



DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.041

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

Võ Hồng Phượng^{1*}, Võ Thị Hậu³, Nguyễn Thái Hồng Ngọc², Lê Hồng Phước¹, Nguyễn Hoàng Tuấn², Nguyễn Hồng Lộc¹ và Lê Thị Bích Thủy⁴

¹Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 2

²Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Trường Trung cấp Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Võ Hồng Phượng (email: vohongphuong@yahoo.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 19/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

Title:

Evaluation of antagonism properties of *Bacillus licheniformis* (B1) against *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) on shrimp in-vitro condition

Từ khóa:

AHPND, *Bacillus licheniformis* (B1), đồng nuôi cấy, vòng kháng khuẩn

Keywords:

AHPND, *Bacillus licheniformis* (B1), co-culture, inhibition zone

ABSTRACT

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), also called early mortality syndrome (EMS), is a recently emergent shrimp bacterial disease. The causative agent of AHPND is specific strain *Vibrio parahaemolyticus*, and it severely damaged the intensive and semi-intensive shrimp farming systems. The bacterial strain *Bacillus licheniformis* (B1) isolated from the intestine of *Mugil Cephalus* in nature showed the antagonistic properties against pathogenic strain of *V. parahaemolyticus* with 15 mm inhibition zone during 24 hours. In addition, the anti-*V. parahaemolyticus* activity tested by co-cultured method demonstrated that the concentrations of strain B1 (10^5 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, 10^7 CFU/mL) might completely inhibit *V. parahaemolyticus* (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/mL) after nine hours of co-culture and this inhibition activity of the strain B1 was stable up to 24 hours.

TÓM TẮT

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND – acute hepatopancreatic necrosis disease) hay bệnh chết sớm EMS (early mortality syndrome) được phát hiện là bệnh do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra và gây thiệt hại lớn đối với mô hình nuôi tôm thâm canh và bán thâm canh. Chúng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* (B1) được phân lập từ ruột cá Đồi (*Mugil cephalus*) trong tự nhiên có khả năng đối kháng tốt với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với vòng kháng khuẩn 15 mm trong thời gian 24 giờ. Ngoài ra, khả năng kháng *V. parahaemolyticus* được thử nghiệm bằng phương pháp đồng nuôi cấy (co-culture) cho thấy chủng B1 (nồng độ 10^5 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, 10^7 CFU/mL) có khả năng ức chế hoàn toàn *V. parahaemolyticus* (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/mL) sau thời gian chín giờ và đặc tính này ổn định trong 24 giờ khảo sát.

Trích dẫn: Võ Hồng Phượng, Võ Thị Hậu, Nguyễn Thái Hồng Ngọc, Lê Hồng Phước, Nguyễn Hoàng Tuấn, Nguyễn Hồng Lộc và Lê Thị Bích Thủy, 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(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 91-100.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) được xem là bệnh gây nhiều thiệt hại đến sản lượng tôm nuôi trong những năm gần đây ở các nước Đông Nam Á và Mexico (Eduardo *et al.*, 2012; Panakorn, 2012; The Fish Site, 2013). Ở Việt Nam, dịch bệnh ảnh hưởng đến sản lượng tôm nuôi ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long như: Tiền Giang, Bến Tre, Kiên Giang, Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau (Đặng Thị Hoàng Oanh và *ctv.*, 2012). Tác nhân gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp tính được chứng minh là vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có chứa plasmid pVPA3-1 và mang hai gen gây độc PirA và PirB (Lightner *et al.*, 2014). Hiện nay, nhiều biện pháp được đề xuất để ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp như: dùng hóa chất diệt khuẩn, sử dụng kháng sinh hợp lý, áp dụng các biện pháp sinh học và xây dựng mô hình nuôi tôm để giảm thiểu bệnh. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, hai loại kháng sinh doxycycline, oxytetracycline có hiệu quả trong phòng trị bệnh gan tụy cấp (Lê Hồng Phước và *ctv.*, 2017). Tuy nhiên, kết quả kháng sinh đồ 47 chủng *V. parahaemolyticus* (AHPND) trên 13 loại kháng sinh cho thấy có đến 96% số chủng phát hiện kháng với ít nhất một loại kháng sinh và 70% số chủng có hiện tượng đa kháng thuốc (Lê Hồng Phước và *ctv.*, 2017). Mặt khác, kết quả nghiên cứu quy trình sử dụng chế phẩm vi sinh, bổ sung các chất kháng khuẩn và các chất kích thích hệ miễn dịch (vitamin C, β -glucan, mannan oligosaccharides (MOS)) cũng mang lại hiệu quả tốt khi sử dụng định kỳ 3 ngày/lần. Chế phẩm sinh học đối kháng với *V. parahaemolyticus* là một chiến lược thay thế cho thuốc kháng sinh và xu hướng chung để kiểm soát tác nhân gây bệnh thực phẩm *V. parahaemolyticus* (Aranda *et al.*, 2012; Touraki *et al.*, 2012). Sử dụng chế phẩm probiotic mang lại rất nhiều lợi ích cho vật nuôi như hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, cân bằng hệ vi sinh đường ruột bằng cách cạnh tranh với vi khuẩn gây bệnh (Kabir, 2009), do đó giảm chi phí trong phòng bệnh và tăng năng suất cho vật nuôi (Reuter, 2001). Tác dụng chế phẩm sinh học trên vi khuẩn gây bệnh thủy sản chủ yếu là được thể hiện như sau: loại trừ cạnh tranh (các vị trí liên kết, dinh dưỡng, năng lượng và chất mang sắt), tăng cường tiêu hóa trong hệ thống vật chủ, sản xuất kháng sinh hoạt động, tăng cường miễn dịch không đặc hiệu, cải thiện chất lượng nước (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). Tại Việt Nam, *Bacillus* là nhóm vi khuẩn được sử dụng phổ biến bởi các đặc tính như: có khả năng cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh qua cơ chế miễn dịch, cạnh tranh vị trí bám dính và sản sinh ra chất kháng khuẩn (bacteriocins). Hơn nữa, *Bacillus* còn được sử dụng nhiều bởi vì giá thành thấp, dễ pha trộn, chịu

