

Tuyển chọn các chủng *Bacillus spp.* sinh enzyme và kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây hội chứng chết sớm (EMS) trên tôm

- **Đỗ Thị Thanh Dung**
- **Lê Thanh Bình**
- **Hoàng Thị Đăng Dương**
- **Võ Đình Quang**

Chi nhánh Viện ứng dụng công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

- **Phan Thị Phương Trang**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

Email: dothithanhdung087186@gmail.com

(Bài nhận ngày 12 tháng 06 năm 2017, nhận đăng ngày 06 tháng 10 năm 2017)

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm tuyển chọn các dòng *Bacillus* có khả năng sinh một số enzyme có lợi đồng thời kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây hội chứng chết sớm trên tôm. Trong nghiên cứu này, tổng cộng đã phân lập và sàng lọc được 54 chủng *Bacillus* từ 30 mẫu bùn, nước và tôm ao tại Sóc Trăng. Trong đó, 19 chủng có khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* gây hội chứng chết sớm trên tôm (EMS) trên cả 2 phương pháp thử

nghiệm. Ba chủng là NA2B13, NA10B2, NA8B1 có khả năng đối kháng mạnh với *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS trên tôm và sản xuất một đến ba loại enzyme ngoại bào mạnh. Kết quả định danh 16S rDNA và MALDI-TOF cho thấy NA2B13 và NA8B1 là *Bacillus subtilis*, chủng NA10B2 là *Bacillus amyloliquefaciens*. Đây là hai loài được xem là an toàn và có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh phòng bệnh EMS trên tôm.

Từ khóa: hội chứng chết sớm - EMS, hoại tử gan tụy cấp - AHPNS, *Bacillus*, *V. parahaemolyticus*

MỞ ĐẦU

Thủy sản là một trong những mặt hàng xuất khẩu chủ lực của Việt Nam với kim ngạch khoảng 5 tỷ USD/năm. Trong đó, ngành nuôi tôm sú và tôm thẻ chân trắng là một trong những ngành mũi nhọn trong xuất khẩu thủy sản ở nước ta.

Tuy nhiên hiện nay, hiện tượng tôm nuôi bị chết hàng loạt được biết đến với tên gọi là hội chứng chết sớm (Early mortality syndrome - EMS) hay còn gọi là hội chứng hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis syndrome - AHPNS) gây thiệt hại nặng cho ngành nuôi tôm của Việt Nam cũng như khu vực Đông Nam Á. Bệnh ảnh hưởng trên cả tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) với cùng một biểu hiện bệnh tích trên

cơ quan gan tụy. Nhóm nghiên cứu của tiến sĩ Lightner tại Đại học Arizona xác định được nguyên nhân gây hội chứng tôm chết sớm (EMS) là do một dòng đặc biệt của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra [11,12]. Cho đến nay, hầu như chưa có thuốc trị đặc hiệu để giải quyết được vấn đề dịch bệnh tôm EMS/AHPNS. Việc sử dụng kháng sinh để tiêu diệt vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh vừa không phòng bệnh hiệu quả, lại gây ảnh hưởng đến môi trường nuôi tôm vừa ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của tôm và cũng gây ảnh hưởng đến chất lượng tôm. Các vấn đề quan ngại cho sức khỏe người tiêu dùng ở các nước nhập khẩu tôm như dư lượng kháng sinh, hóa chất cấm, v.v... khiến việc lựa chọn phương pháp điều trị bệnh tôm

là rất hạn chế. Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy việc sử dụng vi sinh để ức chế một số loài *Vibrio* nói chung gây bệnh Vibriosis trên tôm đã cho thấy tính hiệu quả của nó, tuy nhiên hiện nay các sản phẩm vi sinh trong nước đều có nguồn gốc ngoại nhập hoặc không rõ thành phần, chủng loại, trong khi đó việc phân lập và sản xuất trong nước vẫn còn hạn chế.

