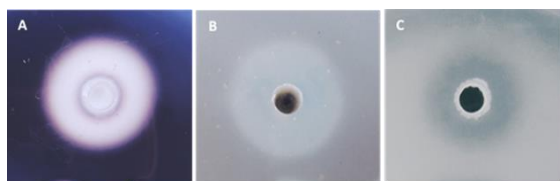
Bảng 2 cho thấy 11 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. đều có khả năng sinh ít nhất một loại enzyme ngoại bào gồm amylase, cellulase và protease. Trong đó, 8 dòng AB8, AM2, AM3, AM19, AM21, UM8, VT11 và VT14 có khả năng sinh cả 3 loại enzyme amylase, cellulase và protease. Theo Ngô Tự Thành và Bùi Việt Hà (2009) khi khảo sát hoạt tính enzyme ngoại bào của 236 dòng *Bacillus* phân lập từ các mẫu đất và nước thải khác nhau, chỉ có 2 dòng T20 và M27 thể hiện đầy đủ hoạt tính thủy phân các cơ

chất tinh bột, CMC và gelatin, trong khi các dòng còn lại chỉ biểu hiện khả năng thủy phân tinh bột và CMC. Theo một nghiên cứu khác của Lee *et al.* (2012) khi khảo sát tiềm năng probiotic của 4 dòng *Bacillus* spp. được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau, chỉ có dòng *Bacillus* sp. SM2 thể hiện đầy đủ hoạt tính enzyme amylase, cellulase và protease, trong khi ở 3 dòng còn lại chỉ có dòng *Bacillus* sp. T4 và *Bacillus* sp. JSP1 thể hiện hoạt tính protease và cả 3 dòng này đều không thể hiện hoạt tính cellulase. Ngoài ra, theo Ramesh *et al.* (2015) khi khảo sát tiềm năng probiotic của 2 dòng *Bacillus licheniformis* và *Bacillus pumilus* chọn lọc từ 26 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ ruột của cá trôi Ấn Độ, cả hai dòng đều thể hiện hoạt tính enzyme amylase, tuy nhiên chỉ có dòng *Bacillus licheniformis* thể hiện hoạt tính protease.

**Bảng 2: Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các dòng *Bacillus* spp.**

STT	Dòng	Amylase	Cellulase	Protease
1	AB4	+	+	-
2	AB8	+	+	+
3	AM1	+	-	+
4	AM2	+	+	+
5	AM3	+	+	+
6	AM19	+	+	+
7	AM21	+	+	+
8	UM4	+	-	+
9	UM8	+	+	+
10	VT11	+	+	+
11	VT14	+	+	+

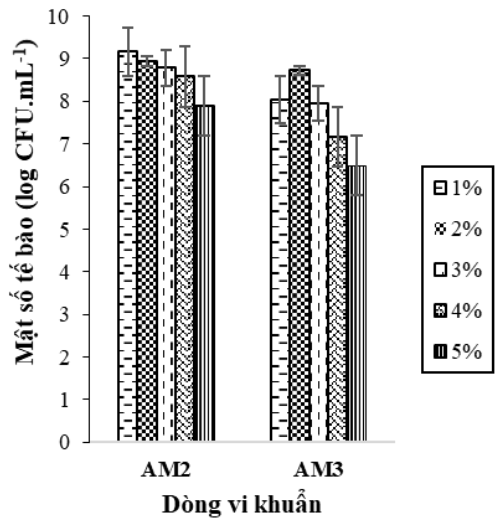
Ghi chú: (+) những dòng có khả năng sinh enzyme ngoại bào, (-) những dòng có khả năng sinh enzyme ngoại bào



**Hình 3: Khả năng sinh enzyme ngoại bào của dòng vi khuẩn AM2: amylase (A), cellulase (B) và protease (C)**

**3.4 Đánh giá khả năng chịu mặn của dòng AM2 và AM3**

Hai dòng vi khuẩn AM2 và AM3 thể hiện khả năng kháng khuẩn và sinh enzyme ngoại bào cao được tiến hành khảo sát khả năng chịu mặn, chịu pH sẽ được khảo sát khả năng sinh trưởng ở những nồng độ muối khác nhau để kiểm tra khả năng tương thích đối với môi trường nước nuôi tôm.