được tác động nhiệt tốt trong quá trình sản xuất, dễ bảo quản, hạn sử dụng dài (Barbosa *et al.*, 2005). Trong nghiên cứu về các loài vi khuẩn hữu ích thì có một số dòng vi khuẩn tiết ra chất ức chế để kháng lại với vi khuẩn như Nguyễn Văn Phúc và *ctv.* (2014) đã phân lập được hai chủng có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* và sinh enzyme mạnh đã được định danh và phân nhóm thuộc *B. subtilis*. Bên cạnh đó, *B. subtilis* BT23 có thể kiểm soát vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* spp. đối với tôm sú (Verschuere *et al.*, 2003). Sản phẩm probiotic được sử dụng ngày nay ở dạng sinh bào tử, thì hầu hết thuộc chi *Bacillus* (Hong *et al.*, 2005). Trong số 80 chủng vi khuẩn phân lập từ tôm hoang dã, *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 và *Bacillus* P64 cho thấy tác dụng ức chế chống lại *V. harveyi* (S2) lần lượt là 54%, 19% và 34%. Hơn nữa, *Bacillus* P64 thể hiện đặc tính của một probiotic và hoạt tính kích thích miễn dịch, trong khi *Vibrio* P62 chỉ cho thấy tính chất probiotic tốt (Gullian *et al.*, 2004). Bào tử *Bacillus* đã được sử dụng như là tác nhân sinh học để giảm sự phát triển của *Vibrio* trong các cơ sở nuôi tôm (Skjermo and Vadstein, 1999; Rengpipat *et al.*, 2000). *Bacillus* spp. cũng thường được sử dụng cho việc đối kháng với các sinh vật khác như các sinh vật gây bệnh trên cá và động vật có vỏ (Gatesoupe, 1999; Rengpipat *et al.*, 2000). *Bacillus fusiformis* giúp cải thiện sự sống và tăng khả năng phát triển của tôm thẻ chân trắng và tôm sú (Guo *et al.*, 2009). Tuy nhiên, chủng loại hệ vi sinh vật, tính ổn định và đặc tính đối kháng với AHPND của vi sinh vật trong sản phẩm probiotic nghiên cứu còn hạn chế. Vì vậy, việc tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng và tôm sú là cần thiết nhằm góp phần đa dạng hóa chủng giống cũng như đặc tính kháng AHPND trong sản phẩm probiotic.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Vi khuẩn gây AHPND *V. parahaemolyticus* được cung cấp trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu quy trình sử dụng kháng sinh hợp lý trong phòng trị bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi nước lợ Việt Nam” thuộc Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II.

2.2 Phương pháp phân lập chủng vi khuẩn *Bacillus*

Mẫu ruột cá Đồi (*Mugil cephalus*) được tăng sinh trong môi trường dinh dưỡng BHIB (Brain heart infusion broth) bổ sung 1,5% NaCl (BHIB+) trong 24 - 48 giờ, được gia nhiệt trong tủ ủ nhiệt 45 - 50°C trong thời gian 15 phút. Sau đó, mẫu được pha loãng theo hệ số pha loãng 10 và tiến hành cấy trên môi trường Difco nutrient agar (DSM+) và

ủ ở 37°C trong 24 - 48 giờ. Khuẩn lạc trên DSM+ được giữ lại ở -70°C với 40% Glycerol.

2.3 Phương pháp định danh vi khuẩn

Bacillus

Để xác định các chủng vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, một số thử nghiệm cho sàng lọc bước đầu được thực hiện như: nhuộm Gram, quan sát hình thái tế bào, nhuộm bào tử, thử nghiệm catalase, thử nghiệm oxidase (Trần Linh Thuốc, 2010).

Phương pháp định danh sinh hóa: Sử dụng test kit API 20 E, API50 CHB (BioMerieux, Marcy l'Etoile), và phần mềm định danh Apiweb theo hướng dẫn nhà sản xuất.

Phương pháp định danh giải trình tự 16S rRNA: Tách chiết bộ gen vi khuẩn bằng bộ kit của QIAGEN, khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Selvakumaran *et al.*, 2008). Trình tự RNA được phân tích thông qua phần mềm BioEdit và BLAST trên ngân hàng gen để xác định sự tương đồng các loài trên ngân hàng Genbank. Cây di truyền được xây dựng bằng khoảng cách đoạn DNA nối tiếp để xác định khoảng cách di truyền giữa các chủng bằng phần mềm Mega 6.0.

2.4 Phương pháp khảo sát đặc tính của chủng B1

2.4.1 Khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Khảo sát khả năng đối kháng bằng phương pháp khuếch tán đĩa

Thực hiện theo phương pháp của Vaseeharan and Ramsamy (2003) có điều chỉnh như sau: Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và vi khuẩn B1 được hoạt hóa trong môi trường BHIB+ ủ ở 37°C trong 20 - 24 giờ để đạt đến mật độ 10⁷ CFU/mL. Tiến hành bơm 100 µL dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* lên đĩa BHIA+ và dùng que trải đều. Sau đó, tiến hành đục lỗ đường kính 6 mm trên đĩa thạch và bơm 10 µL dịch vi khuẩn B1. Sau đó đem ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khả năng đối kháng được đo bằng đường kính vòng kháng khuẩn, đánh giá khả năng đối kháng theo Sumathi and Reetha (2012). Mỗi lần thử nghiệm 2 lần lặp lại.

Khảo sát khả năng đối kháng bằng phương pháp đồng nuôi cấy

Chuẩn bị vi khuẩn B1: chọn một khuẩn lạc B1 tăng sinh trong 150 mL môi trường BHIB+ trong 24 giờ. Sau đó, đo OD₆₀₀ xác định mật độ vi khuẩn theo đường cong y = (7,25 x OD₆₀₀-2,2) x 10⁸ tế bào/mL. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus*: chọn một khuẩn lạc

được hoạt hóa trong 150 ml môi trường BHIB+ trong 3 - 4 giờ đo OD₆₀₀ với 1 OD = 5,58 x 10⁸ tế bào/mL.

Chủng vi khuẩn B1 được chuyển qua các erlen 50 mL BHIB+ có chứa *V. parahaemolyticus* các nồng độ theo Bảng 1. Thử nghiệm được khảo sát tốc độ lặn 150 vòng/phút, ở 28°C trong 24 giờ. Mỗi nghiệm thức lặp lại hai lần. Mỗi ba giờ lấy mẫu ở các nghiệm thức trải trên môi trường TCBS (Thiosulphate citrate bile sucrose agar) kiểm tra hiện diện *V. parahaemolyticus* và ISP4 (Inorganic satl starch agar) để kiểm tra mật độ B1.