Đáng chú ý hiện nay là dòng vi khuẩn *Bacillus* spp., có vai trò quan trọng vì có khả năng sinh ra nhiều sản phẩm biến dưỡng thứ cấp như kháng sinh, thuốc trừ sâu sinh học, hóa chất và enzyme...đồng thời đã có nhiều nghiên cứu cho thấy có khả năng ức chế một số dòng *Vibrio* gây bệnh [2-4,9,10]. Do đó việc lựa chọn dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. mang các đặc tính tốt đồng thời kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh EMS trên tôm, có nguồn gốc tại địa phương làm cơ sở cho việc sản xuất đại trà chế phẩm vi sinh phòng ngừa bệnh là một vấn đề cần thiết hiện nay.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây hội chứng EMS nghiên cứu hiện đang được lưu trữ tại Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP.HCM.

Chủng *Bacillus* spp. phân lập từ mẫu đất, mẫu nước và hệ tiêu hóa tôm khô được lấy trong khu vực nuôi tôm khô tại tỉnh Sóc Trăng.

Môi trường sử dụng nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy *V. parahaemolyticus*: TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose) của Merk, TSB (Tryptic Soy Broth): casein peptone 15 g, soya peptone 5 g, NaCl 15 g, nước cất vừa đủ 1.000 mL.

Môi trường phân lập và nuôi cấy *Bacillus*: MPA (Malt Peptone Agar): cao thịt 5 g, peptone 10 g, NaCl 5 g, glucose 2 g, agar 20 g, nước biển có độ mặn 10 ‰ (pha với nước cất) vừa đủ 1L;

Môi trường LB (Luria – Bertani): tryptone 10g, cao nấm men 5 g, NaCl 5 g, nước cất vừa đủ 1000 mL; Môi trường LB – Agar thành phần như trên có bổ sung thêm 2 % agar. Các môi trường trên được hấp khử trùng ở 121 °C, 15 phút trước khi sử dụng.

Phương pháp phân lập, làm thuần *Bacillus*

Trước khi phân lập, mẫu được đun ở nhiệt độ cao (80 °C) trong 10 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng, chỉ giữ lại những chủng có sinh bào tử để chọn lọc và làm thuần *Bacillus*. Pha loãng mẫu tôm, mẫu nước, mẫu bùn đáy ao nuôi tôm đến nồng độ thích hợp bằng nước muối sinh lý 0,85 – 0,9 ‰, cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường MPA nước biển (độ mặn 10 ‰) nuôi cấy 37 °C trong 24 giờ. Chọn khuẩn lạc đặc trưng cho *Bacillus* và tiến hành làm thuần bằng cách cấy ria trên môi trường LB - agar, cho tới khi quan sát thấy chỉ có một dạng khuẩn lạc duy nhất trên môi trường [14].

Phương pháp định danh *Bacillus*

Xác nhận vi khuẩn *Bacillus* bằng cách quan sát khuẩn lạc trên thạch, nhuộm Gram (+), phản ứng catalase (+), phản ứng oxydase (+), khả năng di động và khả năng hình thành bào tử.

Các mẫu vi khuẩn *Bacillus* mục tiêu thu được từ các mẫu đất, nước, tôm được lấy tại Sóc Trăng, phân lập trên môi trường MPA được ký hiệu tương ứng là: ĐAiBj, NAIbJ, TAIbJ trong đó i từ 1 đến 10, j từ 1 đến n.

Các chủng sau khi định danh sinh hóa được lựa chọn và tiến hành định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA: Tách chiết bộ gene vi khuẩn bằng bộ kit của QIAGEN, khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự như sau: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'). 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Sản phẩm PCR được tinh chế và gửi giải trình tự. Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với

ngân hàng dữ liệu gene của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Sau đó các chủng vi khuẩn được định danh bằng phương pháp sử dụng công nghệ khối phổ protein (MALDI – TOF). So sánh sự tương đồng của phổ protein từ mẫu vi sinh vật mục tiêu với cơ sở dữ liệu của gần 6000 chủng vi sinh vật khác nhau.