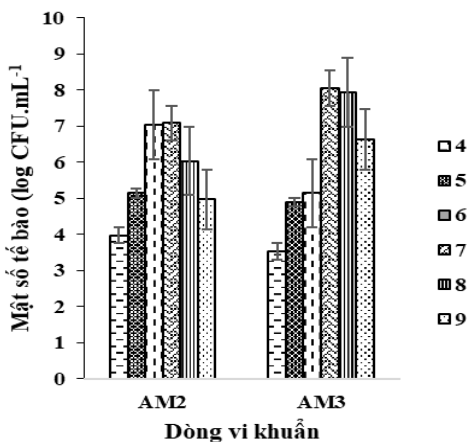
**Hình 4: Khả năng chịu mặn của dòng AM2 và AM3 sau 24 giờ nuôi cấy**

Hình 4 cho thấy cả 2 dòng vi khuẩn AM2 và AM3 đều có khả năng phát triển trong môi trường được bổ sung NaCl với nồng độ từ 1-5%, tuy nhiên chúng phát triển tốt nhất trong môi trường được bổ sung NaCl với các nồng độ từ 1-4%. Đồng thời, khả năng sinh trưởng của cả 2 dòng vi khuẩn đều giảm trong môi trường được bổ sung NaCl với nồng độ lớn hơn 4%. Khả năng hình thành bào tử là nguyên nhân quan trọng giúp *Bacillus* spp. có thể tồn tại trong môi trường có nồng độ muối cao. Tuy nhiên, nồng độ muối quá cao có thể gây ra sự mất nước và ức chế hoạt động của các tế bào (Zhang *et al.*, 2014). Hơn nữa, nồng độ muối càng tăng sẽ càng ức chế sự nảy mầm của bào tử *Bacillus* sp. vì độ mặn cao trì hoãn và tăng tính không đồng nhất trong giai đoạn đầu của sự nảy mầm, làm chậm động học nảy mầm của những bào tử riêng lẻ và toàn bộ bào tử (Nagler *et al.*, 2013). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Văn Phúc và Phan Thị Phương Trang (2014) khi khảo sát các đặc tính có lợi của 2 dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* BN1 và BD23.1 phân lập từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre, cả 2 dòng đều có khả năng sinh trưởng trong môi trường được bổ sung muối với các nồng độ từ 0-5%, trong đó chúng phát triển tốt nhất ở nồng độ muối từ 0-2%. Theo Franco *et al.* (2016), dòng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* CIGBC-232 phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) có khả năng sinh trưởng trong môi trường có nồng độ muối từ 2-7% và không sinh trưởng được trong môi trường có nồng độ muối 7,5%. Một nghiên cứu khác của Jesus *et al.* (2016) cũng cho thấy cả 2 dòng vi khuẩn *B. subtilis* B02 và

B03 phân lập từ cá Sơn (*Centropomus parallelus*) đều phát triển tốt trong môi trường được bổ sung 1,5% và 3% NaCl, tuy nhiên chúng phát triển tốt nhất trong môi trường được bổ sung 1,5% NaCl và mật số của cả 2 dòng đều giảm khi môi trường nuôi cấy được bổ sung 3% NaCl.

**3.5 Đánh giá khả năng chịu pH của dòng AM2 và AM3**

Hai dòng vi khuẩn AM2 và AM3 sẽ được khảo sát khả năng sinh trưởng ở những mức pH khác nhau để kiểm tra khả năng tương thích đối với môi trường nuôi thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng.



**Hình 5: Khả năng chịu pH của dòng AM2 và AM3 sau 24 giờ nuôi cấy**

Hình 5 cho thấy cả 2 dòng vi khuẩn AM2 và AM3 đều có khả năng phát triển trong môi trường có pH dao động từ 4-9, tuy nhiên ở giá trị pH dưới 5, khả năng sinh trưởng của cả 2 dòng đều giảm so với ở các giá trị pH còn lại. Khả năng sinh trưởng trong môi trường kiềm hoặc acid của vi khuẩn *Bacillus* spp. là do chúng có thể acid hóa hoặc kiềm hóa tế bào chất so với môi trường bên ngoài để duy trì độ pH tế bào chất tương thích với tính toàn vẹn cấu trúc và chức năng tối ưu của các protein tế bào chất hỗ trợ sự tăng trưởng (Padan et al., 2005). Hơn nữa, các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng tạo bào tử, các bào tử này như một phương tiện để tồn tại những điều kiện môi trường khắc nghiệt cho phép chúng sinh trưởng và tồn tại lâu dài (Nicholson et al., 2000). Ngoài ra, một số loài *Bacillus* spp. còn có khả năng tạo biofilm, tạo điều kiện cho sự sống còn của vi khuẩn trong môi trường có pH cao, nghèo dinh dưỡng hoặc các điều kiện bất lợi khác của môi trường (Gingichashvili et al., 2017). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Sánchez-Ortiz et al. (2015) khi khảo sát khả năng sinh trưởng của các