Bảng 1: Thiết kế thí nghiệm đồng nuôi cấy B1 và *V. parahaemolyticus*

Nghiệm thức	Nồng độ B1 (CFU/mL)	Nồng độ VP (CFU/mL)
1	10 ⁵	10 ⁴
		10 ⁵
2	10 ⁶	10 ⁴
		10 ⁵
3	10 ⁷	10 ⁵
		10 ⁶
VP đối chứng	-	10 ⁷
		10 ⁴
		10 ⁵
		10 ⁶
B1 đối chứng	10 ⁷	10 ⁷
		10 ⁵
		-

Ghi chú: VP: *V. parahaemolyticus*; B1: Chủng vi khuẩn *Bacillus* khảo sát

2.4.2 Tính nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn

Dịch vi khuẩn B1 sau khi nuôi cấy 18 giờ có mật độ tương đương 10⁸ CFU/ mL. Sau đó, bơm 100 µL dịch vi khuẩn phân tán đều trên bề mặt môi trường Muller Hinton Agar (MHA, Meck) bổ sung NaCl 2%. Đĩa kháng sinh (Oxoid, England) được đặt lên mặt thạch và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Độ nhạy với kháng sinh của B1 được đánh giá theo tiêu chuẩn của CLSI (2012).

2.4.3 Khả năng sinh enzyme ngoại bào và chịu được độ muối, pH

Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào theo phương pháp Harley *et al.* (2001) có cải tiến như sau: Tế bào của chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường BHIB+ ở 37°C trong 24 giờ, dịch *Bacillus* sau 24 giờ cấy nhỏ giọt lên đĩa môi trường BHIA+ có bổ sung từng loại cơ chất: 0,5% CMC (Carboxy Methyl Cellulose), 1% tinh bột, 1% gelatin, 1% casein và Tween 20, 0,01% CaCl₂ tương ứng cho khảo sát khả năng sinh các enzyme

cellulase, amylase, protease và lipase. Ủ các đĩa khảo sát ở 37°C 24 giờ và quan sát vòng phân giải trên đĩa.

Khả năng chịu pH: cấy chủng B1 được trong môi trường BHIB+ được điều chỉnh pH bằng HCl và NaOH theo các giá trị pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Nuôi cấy lác ở 37°C, đo OD_{600 nm} để xác định mật độ vi khuẩn sau 24 giờ.

Khả năng chịu mặn: cấy các chủng B1 được trong môi trường BHIB+ với các nồng độ: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5%. Nuôi cấy lác ở 37°C, đo OD_{600 nm} để xác định mật độ vi khuẩn sau 24 giờ. (Arici *et al.*, 2004).

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

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

3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Phân lập và định danh chủng B1

3.1.1 Kết quả đặc điểm hình thái, sinh hóa chủng vi khuẩn B1

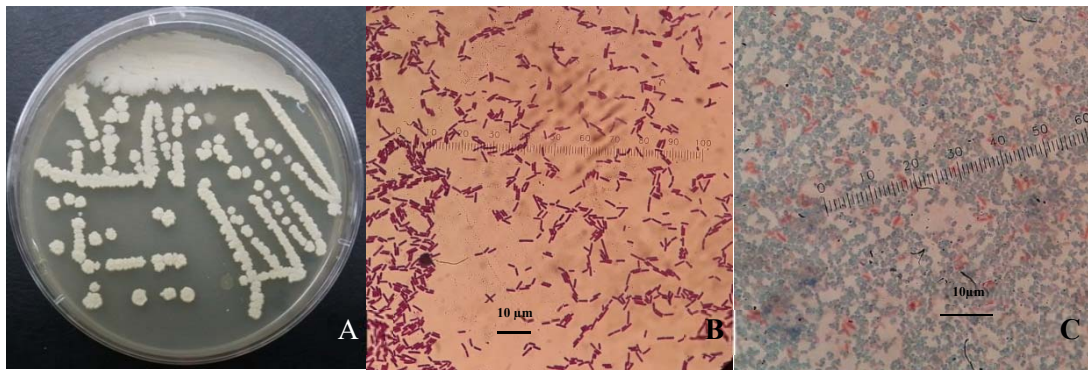
Hình thái khuẩn lạc của chủng B1 có màu trắng sữa, kích thước khuẩn lạc 2-3 mm, bề mặt khuẩn lạc xù xì trên môi trường BHIA sau 24 giờ (Hình 1). Quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100x cho thấy B1 là vi khuẩn Gram dương, hình que đứng riêng rẽ hoặc nối dài thành sợi. Ngoài ra, chủng B1 có khả năng sinh bào tử sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường thạch BHIA+ (Hình 1C).

Dựa vào các đặc điểm về nguồn gốc nuôi cấy, hình thái khuẩn lạc, kết quả nhuộm Gram, các phản ứng về sinh lý, test kit sinh hóa (20E và 50 CHB) của vi khuẩn cho thấy chủng vi khuẩn B1 là *Bacillus licheniformis* (98.6%) (Bảng 2).

Bảng 2: Kết quả sinh hóa của B1 theo hệ thống API

Hệ thống test	STT	Phản ứng	Kết quả	STT	Phản ứng	Kết quả
API 20E	1	Enzym β-galactosidase	-	7	Thủy phân Ure	+
	2	Axit amin Arginine	+	8	Emzyme Tryptophan deaminase	-
	3	Lysine	-	9	Indol	-
	4	Ornithine	-	10	VP (Voges-Proskauer)	+
	5	Biến dưỡng citrate	+	11	Enzym Gelatinase	+
	6	H ₂ S	-	12	Khử Nitrate	-
API 50CHB	0	Đổi chứng	-	25	Esculin	+
	1	Glycerol	+	26	Salicin	+
	2	Erythritol	-	27	D(+)-Trehalose	+
	3	D(-)-Arbinose	-	28	Maltose	+
	4	L(+)-Arbinose	+	29	Lactose	+
	5	Ribose	+	30	D(+)-Melezitose	+
	6	D(+)-Xylose	+	31	Saccharose	+
	7	L(-)-Xylose	-	32	D(-)-Rafinose	+
	8	Adonitol	-	33	Inulin	-
	9	Methy xyloside	-	34	D(+)-Melezitose	-
	10	Galactose	+	35	D(+)-Raffinose	+
	11	D(+)-Glucose	+	36	Amidon	+
	12	D(-)-Fructose	+	37	Glycogen	+
	13	D(+)-Mannose	+	38	Xylitol	-
	14	L(-)-Sorbose	-	39	Gentibise	+
	15	Rhamanose	-	40	D-Turanose	+
	16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
	17	Meso-Inositol	+	42	D-Tagatose	-
	18	Mannitol	+	43	D-Fucose	-
	19	Sorbitol	+	44	L-Fucose	-
	20	Methyl-D-glucoside	-	45	D-arabitol	-
	21	Methyl-D-glucosamine	+	46	L-arabitol	-
	22	N-acetyl-glucosamine	-	47	Potassium gluconate	-
	23	Amygdalin	+	48	Potassium 2 - ketogluconate	-
24	Arbutin	+	49	Potassium 5 -ketagluconate	-	