Phương pháp xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng *Bacillus*

Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào trên môi trường LB – agar bổ sung cơ chất thích hợp. Tế bào của chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 37 °C trong 24 giờ. Chấm dịch *Bacillus* sau 24 giờ nuôi cấy lên đĩa môi trường LB – agar có bổ sung từng loại cơ chất: 1 % tinh bột, 0,5 % CMC (carboxy methyl cellulose), 1 % casein tương ứng cho khảo sát khả năng sinh các enzyme amylase, cellulase và protease. Ủ các đĩa khảo sát ở 37 °C trong 12 giờ và quan sát vòng phân giải trên đĩa [5].

Phương pháp khảo sát khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus*

Sử dụng phương pháp đĩa thạch 2 lớp của Dopazo và cộng sự (1988) với một số chỉnh sửa nhỏ [1] và phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch

[7,13], để khảo sát đặc tính đối kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi chủng vi khuẩn cần chọn lọc, kết quả là giá trị trung bình cộng của các lần lặp lại.

Dựa vào kích thước vòng đối kháng, chia mức độ kháng theo các cấp sau: Không đối kháng (-): 0 mm; Đối kháng yếu (+): >0 – <2 mm; Đối kháng trung bình (++) : 2– ≤4mm; Đối kháng mạnh (+++): ≥4 mm

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được đánh giá bằng các phương pháp thống kê phân tích biến lượng (Analysis of Variance, ANOVA), so sánh trung bình theo phương pháp trắc nghiệm Duncan. Các số liệu ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS) phiên bản 19.

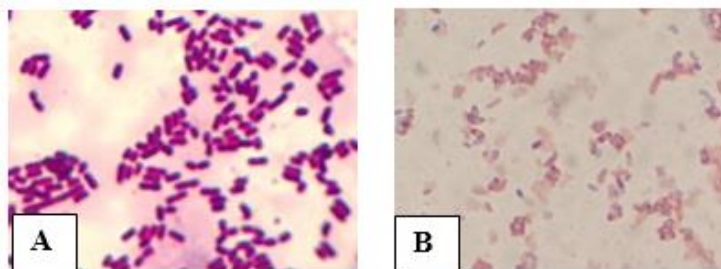
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và sàng lọc sơ bộ chủng *Bacillus* spp.

Từ các mẫu đất, mẫu nước, mẫu tôm thu được đã lựa chọn được 83 chủng với các đặc điểm nhận dạng *Bacillus* như: khuẩn lạc tròn, bia răng cưa, màu vàng xám để tuyển chọn (Hình 1).



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường MPA sau 24 giờ



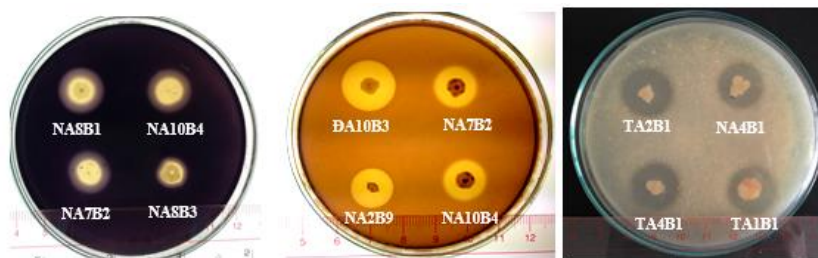
Hình 2. Kết quả nhuộm Gram và nhuộm bào tử của chủng phân lập được trên môi trường MPA. A: Tế bào Gram (+); B: Tế bào sinh nội bào tử

Với 83 chủng vi khuẩn phân lập được, tiến hành sàng lọc sơ bộ nhằm xác định sự hiện diện của chủng vi khuẩn *Bacillus*. Đã chọn được 54 chủng có đặc tính tương ứng với *Bacillus*: Trục khuẩn hình que, Gram dương, catalase và oxidase dương tính, sinh nội bào tử, di động. Trong đó số chủng phân lập được tại nước ao là 23 chủng chiếm tỷ lệ cao nhất 42,59 %, số chủng phân lập được từ đất ao là 13 chủng chiếm tỷ lệ 24,07 %,

các mẫu tôm ao phân lập được 18 chủng *Bacillus* chiếm tỷ lệ 33,33 % (Hình 2).