dòng vi khuẩn phân lập từ sò huyết (*Anadara tuberculosa*) trong môi trường có pH thay đổi từ 4-10, ở mức pH dưới 5 khả năng sinh trưởng của tất cả các dòng *Bacillus* phân lập được gồm *B. licheniformis* Mat32, *B. licheniformis* Mat42, *B. subtilis* Mat43 và *B. subtilis subtilis* GAtB1 đều giảm, đồng thời các dòng này phát triển tốt ở pH từ 6-8. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Mitra et al. (2014) khi khảo sát khả năng sinh trưởng của 3 dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* phân lập từ ruột của ấu trùng cá Thát Lát (*Chitala chitala*) cho thấy cả 3 dòng đều có khả năng phát triển trong môi trường có pH từ 4-10, tuy nhiên chúng phát triển tốt nhất ở pH từ 8-10. Một nghiên cứu khác của Wu et al. (2014) khi khảo sát đặc tính probiotic của 3 dòng vi khuẩn *B. subtilis*, *B. pumilus* BP, *Bacillus* HL7 phân lập từ cua biển (*Scylla paramamosain*) cũng cho thấy cả 3 dòng vi khuẩn đều không thể sinh trưởng ở pH dưới 2 và có khả năng sinh trưởng ở mức pH từ 3-7,4, trong đó cả 3 dòng phát triển tốt nhất ở pH 7,4 với mật số trung bình từ 6,48 - 6,72 logCFU.mL<sup>-1</sup>.

**3.6 Kết quả định danh các dòng vi khuẩn chọn lọc được bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA**

Từ các thử nghiệm khả năng kháng khuẩn và sinh enzyme ngoại bào, chịu mặn, chịu pH, tuyển chọn hai dòng vi khuẩn AM2 và AM3 được gửi đi giải trình tự. Kết quả so sánh trình tự vùng gen 16S rRNA của dòng AM2 và AM3 với các trình tự trên cơ sở dữ liệu của NCBI cho thấy dòng vi khuẩn AM2 tương đồng 99% với *Bacillus subtilis* và dòng AM3 tương đồng 99% với dòng *Bacillus cereus* đã được đăng ký trên GenBank với mã số lần lượt là MN907469 và MN907471.

**4 KẾT LUẬN**

Nghiên cứu đã phân lập được 20 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. từ hệ tiêu hóa của các mẫu tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở các ao nuôi tôm thuộc địa bàn tỉnh Kiên Giang. Trong đó, có 11 trong tổng số 20 dòng thể hiện khả năng đối kháng với ít nhất 1 dòng vi khuẩn kiểm định gồm *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., đồng thời cả 11 dòng đều có khả năng sinh ít nhất 1 loại enzyme ngoại bào gồm amylase, cellulase và protease. Dòng AM2 và AM3 thể hiện khả năng kháng khuẩn và sinh enzyme ngoại bào cao được tiến hành khảo sát khả năng chịu mặn, chịu pH. Kết quả cho thấy cả 2 dòng đều có khả năng phát triển trong môi trường được bổ sung nồng độ muối từ 1-5% và pH từ 4-9. Qua đó có thể thấy cả 2 dòng vi khuẩn đều có các