Ghi chú: (-): phản ứng không xảy ra; (+): có xảy ra phản ứng

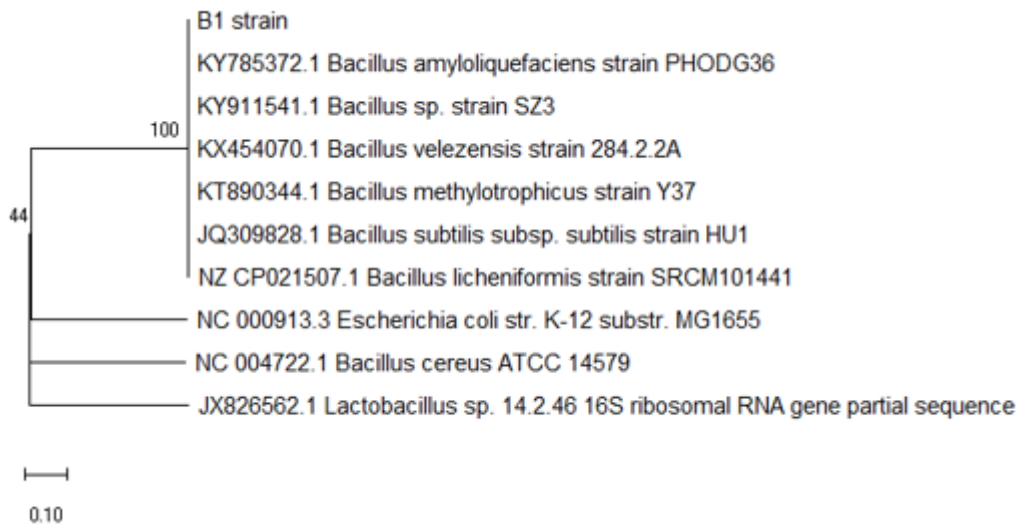


Hình 1: Hình thái vi khuẩn B1; (A) Hình thái khuẩn lạc; (B) Hình thái tế bào; (C) Hình dạng bào tử

3.1.2 Định danh bằng phương pháp giải trình tự 16s rRNA

Độ dài của chuỗi gen 16S rRNA của chủng B1 là khoảng 1500 cặp base như được phát hiện khi điện di trên gel agarose 2% (dữ liệu không hiển thị). Dựa trên cây phả hệ, phần trăm tại các nút cho thấy

các nhóm liên kết được nhóm lại với nhau và được lặp lại 1.000 lần (bootstrap). Ngoài ra, dựa vào cây phả hệ cho thấy dòng probiotic B1 có liên quan chặt chẽ với các chủng *Bacillus* spp. như: *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. methylotrophicus* và *B. subtilis*.

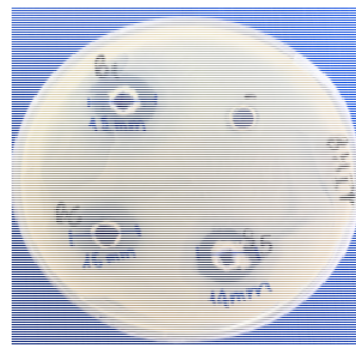


Hình 2: Cây di truyền chỉ vị trí B1 và mô tả mối liên quan giữa các loài với B1 dựa trên giải trình tự 16s rRNA

3.2 Khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

3.2.1 Khả năng đối kháng bằng phương pháp khuếch tán đĩa

Chủng B1 có khả năng đối kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với vòng kháng khuẩn 15 mm từ thời điểm 12 giờ và vòng kháng được ổn định đến 48 giờ (Hình 3).



Hình 3: Kết quả đối kháng của B1 với *V. parahaemolyticus*

3.2.2 Khả năng đối kháng của B1 bằng phương pháp đồng nuôi cấy

Nhìn chung sự phát triển hay kìm hãm tác nhân gây AHPND phụ thuộc vào mật độ ban đầu *V. parahaemolyticus* và vi khuẩn B1. Mật độ B1 10⁵ CFU/mL và *V. parahaemolyticus* (VP) ở nghiệm thức (NT) 10⁴, 10⁵ CFU/mL (Bảng 3) đều có xu hướng tăng trong ba giờ đầu với mật độ trung bình 6,68 ± 4,40 x 10⁵ CFU/ mL và 4,57 ± 1,55 x 10⁷ CFU/mL và thấp hơn mật độ VP 10⁵ CFU/mL đối chứng (ĐC) (p < 0,05). Tuy nhiên, từ thời điểm sáu giờ trở đi thì mật độ *V. parahaemolyticus* ở NT VP-10⁴ CFU/mL và NT VP-10⁵ CFU/ mL có xu hướng giảm dần đạt mật độ 2,09 ± 1,13 x 10⁴ CFU/mL và 1,19 ± 0,23 x 10⁶ CFU/mL, theo thứ tự trên. Thời

điểm sau chín giờ, NT VP-10⁴ CFU/mL không phát hiện sự hiện diện *V. parahaemolyticus* (0,00 ± 0,00 CFU/mL) và mật độ *V. parahaemolyticus* NT VP-10⁵ CFU/mL là 1,67 ± 0,02 x 10⁴ CFU/mL đều khác biệt hoàn toàn so với NT ĐC-VP-10⁴ CFU/mL và NT ĐC-VP-10⁵ CFU/mL (p < 0,05), theo thứ tự trên. Thời điểm sau 12 giờ, vi khuẩn *V. parahaemolyticus* NT VP- 10⁵ CFU/mL bị ức chế hoàn toàn (0,00 ± 0,00 CFU/mL) và khác biệt hoàn toàn với NT ĐC VP-10⁵ CFU/mL (p < 0,05). Bên cạnh đó, mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* NT đối chứng VP-10⁴ CFU/mL và VP - 10⁵ CFU/mL có xu hướng tăng tại các thời điểm khảo sát nhưng giảm từ 21 giờ trở đi và mật độ *V. parahaemolyticus* ở cả hai NT sau 24 giờ là 3,90 ± 0,14 x 10⁹ CFU/mL và 4,41 ± 0,19 x 10⁹ CFU/mL.