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng *Bacillus* phân lập được

Việc khảo sát sơ bộ khả năng sinh enzyme amylase, cellulase và caseinase của các chủng *Bacillus* được xác định thông qua đường kính phân giải tinh bột, CMC và casein (Hình 3).



Hình 3. Vòng phân giải tinh bột (1), cellulose (2), casein (3) của một số chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được

Kết quả cho thấy hầu hết các chủng đều có khả năng sinh cả 3 loại enzyme, trong đó chọn đường kính vòng phân giải lớn hơn 6 làm chủng sinh enzyme mạnh thì đối với thử nghiệm amylase thu được 7 chủng với đường kính phân giải từ 6,33–

15 mm, cellulase thu được 30 chủng với đường kính phân giải từ 6,5–16,33 mm và caseinase thu được 23 chủng với đường kính phân giải từ 6,33–13 mm (Bảng 1).

Bảng 1. Tổng hợp kết quả đường kính phân giải cơ chất của các chủng *Bacillus*

STT	Đường kính phân giải tinh bột		Đường kính phân giải CMC		Đường kính phân giải casein	
	Tên chủng	$(D-d)$ mm	Tên chủng	$(D-d)$ mm	Tên chủng	$(D-d)$ mm
1	NA8B1	15,00	ĐA10B3	16,33	TA2B1	13,00
2	NA10B4	11,67	NA2B9	11,00	TA4B1	11,83
3	NA10B2	11,00	NA7B2	10,67	NA4B1	10,67
4	TA10B2	11,00	NA10B4	10,17	TA1B1	10,50

5	NA7B2	8,33	TA2B1	10,00	NA2B13	9,83
6	NA8B3	6,83	NA8B1	9,50	TA5B2	9,67
7	TA7B2	6,33	TA6B3	9,50	NA6B3	8,67
8	TA6B2	5,83	TA1B1	9,00	NA8B1	8,67
9	TA7B1	5,82	TA5B1	9,00	NA10B2	8,67
10	TA7B3	5,50	TA6B1	8,67	ĐA10B3	8,67
11	TA6B1	5,00	NA10B1	8,17	TA3B1	8,67
12	NA9B1	4,50	NA10B2	8,17	TA7B1	8,67
13	NA2B9	4,17	TA7B1	8,17	NA2B9	8,50
14	ĐA5B2	4,17	TA7B2	8,17	TA5B1	8,50
15	TA9B1	4,00	NA6B3	8,00	NA2B6	8,33
16	ĐA7B2	3,83	NA9B1	8,00	NA1B1	7,83
17	ĐA10B3	3,83	ĐA7B2	8,00	NA2B4	7,50
18	NA2B13	3,00	TA3B1	8,00	TA6B3	7,33
19	ĐA10B1	3,00	ĐA5B2	7,67	NA4B3	7,17
20	NA4B3	2,50	TA7B3	7,67	ĐA5B7	7,00
21	NA6B3	2,50	ĐA10B1	7,50	NA2B7	6,83
22	ĐA3B4	2,17	TA5B2	7,50	TA7B2	6,67
23	NA2B2	2,00	TA10B2	7,50	ĐA3B4	6,33
24	ĐA2B2	1,83	NA8B3	7,33	NA1B2	6,00
25	ĐA3B3	1,83	TA6B2	7,33	ĐA2B2	6,00
26	ĐA3B6	1,83	TA9B1	7,33	TA6B2	6,00
27	NA2B1	1,50	NA2B5	7,17	ĐA10B1	5,67
28	NA2B7	1,50	NA2B1	6,83	ĐA6B1	5,50
29	NA2B5	1,33	NA2B2	6,83	ĐA3B3	5,33
30	ĐA3B5	1,33	NA2B3	6,50	ĐA5B2	5,33