đặc tính và tiềm năng để làm nguồn nguyên liệu sản xuất các chế phẩm probiotic ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản nói chung và trong nuôi tôm nói riêng. Kết quả giải trình tự bằng phương pháp 16S rRNA kết hợp với các đặc điểm hình thái học và các đặc điểm sinh hóa cho thấy 2 dòng AM2 và AM3 tương đồng 99% với *Bacillus subtilis* và *Bacillus cereus* rRNA đã được đăng ký trên GenBank với mã số lần lượt là MN907469 và MN907471.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J. L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 11(3-4): 173-186.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C., 2013. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2): 95-105.
- Cutting, S. M., 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2): 214-220.
- Feliatra, F., Muchlisin, Z. A., Teruna, H. Y., Utamy, W. R., Nursyirwani, N. and Dahliaty, A., 2018. Potential of bacteriocins produced by probiotic bacteria isolated from tiger shrimp and prawns as antibacterial to *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Aeromonas* species on fish. *F1000 Research*, 7:415, 18 pages.
- Franco, R., Mart, L., Arenal, A., et al., 2016. Evaluation of two probiotics used during farm production of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture Research*, 48(4): 1936-1950.
- Gingichashvili, S., Duanis-Assaf, D., Shemesh, M., Featherstone, J. D. B., Feuerstein, O. and Steinberg, D., 2017. *Bacillus subtilis* Biofilm Development - A computerized study of morphology and kinetics. *Frontier Microbiology*, 8: 2072. doi: 10.3389/fmicb.2017.02072..
- Hoben, H. and Somasegaran, P., 1982. Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(5): 1246-1247
- Holt, J. H., Sneath, P. H. and Krieg, N. R., 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology* 9<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams and Wilkins, New York, 192-194.
- Jesus, E. C., Arpini, C. M., Martins, J. D. L., et al., 2016. Isolation and evaluation of autochthonous *Bacillus subtilis* strains as probiotics for fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). *Journal of Applied Ichthyology*, 32(4): 682-686.
- Kakou, A. C., Kambire, O., Boli, Z. B. A., Yoro, T. D., Koffi, N. R. and Koussemon, M., 2017. Diversity and enzymatic characterization of *Bacillus* species isolated from traditional cassava starters used for attiéké production. *J. Biol. Chem. Sci*, 11(2): 531-540.
- Kannahi, M. and Eshwari, N. T., 2016. Extraction, purification and antibacterial activity of bioactive compounds from marine *Bacillus* species. *International Journal of Pure Applied Bioscience*, 4(4): 244-254.
- Lee S., Lee J., Jin, Y. I., Jeong J. C., Chang Y. H., Lee Y., Kim, M. 2017. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. *LWT-Food Science and Technology*, 79: 581-524.
- Lee, J., Park, I., Choi, Y. and Cho, J., 2012. *Bacillus* strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25: 577-585.
- Mitra A., Mukhopadhyay, P.K. and Homechaudhuri, S., 2014. Understanding probiotic potentials of *Bacillus* bacterial population isolated from *Chitala chitala* (osteoglossiformes; notopteridae) by comparing the enzyme activity in vitro. *International Journal of Pure and Applied Zoology*, 2(2): 120-127.
- Nagler, K., Setlow, P., Li, Y. Q. and Moellera, R., 2013. High salinity alters the germination behavior of *Bacillus subtilis* spores with nutrient and nonnutrient germinants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4): 1314-1321.
- NavinChandran, M., Iyapparaj, P., Moovendhan, S. et al., 2014. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1): 38-45.
- Ngô Tự Thành và Bùi Thị Việt Hà, 2009. Nghiên cứu hoạt tính enzyme ngoại bào của một số dòng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa Tự nhiên và Công nghệ*, 25: 101-106.
- Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Văn Tỵ và Dương Đức Tiến, 1975. *Vi sinh vật học*, NXB Đại Học và Trung Học Chuyên Nghiệp tập 1, 219 trang.
- Nguyễn Trọng Nghĩa, Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quốc Phú và Phạm Anh Tuấn, 2015. Phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ tôm nuôi ở Bạc Liêu. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 39: 99-107.
- Nguyễn Văn Hào, 2004. Hướng dẫn quản lý chất lượng nước trong ao nuôi tôm sú, Bộ Thủy sản.
- Nguyễn Văn Phúc và Phan Thị Phương Trang, 2014. Phân lập, định danh và xác định các đặc tính có lợi của dòng *Bacillus* spp. từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre. *Tạp chí Khoa Học ĐHSP TPHCM*, 64: 94-102.



- Nicholson, W. J., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. and Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64(3): 548-572.
- Orozova P., Sirakov, I. , Austin, D. A. and Austin, B., 2017. Recovery of *Bacillus mycoides*, *B. pseudomycoides* and *Aeromonas hydrophila* from common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with gill disease. *Journal of Fish Diseases*, 41(1): 125-129.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M. and Krulwich, T. A., 2005. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta* 1717(2): 67-88.
- Phạm Thị Tuyết Ngân và Trương Quốc Phú, 2010. Biến động các yếu tố môi trường trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) thâm canh tại Sóc Trăng. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 15a: 179-188.
- Ramesh, D., Vinothkanna, A., Rai, A. K. and 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: 268-276.
- Sánchez-Ortiz, A. C., Luna-González, A., Campa-Córdova, A. I., Escamilla-Montes, R. Flores-Miranda, M. C. and Mazón-Suástegui, J. M., 2015. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(1): 123-136.
- Senthilraj, R., Prasad, G. S. and Janakiraman, K., 2016. Sequence-based identification of microbial contaminants in non-parenteral products. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(2): 329-336.
- 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, Trường Đại học Sư Phạm Thành phố Hồ Chí Minh.
- Trần Vũ Đình Nguyên, Nguyễn Văn Duy và Vũ Ngọc Bội, 2014. Hoạt tính probiotic, đặc điểm phân loại và điều kiện nuôi thích hợp của chủng *Bacillus pumilus* B3.10.2 phân lập từ tôm hùm bông. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 1: 177-183.
- Wu, H. J., Sun, L. B., Li, C. B., *et al.*, 2014. Enhancement of the immune response and protection against *Vibrio parahaemolyticus* by indigenous probiotic *Bacillus* strains in mud crab (*Scylla paramamosain*). *Fish & Shellfish Immunology*, 41: 156-162.
- Zhang, X., Gao, J., Zhao, F., Zhao, Y. and Li, Z., 2014. Characterization of a salt-tolerant bacterium *Bacillus* sp. from a membrane bioreactor for saline wastewater treatment. *Journal of Environmental Sciences*, 26(6): 1369-1374.
- Zokaefar, H., Balcázar, J. L., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A. and Saad, C. R., 2012. Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens. *The Journal of Antibiotics*, 65(6): 289-294.