Bảng 3: Mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* các nghiệm thức đồng nuôi cấy với B1 (10⁵ CFU/mL)

Thời điểm khảo sát (giờ)	Mật độ <i>V. parahaemolyticus</i> (CFU/mL) các nghiệm thức			
	B1 10 ⁵ CFU/mL và VP-10 ⁴ CFU/mL	ĐC VP-10 ⁴ CFU/mL	B1 10 ⁵ CFU/mL và VP-10 ⁵ CFU/mL	ĐC VP-10 ⁵ CFU/mL
3 giờ	6,68 ± 4,40 x 10 ⁵ a	9,07 ± 0,32x 10 ⁶ a	4,57 ± 1,55 x 10 ⁷ a	2,02 ± 0,37 x 10 ⁸ b
6 giờ	2,09 ± 1,13 x 10 ⁴ a	2,28 ± 0,76 x 10 ⁹ b	1,19 ± 0,23 x 10 ⁶ a	2,54 ± 0,27x 10 ⁹ b
9 giờ	0,00 ± 0,00 a	2,40 ± 0,56 x 10 ⁹ b	1,67 ± 0,02 x 10 ⁴ a	3,68 ± 1,01 x 10 ⁹ b
12 giờ	0,00 ± 0,00 a	5,80 ± 0,98 x 10 ⁹ b	20,00 ± 0,00 a	4,40 ± 0,70 x 10 ⁹ b
15 giờ	0,00 ± 0,00 a	6,92 ± 0,81x 10 ⁹ b	0,00 ± 0,00 a	4,68 ± 0,36x 10 ⁹ b
18 giờ	0,00 ± 0,00 a	1,21 ± 0,27 x 10 ¹⁰ b	0,00 ± 0,00 a	7,70 ± 0,11x 10 ⁹ b
21 giờ	0,00 ± 0,00 a	8,20 ± 0,24x 10 ⁹ b	0,00 ± 0,00 a	1,06 ± 0,21 x 10 ¹⁰ b
24 giờ	0,00 ± 0,00 a	3,90 ± 0,14 x 10 ⁹ b	0,00 ± 0,00 a	4,41 ± 0,19x 10 ⁹ b

Ghi chú: a, b đánh giá sự khác biệt các nghiệm thức tại cùng thời điểm khảo sát

Bảng 4 biểu diễn nồng độ B1 là 10⁶ CFU/mL, *V. parahaemolyticus* trong nghiệm thức là 10⁴, 10⁵ CFU/mL. B1 đã kìm hãm sự phát triển của *V. parahaemolyticus* hoàn toàn trong ba giờ đầu và duy trì ổn định cho đến 24 giờ. Số lượng của *V. parahaemolyticus* trong nghiệm thức nuôi chung

với B1 là khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức đối chứng (p < 0,05) tại tất cả các thời điểm khảo sát. Trong khi đó, mật độ *V. parahaemolyticus* đối chứng VP-10⁴ CFU/mL, VP-10⁵ CFU/mL tăng liên tục và đạt giá trị cao nhất sau 21 giờ 8,20 ± 2,4 x 10⁹ CFU/mL và 10,6 ± 2,00 x 10⁹ CFU/mL, theo thứ tự trên.

Bảng 4: Mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* các nghiệm thức đồng nuôi cấy với B1 (10⁶ CFU/mL)

Thời điểm khảo sát (giờ)	Mật độ <i>V. parahaemolyticus</i> (CFU/mL) các nghiệm thức			
	B1 10 ⁶ CFU/mL và VP-10 ⁴ CFU/mL	ĐC VP-10 ⁴ CFU/mL	B1 10 ⁶ CFU/mL và VP-10 ⁵ CFU/mL	ĐC VP-10 ⁵ CFU/mL
3 giờ	0,00 ± 0,00 a	9,07 ± 0,32 x 10 ⁶ b	0,00 ± 0,00 a	2,01 ± 0,37 x 10 ⁸ b
6 giờ	0,00 ± 0,00 a	2,28 ± 0,76 x 10 ⁹ b	0,00 ± 0,00 a	2,54 ± 0,27 x 10 ⁹ b
9 giờ	0,00 ± 0,00 a	2,40 ± 0,56 x 10 ⁹ b	0,00 ± 0,00 a	3,68 ± 1,01 x 10 ⁹ b
12 giờ	0,00 ± 0,00 a	5,80 ± 0,98x 10 ⁹ b	0,00 ± 0,00 a	4,40 ± 0,70 x 10 ⁹ b
15 giờ	0,00 ± 0,00 a	4,92 ± 3,64 x 10 ⁹ b	0,00 ± 0,00 a	4,68 ± 0,26 x 10 ⁹ b
18 giờ	0,00 ± 0,00 a	1,20 ± 0,27 x 10 ¹⁰ b	0,00 ± 0,00 a	7,70 ± 1,13 x 10 ⁹ b
21 giờ	0,00 ± 0,00 a	8,20 ± 2,40x 10 ⁹ b	0,00 ± 0,00 a	1,06 ± 0,20 x 10 ¹⁰ b
24 giờ	0,00 ± 0,00 a	3,90 ± 0,14 x 10 ⁹ b	0,00 ± 0,00 a	4,41 ± 0,19 x 10 ⁹ b

Ghi chú: a, b đánh giá sự khác biệt các nghiệm thức tại cùng thời điểm khảo sát

Bảng 5 cho thấy, nghiệm thức B1 (10⁷ CFU/mL) có khả năng kìm hãm hoàn toàn sự phát triển của *V. parahaemolyticus* (mật độ ban đầu lần lượt là 10⁵ CFU/mL, 10⁶ CFU/ mL, 10⁷ CFU/mL) trong ba giờ

đầu nuôi ghép chung và mật độ *V. parahaemolyticus* không phát hiện đến 24 giờ khảo sát (0,00 ± 0,00 CFU/mL). Trái lại, mật độ *V. parahaemolyticus* trong nghiệm thức đối chứng tăng đáng kể và đạt giá

trị cao nhất với mật độ $4,68 \pm 0,26 \times 10^9$ CFU/mL, $1,37 \pm 0,17 \times 10^{10}$ CFU/mL, $1,77 \pm 0,1 \times 10^{10}$ CFU/mL đối với NT ĐC VP-10⁵, NT ĐC VP - 10⁶ CFU/mL và NT ĐC VP - 10⁷ CFU/mL tại thời điểm 15 giờ. Thời điểm 24 giờ, các nghiệm thức ĐC có

xu hướng giảm nhẹ. Khi xử lý thống kê cũng cho thấy mật độ *V. parahaemolyticus* các nghiệm thức nuôi ghép chung với B1 (10⁷ CFU/mL) có sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nhóm đối chứng VP trong suốt thời gian 24 giờ.