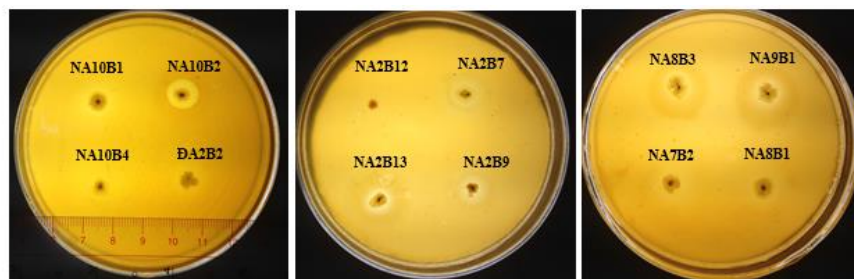
Kết quả trên cho thấy các chủng *Bacillus* phân lập có khả năng tiết các loại enzyme ngoại bào ở các mức độ khác nhau. Các chủng tiếp tục được khảo sát khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS trên tôm.

Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS của các chủng *Bacillus* phân lập

Sử dụng phương pháp đối kháng trực tiếp trên 2 thạch 2 lớp và khuếch tán trên lỗ thạch để kiểm tra khả năng đối kháng của các chủng *Bacillus* phân lập được với chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh, việc khảo sát khả năng kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS của các chủng

Bacillus được xác định thông qua đường kính vòng kháng khuẩn. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 2.

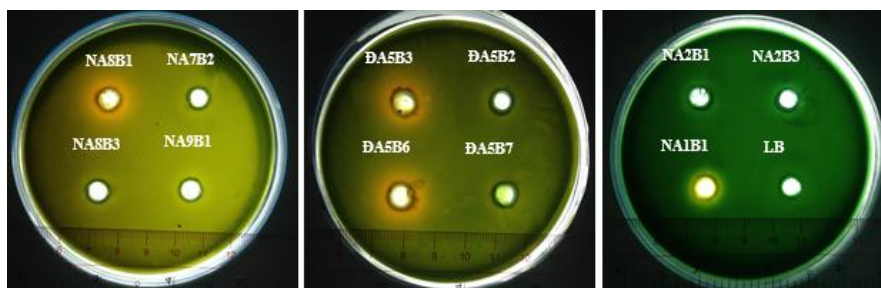
Kết quả cho thấy với phương pháp đối kháng trực tiếp trên 2 lớp thạch, 54 chủng khảo sát có đường kính vòng phân giải từ 0 đến 5,83 mm. Tổng số chủng có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* trên môi trường 2 lớp thạch là 47 chủng chiếm tỷ lệ 87,04 %. Có 3 chủng *Bacillus* được đánh giá là có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* mạnh với $(D-d) \geq 4$ là NA10B2, NA2B13, NA9B1.



Hình 4. Khả năng kháng của một số chủng vi khuẩn *Bacillus* với *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS bằng phương pháp đối kháng trực tiếp

Phương pháp đối kháng trực tiếp trên môi trường 2 lớp thạch chỉ cho biết chủng khảo sát có đối kháng hay không mà không biết rõ các chủng thử nghiệm đối kháng có phải do sinh các hợp chất kháng khuẩn hay do cạnh tranh dinh dưỡng (Hình 4). Trong khi đó phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch cho cho biết được các chủng có khả năng sinh chất kháng khuẩn hay không. Vòng vô khuẩn

xung quanh lỗ thạch chứng tỏ chủng có tiết chất kháng khuẩn ức chế khả năng sinh trưởng của *V. parahaemolyticus* Hình 5. Từ kết quả thí nghiệm Bảng 2 đã chọn được 21 chủng có đối kháng với *V. parahaemolyticus*, chiếm tỷ lệ 38,89%. Trong đó NA8B1 có khả năng đối kháng mạnh nhất $(\overline{D-d}) = 5,33\text{mm} > 4$ và có sự khác biệt thống kê so với các chủng còn lại.