Bảng 5: Mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* các nghiệm thức đồng nuôi cấy với B1 (10⁷ CFU/mL)

Thời điểm khảo sát (giờ)	Mật độ <i>V. parahaemolyticus</i> (CFU/mL) các nghiệm thức					
	B1 10 ⁷ CFU/mL và VP-10 ⁵ CFU/mL	ĐC VP-10 ⁵ CFU/mL	B1 10 ⁷ CFU/mL và VP-10 ⁶ CFU/mL	ĐC VP-10 ⁶ CFU/mL	B1 10 ⁷ CFU/mL và VP-10 ⁷ CFU/mL	ĐC VP-10 ⁷ CFU/mL
3 giờ	0,00±0,00 ^a	2,01±0,37x 10 ^{8b}	0,00±0,00 ^a	2,14 ± 0,79 x 10 ^{8 b}	0,00±0,00 ^a	6,50 ± 1,83 x 10 ^{8b}
6 giờ	0,00±0,00 ^a	2,54 ± 0,27 x 10 ^{9b}	0,00±0,00 ^a	1,95 ± 0,63 x 10 ^{9b}	0,00±0,00 ^a	3,52±0,48 x 10 ^{9b}
9 giờ	0,00±0,00 ^a	3,68 ± 0,10 x 10 ^{9 b}	0,00±0,00 ^a	9,52±0,35x 10 ^{9 b}	0,00±0,00 ^a	1,05±0,21x 10 ^{10 b}
12 giờ	0,00±0,00 ^a	4,40 ± 0,70x 10 ^{9b}	0,00±0,00 ^a	1,06± 0,23x 10 ^{10 b}	0,00±0,00 ^a	1,66 ± 0,15 x 10 ^{10 b}
15 giờ	0,00±0,00 ^a	4,68±0,26x 10 ^{9b}	0,00±0,00 ^a	1,37±0,17x 10 ^{10b}	0,00±0,00 ^a	1,77±0,10x 10 ^{10b}
18 giờ	0,00±0,00 ^a	7,70 ± 0,06x 10 ^{9b}	0,00±0,00 ^a	1,11±0,21x 10 ^{10b}	0,00±0,00 ^a	1,33±0,98x 10 ^{10b}
21 giờ	0,00±0,00 ^a	1,06 ± 0,20x 10 ^{9b}	0,00±0,00 ^a	1,03±0,84x 10 ^{9 b}	0,00±0,00 ^a	1,29±0,41x 10 ^{10 b}
24 giờ	0,00±0,00 ^a	4,41 ± 0,19x 10 ^{9b}	0,00±0,00 ^a	7,06 ± 0,05x 10 ^{9b}	0,00±0,00 ^a	9,00 ± 0,38 x 10 ^{9b}

Ghi chú: a, b đánh giá sự khác biệt các nghiệm thức tại cùng thời điểm khảo sát

Bên cạnh đó, sự phát triển của B1 trong các nghiệm thức đồng nuôi cấy chậm hơn một cách đáng kể ($p < 0,05$) so với đối chứng ĐC B1 10⁵ CFU/mL, B1 10⁶ CFU/mL và ĐC B1 10⁷ CFU/mL vào các thời điểm từ ba giờ đến 12 giờ khảo sát (số liệu không thể hiện). Tuy nhiên sau thời điểm 15 giờ, mật độ B1 các nghiệm thức đồng nuôi cấy tăng trưởng mạnh và không khác biệt so với các nghiệm thức đối chứng B1 và đạt giá trị từ $4,10 \times 10^9 - 6,90 \times 10^9$ CFU/mL.

3.3 Khảo sát một số đặc tính của chủng B1

3.3.1 Tính nhạy cảm với kháng sinh

Theo tài liệu hướng dẫn sử dụng kháng sinh của Bộ Y tế thì các kháng sinh trong bảng 6 chủ yếu là các loại kháng sinh có phổ kháng khuẩn rộng đối với vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Vi khuẩn B1 là vi khuẩn Gram dương chính vì thế chúng đều nhạy với hầu hết kháng sinh có phổ kháng khuẩn rộng và một số kháng sinh chủ yếu tác dụng trên vi khuẩn Gram âm như amoxicillin, ampicillin, kanamycin với vòng kháng từ 14 mm đến 40 mm. Trái lại, kháng sinh streptomycin (tác dụng trên vi khuẩn Gram âm) thì B1 kháng với vòng kháng khuẩn nhỏ hơn 14mm.

Bảng 6: Thử khả năng nhạy cảm của chủng B1 với các loại kháng sinh

Loại kháng sinh	Vòng kháng khuẩn (mm)	Kết quả	Loại kháng sinh	Vòng kháng khuẩn (mm)	Kết quả
Amoxicillin	22 mm	Nhạy	Erythromycin	32 mm	Nhạy
Ampicillin	22 mm	Nhạy	Flor	30 mm	Nhạy
Cefotaxime	34 mm	Nhạy	Gentamycin	20 mm	Nhạy
Cephalexin	40 mm	Nhạy	Kanamycin	20 mm	Nhạy
Ciprofloxacin	30 mm	Nhạy	Neomycin	18mm	Trung gian
Colistin	14 mm	Trung gian	Novobiocin	24 mm	Nhạy
Doxycycline	25 mm	Nhạy	Streptomycin	9 mm	Kháng
Tetracycline	19 mm	Trung gian	Sufamethoxazol/Trimethoprim	23 mm	Nhạy

Ghi chú: Tính nhạy và kháng được đánh giá theo tiêu chuẩn của CLSI (2012)

3.3.2 Khả năng sinh enzyme ngoại bào và chịu đựng pH, độ mặn

Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Trong hệ tiêu hóa tôm cũng như nguồn nước thải trong nuôi trồng thủy sản có chứa rất nhiều thành phần như protein, tinh bột, xenlulose. Chính vì thế

ngoài đặc tính đối kháng tốt với vi khuẩn gây bệnh thì các chủng vi sinh vật được tuyển chọn cần có thêm một số các đặc tính sinh enzyme ngoại bào cũng như ngưỡng chịu đựng tốt các điều kiện môi trường là một lợi thế. Dựa vào kết quả Bảng 7 có thể thấy B1 có khả năng tạo ra enzyme phân giải tinh bột, lipid, xenlulose, protein. Bên cạnh đó, B1 còn

khả năng chịu được phổ muối 0,5 - 4% và phổ pH từ 5 - 8.

Bảng 7: Khả năng sinh enzyme ngoại bào và chịu đựng pH, độ muối của B1

Các yếu tố	Các yếu tố khảo sát	Khả năng phản ứng
Khả năng sinh enzyme	Amylase	+
	Lipase	+
	Cellulase	+
	Protease	+
Khảo sát đặc tính	Độ muối	0,5% - 4%
	pH	5 - 8

4 THẢO LUẬN

Dựa vào bộ kit API 50 CHB và API 20E có thể xác định chủng B1 tương đồng 98,6% với *Bacillus licheniformis*. Mugg *et al.*, 2013 cho rằng API có thể được dùng định danh nhóm *Bacillus* spp. đến mức loài ngoại trừ *Bacillus thuringiensis*. Hơn nữa, dựa vào hệ thống định danh sinh hoá kết hợp API 50 CHB và API 20E có thể định danh 80% các chủng vi khuẩn *Bacillus* được phân lập (Aruwa *et al.*, 2015). Trong khi đó, trình tự gen của 16S rRNA của B1 giống 100% với một số chủng thuộc *Bacillus*. Tuy nhiên, khi phân loại tới loài thì mối quan hệ B1 chưa được xác định một cách rõ ràng giữa các chủng *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. methylotrophicus* và *B. subtilis*. Điều này có thể thấy được dựa vào phân tích chuỗi trình tự gen 16 S rRNA để phân tích cây di truyền vẫn chưa đủ để phân biệt rõ ràng giữa các loài *Bacillus*. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả trước đây của Aisuo *et al.* (2014). Chính vì thế, cần có nhiều nghiên cứu trong lĩnh vực này, đặc biệt là giải trình tự gyrB (La Duc *et al.*, 2004) để có thể tách biệt được một số loài trong giống *Bacillus*.

Để lựa chọn probiotic thì các chủng lựa chọn phải có khả năng nhạy với kháng sinh bởi vì thứ nhất, nếu đặc tính kháng kháng sinh nằm trên yếu tố di truyền di động như plasmid thì đặc tính này là có hại do nó có thể được di truyền cho các chủng vi khuẩn gây bệnh; thứ hai, nếu đặc tính này là tự nhiên do gen nằm trên nhiễm sắc thể quy định thì là một đặc điểm tốt vì các chủng kháng kháng sinh có thể được sử dụng để duy trì sự có mặt của vi khuẩn trong hệ thống tiêu hóa của vật chủ đang phải điều trị kháng sinh (Gueimonode *et al.*, 2013). Theo Lê Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền (2016), khi chọn lọc các chủng vi khuẩn làm probiotic thì khả năng sinh enzyme ngoại bào là một tiêu chí quan trọng bởi vì các enzyme ngoại bào đóng một vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp thức ăn dễ hấp thụ, phân hủy các thức ăn tồn đọng trong ao và vật nuôi tăng trọng tốt, bên cạnh đó còn có khả năng làm sạch môi trường. Trong nghiên cứu này, B1 có khả năng nhạy với nhiều loại kháng sinh, khả năng sinh ra

enzyme ngoại bào vì thế B1 được xem là chủng vi khuẩn tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bên cạnh đó, khảo sát khả năng phát triển của B1 ở các nồng độ muối và pH khác nhau cho thấy B1 phát triển mạnh ở nồng độ muối 3% và pH tối ưu là 6. Theo Trần Vũ Đình Nguyên và *ctv.* (2014), chủng *Bacillus pumilus* B3.10.2 được phân lập từ tôm hùm bông có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối từ 1 đến 3%. Theo Nguyễn Văn Phúc và Phan Thị Phương Trang (2014) chủng *B. subtilis* được phân lập từ ao tôm Bến Tre có khả năng chịu đựng được độ muối từ 0 - 5%, phát triển mạnh ở 0 - 2% và phát triển ở pH từ 5 - 9, phát triển tối ưu ở pH 7. Từ đó cho thấy, B1 có tiềm năng ứng dụng trong nuôi nước lợ, nước mặn vì chúng có khả năng chịu được phổ muối rộng và pH 5 - 8.

Đặc tính đối kháng của B1 với *V. parahaemolyticus* trong nghiên cứu này cũng cho thấy khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của Balcázar *et al.* (2007), đã phân lập được *B. subtilis* UTM 126 có hoạt động ức chế chống lại ba chủng *V. harveyi*, *V. alginolyticus* và *V. parahaemolyticus* phân lập từ tôm bị bệnh với vòng kháng khuẩn khoảng 10 - 15 mm. Cũng theo một nghiên cứu khác vào năm 2009 của Abdelkarim Mahdhi *et al.* về các chủng *B. subtilis* và *B. coagulans* được phân lập từ môi trường *Artemia* có khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. alginolyticus* ATCC17749 và *V. alginolyticus* với vòng kháng khuẩn giao động từ 12 mm - 20 mm. Theo Gopalarishnan *et al.* (2013), chủng *Bacillus licheniformis* (DAB1) có sự đối kháng với *V. parahaemolyticus* với vòng kháng khuẩn 14 - 16 mm sau 24 giờ ủ. Bên cạnh đó, Trần Vũ Đình Nguyên và *ctv.* (2014) đã phân lập và định danh được chủng *Bacillus pumilus* có khả năng đối kháng với *Vibrio owensii* DY05 (tác nhân gây bệnh trên tôm hùm bông) bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch với đường kính kháng khuẩn là 29 mm. Sự cạnh tranh về chất dinh dưỡng và việc tiết ra chất kháng sinh là cơ chế B1 ức chế *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Cũng tương tự như các nghiên cứu trước đây, Vaseeharan and Ramasamy (2003) cho rằng nồng độ 10^9 CFU/mL *B. subtilis* BT23 sẽ ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của *V. harveyi* 10^3 CFU/mL. Kết quả thử nghiệm nuôi cấy cho thấy, khi nồng độ *B. subtilis* BT23 tăng, sự tăng trưởng của *V. harveyi* được kiểm soát trong điều kiện *in vitro*. Purivirojkul *et al.* (2007) cho rằng *B. subtilis* BT23 trong điều trị *in vitro* và *in vivo* có khả năng ức chế được vi khuẩn *V. harveyi*. *Bacillus* sp. có khả năng sống trong môi trường năm ngày và có thể làm giảm mật độ vi khuẩn gây bệnh từ 10^6 xuống 10^5 CFU/mL trong thời gian 24 đến 48 giờ. Như vậy, cùng với các nghiên cứu trước

đây thì chủng B1 bắt đầu từ nồng độ 10^5 CFU/mL có khả năng ức chế hoàn toàn *V. parahaemolyticus* trong 24 giờ khảo sát.