Hình 5. Khả năng kháng một số chủng vi khuẩn *Bacillus* với *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS bằng phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch

Bảng 2. Đường kính vòng kháng khuẩn của các chủng *Bacillus* được kiểm tra đối kháng bằng 2 phương pháp

STT	Phương pháp đối kháng trực tiếp		Phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch	
	Tên chủng	$(\overline{D-d})$ mm	Tên chủng	$(\overline{D-d})$ mm
1	NA10B2	5,83 ^a	NA8B1	5,33 ^a
2	NA2B13	4,00 ^b	ĐA5B6	3,50 ^b
3	NA9B1	4,00 ^b	ĐA5B3	2,50 ^{bc}
4	NA2B4	3,17 ^{bc}	ĐA5B2	1,83 ^{cd}
5	ĐA10B3	3,17 ^{bc}	NA1B1	1,50 ^{cde}
6	ĐA5B7	3,00 ^{bcd}	NA10B1	1,33 ^{cde}
7	TA4B2	3,00 ^{bcd}	NA10B2	1,17 ^{cde}
8	NA2B9	2,83 ^{bcd}	NA8B3	1,00 ^{cde}
9	NA4B3	2,83 ^{bcd}	NA9B1	1,00 ^{cde}
10	ĐA10B1	2,67 ^{bcd}	TA6B2	1,00 ^{cde}

11	TA1B1	2,67 ^{bcd}	TA7B3	0,67 ^{de}
12	NA8B3	2,50 ^{bcde}	NA2B1	0,50 ^{de}
13	ĐA7B2	2,33 ^{bcdef}	NA2B4	0,33 ^{de}
14	TA3B1	2,33 ^{bcdef}	NA6B3	0,33 ^{de}
15	ĐA3B4	2,17 ^{bcdefg}	TA7B2	0,33 ^{de}
16	ĐA3B6	2,17 ^{bcdefg}	NA2B2	0,17 ^{de}
17	TA10B2	2,00 ^{bcdefgh}	NA2B3	0,17 ^{de}
18	TA7B2	1,83 ^{cdefgh}	NA10B4	0,17 ^{de}
19	NA2B3	1,67 ^{cdefgh}	ĐA5B7	0,17 ^{de}
20	ĐA5B2	1,67 ^{cdefgh}	TA9B1	0,17 ^{de}
21	TA6B1	1,67 ^{cdefgh}	TA10B2	0,17 ^{de}

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Qua thí nghiệm khảo sát khả năng đối kháng bằng hai phương pháp đối kháng trực tiếp hai lớp thạch và khuếch tán trên lỗ thạch, đã chọn được 19 chủng cho kết quả đối kháng trên cả hai phương pháp. Các chủng có khả năng đối kháng mạnh trên phương pháp đối kháng trực tiếp là NA10B2, NA2B13, NA9B1 tuy nhiên trên phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch lại cho chủng NA8B1 có khả năng đối kháng mạnh với *V. parahaemolyticus*.

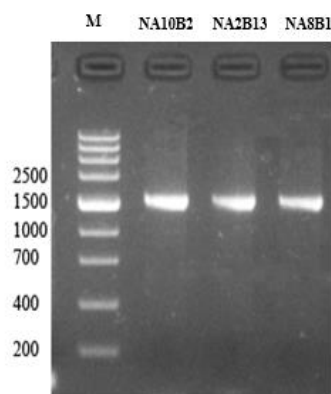
Từ khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào và thử nghiệm khả năng đối kháng, 3 chủng NA10B2, NA2B13, NA8B1 được chọn là 3 chủng tiềm năng do có khả năng đối kháng mạnh đồng thời tiết cả ba loại enzyme, trong đó tiết 3 loại enzyme mạnh là NA10B2 và NA8B1, tiết 1 loại enzyme mạnh là NA2B13. Các chủng này được sử dụng để định danh 16S rDNA và MALDI – TOF, bước đầu nghiên cứu khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* hướng đến việc sản xuất chế phẩm vi sinh phòng trừ bệnh EMS trên tôm.

Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA và MALDI – TOF

Bộ gene của các chủng tuyển chọn NA10B2, NA2B13, NA8B1 được tách chiết. Trình tự 16S rDNA trên bộ gene được nhân bản bằng phương pháp PCR và chạy điện di trên gel agarose 1 % để kiểm tra kết quả. Hình 6 cho thấy ở giếng NA10B2, NA2B13, NA8B1 đã thu nhận được các

đoạn trình tự DNA (~ 1500 bp) mã hóa cho 16S rRNA của các chủng tuyển chọn.

Trình tự 16S rDNA sau khi khuếch đại được gửi giải trình tại công ty MacroGen và so sánh độ tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gene NCBI bằng công cụ BLAST. Dựa trên kết quả phân tích trình tự 16S rDNA và định danh khẳng định lại bằng phương pháp MALDI – TOF, kết quả cho thấy chủng NA8B1 và NA10B2 là *Bacillus subtilis*, chủng NA2B13 là *Bacillus amyloliquefaciens* (Bảng 3). Các chủng này được khoa học đánh giá là vi khuẩn an toàn (GRAS) [6, 8] và có tiềm năng ứng dụng trong việc làm chế phẩm hoặc thức ăn cho tôm nhằm giúp tôm phòng và chống lại bệnh EMS.



Hình 6. Kết quả PCR thu nhận gene 16S rDNA của các chủng NA10B2, NA2B13, NA8B1

Bảng 3. Tóm tắt kết quả định danh bằng MALDI – TOF của ba chủng NA10B2, NA2B13, NA8B1

Chủng	Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
NA10B2	1 (+)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CIP 103265T CIP	1.771	<u>1390</u>
NA2B13	1 (+)	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i> DSM 10T DSM	1.762	<u>135461</u>
NA8B1	1 (+)	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i> DSM 5660 DSM	1.923	<u>135461</u>

KẾT LUẬN

Từ 30 mẫu đất, nước, tôm thu nhận tại các ao nuôi tôm tại Sóc Trăng đã phân lập và sàng lọc được 54 chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* trên môi trường thạch đĩa. Trong đó ba chủng NA10B2, NA2B13, NA8B1 đối kháng mạnh với *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS đồng thời sinh một đến ba loại

enzyme ngoại bào mạnh. Kết quả định danh dựa trên phân tích trình tự 16S rDNA và MALDI – TOF cho thấy NA8B1 và NA10B2 là *Bacillus subtilis*, chủng NA2B13 là *Bacillus amyloliquefaciens*. Các chủng được đánh giá là an toàn và có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh phòng bệnh EMS trên tôm.

Selection of *Bacillus* spp. isolates having enzyme producing ability and antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* causing the early mortality syndrome (EMS) on shrimp

- Do Thi Thanh Dung
- Le Thanh Binh
- Hoang Thi Dang Duong
- Vo Dinh Quang

Branch of National Center for Technological Progress in Ho Chi Minh City

- Phan Thi Phuong Trang
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

The aim of this study is to select some *Bacillus* isolates which are capable of yielding several beneficial enzymes and antagonism to *Vibrio parahaemolyticus* causing the EMS shrimp disease. In this study, we isolated and screened total of 54 *Bacillus* isolates from 30 mud, water and shrimp samples at shrimp ponds in Soc Trang province. Among these, 19 isolates were resistant against *Vibrio parahaemolyticus* strains causing the EMS shrimp disease via two testing methods.

Three of them including NA2B13, NA10B2, NA8B1 isolates showed strong resistance and strong one to three kinds of extracellular enzymes to produce. Result of 16S rDNA sequencing and MALDI -TOF showed that NA2B13 and NA8B1 were *Bacillus subtilis* and NA10B2 was *B. amyloliquefaciens*. These two species were regarded safe and having potential applications in the production of biological products to prevent EMS shrimp disease.