5 KẾT LUẬN

Chủng B1 được định danh là *Bacillus licheniformis* có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* gây AHPND bằng phương pháp khuếch tán đĩa với đường kính vòng kháng khuẩn là 15 mm. Bên cạnh đó, B1 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/mL có thể ức chế hoàn toàn sự phát triển của *V. parahaemolyticus* ở nồng độ 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/mL trong 24 giờ khảo sát. Ngoài ra, B1 còn thể hiện những đặc tính có lợi trong sử dụng như là probiotic như khả năng sinh enzyme amylase, lipase, cellulase, protease, khả năng nhạy với kháng sinh cao.

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn chương trình công nghệ sinh học - Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn; Trung tâm quan trắc và bệnh thủy sản khu vực Nam Bộ đã tạo điều kiện thật tốt để chúng tôi có thể thực hiện được các nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aisuo, W. and Gavin, J. A., 2014. Whole Genome Phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). Scientific Report.

Aranda, C.P., Valenzuela, C., Barrientos, J., et al., 2012. Bacteriostatic anti - *Vibrio parahaemolyticus* activity of *Pseudoalteromonas* sp. Strains DIT09, DIT44 and DIT46 isolated from Southern Chilean intertidal *Perumytilus purpuratus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(6): 2365-74.

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

Balcázar, J. L. and Rojas-Luna T., 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Curr Microbiol, 55(5): 409-12.

Barbosa, T. M., Cláudia, R. S., Roberto, M. La R., Martin, J. W., and Adriano, O. H., 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 71(2): 968-978.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). CLSI Document M07-A9. 1/2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - 19th Edition.

Eduardo, M. Leano and Mohan, C.V., 2012. Early Mortality Syndrome (EMS)/ Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS):

An emerging threat in the Asian shrimp industry NACA, Bangkok, Thailand. FAO Fisheries and Aquaculture Report. No. 1053: 54.

Gatesoupe, F. J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180(1-2): 147-165.

Gullian, M., F. Thompson, and J. Rodriguez., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 233 (1-4): 1-14.

Guo, J. J., Liu K., Cheng, S., et al., 2009. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. Aquaculture. Res, 40: 609-618.

Hong, H.A., L.H. Duc, and S. M. Cutting., 2005. The use of bacterial spore forms as probiotics. FEMS Microbiol. Rev. 29: 750-757.

Kabir, S. M., 2009. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. Int J Mol Sci. 10(8): 3531-3546.

La Duc, Satomi, T., Agata, N., and Venkateswaran, K., 2004. GyrB as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis*- *cereus*-*thuringiensis* group. J Microbiol Methods 56: 83-394

Mugg, Seymour, S. and Clark, S., 2013. A new method for identification of *Bacillus* spp. and related species involved in food poisoning and spoilage. Microgen Bioproducts Ltd, Camberley, Surrey, UK.

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H. and Austin, B., 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture 431: 1-11.

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, Số 1/2014: 182-183.

Đặng Thị Hoàng Oanh, Trần Trọng Nghĩa, Trương Phú Quốc và Phạm Anh Tuấn, 2012. Hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome- AHPND) or Early mortality syndrome-EMS. Tạp chí Khoa học đại học Cần Thơ, 39 (2015): 99-107.

Panakorn, S., 2012. Opinion article: more on early mortality syndrome in the shrimp. Aquaculture Asia Pacific 8(1): 8-10.

Nguyễn Văn Phúc và Phan Thị Phương Trang, 2014. Phân lập định danh và xác định các đặc tính có lợi của chủng *Bacillus* spp. từ ao nuôi tôm ở các tỉnh Bến Tre. Tạp chí khoa học ĐHSPTHCM. Số 64: 94-102.

Nguyễn Thị Xuyên, Lương Ngọc Khuê, Trần Quy và ctv., 2015. Hướng dẫn sử dụng kháng sinh. Hà Nội. 275 trang.

Lê Hồng Phước, Nguyễn Diễm Thu, Nguyễn Văn Hào, Cao Thành Trung, Nguyễn Thị Hiền và Nguyễn Hồng Lộc, 2017. Nghiên cứu quy trình sử dụng kháng sinh hợp lý trong phòng trị bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi nước lợ

- Việt Nam. Báo cáo tổng kết. Viện Nghiên Cứu Nuôi trồng Thủy sản II. Thành phố Hồ Chí Minh.
- Purivirojkul, W., and Areechon., 2007. Application of *Bacillus* spp. isolated from intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from natural habitat for control pathogenic bacteria in aquaculture, *Kasetsart J. (Nat. Sci)*. 41: 125-132.
- Reuter, G., 2001. Probiotics possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr*. 114: 410-419.
- Selvakumaran, S., Kapley, A., Kalia, V.C. and Purohit, H.J., 2008. Phenotypic and phylogenetic groups to evaluate the diversity of *Citrobacter* isolates from activated biomass of effluent treatment plants. *Bioresour. Technol*. 99 (5): 1189-1195.
- Skjermo, J., and Vadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*. 177: 333-343.
- Sumathi, V. and Reetha, D., 2012. Screening of Lactic Acid Bacteria for Their Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 3(4): 802-808.
- Trần Linh Thuộc, 2010. Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và môi trường, Nhà xuất bản Giáo dục, Thành phố Hồ Chí Minh. 233 trang.
- Touraki, M., Karamanlidou, G., Karavida, P. and Chrysi K., 2012. Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia nauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6): 2425-2433.
- Vaseeharan, B. and Ramasamy, P., 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp *Bacillus Subtilis* BT23 applicable probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol*, 36(2): 83-87.
- Lê Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền, 2016. Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp* (2016), 2: 26-32.