Keywords: early mortality syndrome – EMS, Acute hepatopancreatic necrosis syndrome – AHPNS, *Bacillus*, *V. parahaemolyticus*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Ngô Thị Tường Châu, Ngô Hoàng Song Uyên, Phân lập và đặc tính hóa vi khuẩn lactic đối kháng với *Vibrio* spp. gây bệnh từ ao nuôi tôm ở Thừa Thiên Huế, *Báo cáo Khoa học về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật*, 00, 1224–1227 (2009).
- [2]. Nguyễn Văn Duy, Mai Thị Hằng, Tuyển chọn các vi khuẩn phân lập từ rừng ngập mặn có khả năng kháng *Vibrio* để sản xuất chế phẩm probiotic kiểm soát bệnh *Vibriosis* trên tôm nước lợ, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 5, 107–110 (2006).
- [3]. Dương Nhật Linh, Nguyễn Văn Minh, Đỗ Bảo Ngọc, Đan Duy Pháp, Nghiên cứu tính an toàn và khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú của một số chủng *Bacillus* phân lập từ trùn quế trong điều kiện phòng thí nghiệm, *Tạp chí khoa học trường Đại học Mở*, 4, 27, 114–121 (2012).
- [4]. Phí Quyết Tiến, Nguyễn Văn Hiếu, Hồ Tuyên, Lê Gia Hy. Tuyển chọn vi khuẩn biển có tiềm năng ứng dụng trong xử lý ao nuôi tôm và phế liệu tôm, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 3, 571–579 (2012).
- [5]. Phạm Văn Ty, Nguyễn Văn Thành, Công nghệ sinh học – Công nghệ vi sinh và môi trường, Nxb Giáo Dục, TPHCM (2006).
- [6]. A.AIGburi, A.Volski, C.C. Cugini, E.M.Walsh, V.A.Chistyakov, M.S.Mazanko, A.B.Bren, L.M.T.Dicks, M.L. Chikindas, Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895, *Advances in Microbiology*, 6, 432–452(2016).
- [7]. J.L.Balcázar, I.de Blas, I.Ruiz-Zarzuola, D.Cunningham, D. Vendrell, J.L. Múzquiz, , The role of probiotics in aquaculture, *Veterinary Microbiology*, 114, 3–4, 173–186(2006).
- [8]. H.A.Hong, J.M.Huang, R.Khaneja, L.V.Hiep, M.C.Urdaci, S.M.Cutting, The safety of and *Bacillus indicus* as food probiotics, *J Appl Microbiol*, 105, 510–520 (2008).
- [9]. B. Kosin, S.K. Rakshit, Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonous thermotolerant probiotics for application to white shrimp feed, *Aquaculture*, 306, 1–4, 302–309 (2010).
- [10]. Y. Leyton, C. Riquelme, Marine *Bacillus* spp. associated with the egg capsule of *Concholepas concholepas* (common name “loco”) have an inhibitory activity toward the pathogen *Vibrioparahaemolyticus*, *Microbial Ecology*, 60, 3, 599–605 (2010).
- [11]. Trần Lộc, Hoàng Phúc, Nguyễn Thịnh, D.V. Lightner, Thí nghiệm xác định đường lây của tác nhân gây bệnh của hội chứng hoại tử gan tụy cấp (AHPNS) hay hội chứng tôm chết sớm (EMS), *Aquaculture Pathology Laboratory*, School of Comparative Animal and Biomedical (2012).
- [12]. T. Loc, L. Nunan, R.M. Redman, L.L. Mohny, C.R. Pantoja, K. Fitzsimmons, D.V. Lightner, Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp, *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 45–55 (2013).
- [13]. W. Purivirojkul, Areechon, Application of *Bacillus* spp. isolated from intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from natural habita for control pathogenic bacteria in aquacult, *Kasetsart J. (Nat. Sci)*, 41, 125–132 (2007).
- [14]. B. Vaseeharan, P. Ramasamy, Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Letters in Applied Microbiology*, 36, 2, 83–87 (2003).