

SCREENING, EVALUATING RESISTANCE TO *Vibrio parahaemolyticus* AND ACTIVITY IN ORGANIC DECOMPOSITION OF *Bacillus* ISOLATED FROM SHRIMP PONDS IN KIEN GIANG PROVINCE

Hong Mong Huyen^{1*}, Nguyen Truong Duy¹, Ngo Thi My Tran¹, Lai Thi My Uyen¹, Nguyen Thi Phuong¹, Pham Trong Nghia¹, Hong Phuc Nguon², Tran Thi Tuyen Hoa³, Nguyen Thi Truc Linh^{4*}

¹Kien Giang University, ²Ca Mau Investment Promotion and Enterprise Support Center

³Can Tho University, ⁴Tra Vinh University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 20/11/2023	The study was conducted to evaluate the resistance to <i>Vibrio parahaemolyticus</i> bacteria causing acute hepatopancreatic necrosis disease (<i>Vp_{AHPND}</i>) of <i>Bacillus</i> strains, which were isolated from shrimp samples, mud and water in intensive shrimp farming ponds in Hon Dat district and Kien Luong district of Kien Giang province. The study isolated 23 strains of <i>Bacillus</i> . Among the isolates, 11 strains were able to resist <i>Vp_{AHPND}</i> , with antibacterial diameters ranging from 1.33 - 17.33 mm. In particular, the <i>Bacillus</i> TCN3 strain attained the highest antibacterial ability. At a density of 10 ⁷ CFU/mL, strain TCN3 has the ability to completely kill <i>Vp_{AHPND}</i> at a density of 10 ⁴ CFU/mL. Moreover, the TCN3 isolate also has the ability to kill <i>Vp_{AHPND}</i> in many different environmental conditions of pH, temperature, and salinity. The above results provide scientific evidence demonstrating the ability of <i>Bacillus</i> to resist <i>Vp_{AHPND}</i> and are the first step to select and produce supplementary products containing <i>Bacillus</i> that are resistant to bacteria that cause acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp.
Revised: 26/6/2024	
Published: 26/6/2024	
KEYWORDS	
<i>Bacillus</i>	
Isolation	
Kien Giang province	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
<i>Vp_{AHPND}</i>	

SÀNG LỘC, ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG *Vibrio parahaemolyticus* VÀ HOẠT TÍNH PHÂN GIẢI HỮU CƠ CỦA VI KHUẨN *Bacillus* PHÂN LẬP TỪ AO NUÔI TÔM Ở TỈNH KIÊN GIANG

Hồng Mộng Huyền^{1*}, Nguyễn Trường Duy¹, Ngô Thị Mỹ Trân¹, Lại Thị Mỹ Uyên¹, Nguyễn Thị Phương¹, Phạm Trọng Nghĩa¹, Hồng Phúc Nguon², Trần Thị Tuyết Hoa³, Nguyễn Thị Trúc Linh^{4*}

¹Trường Đại học Kiên Giang, ²Trung tâm xúc tiến đầu tư và hỗ trợ doanh nghiệp Cà Mau

³Trường Đại học Cần Thơ, ⁴Trường Đại học Trà Vinh

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 20/11/2023	Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng kháng vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính của các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> được phân lập từ mẫu tôm, bùn và nước ao nuôi tôm thâm canh ở huyện Hòn Đất và Kiên Lương tỉnh Kiên Giang. Nghiên cứu phân lập được 23 chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> ; trong đó, 11 chủng có khả năng kháng <i>Vp_{AHPND}</i> , với đường kính kháng khuẩn dao động từ 1,33-17,33 mm. Đặc biệt, tuyển chọn được chủng <i>Bacillus</i> TCN3 có khả năng kháng khuẩn cao nhất. Ở mật số 10 ⁷ CFU/mL, chủng TCN3 có khả năng diệt hoàn toàn <i>Vp_{AHPND}</i> ở mật số 10 ⁴ CFU/mL. Đồng thời, TCN3 còn có khả năng diệt <i>Vp_{AHPND}</i> ở nhiều điều kiện môi trường khác nhau về pH, nhiệt độ, độ mặn. Kết quả trên cung cấp các luận chứng khoa học minh chứng khả năng kháng <i>Vp_{AHPND}</i> của <i>Bacillus</i> và là bước đầu trong nghiên cứu tuyển chọn và sản xuất chế phẩm chứa <i>Bacillus</i> kháng vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm.
Ngày hoàn thiện: 26/6/2024	
Ngày đăng: 26/6/2024	
TỪ KHÓA	
<i>Bacillus</i>	
Phân lập	
Tỉnh Kiên Giang	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
<i>Vp_{AHPND}</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9258>

* Corresponding author. Email: truclinh@tvu.edu.vn

1. Giới thiệu

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mang plasmid có sự hiện diện gen độc tố Photorhabdus insect-related (Pir: *PirA*, *PirB*) được xem là tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) trên tôm [1], [2]. Đặc biệt gen độc tố có thể được truyền từ loài vi khuẩn *Vibrio* này sang loài vi khuẩn *Vibrio* khác [2], [3]. Do đó, hiện nay đã xác định có nhiều loài *Vibrio* cũng mang gen độc lực (độc tố) này bao gồm *V. harveyi* và *V. campbellii*, *V. punensis*, *V. owensii* [2], [3]-[7]. Bệnh có khả năng gây chết cao, lên đến 100% đàn tôm, bệnh xuất hiện trên tôm ở thời điểm từ 30 đến 35 ngày kể từ giai đoạn postlarvae [8]-[10], ngoài ra bệnh còn xuất hiện ở giai đoạn tôm 46 - 96 ngày nuôi [11]. Sử dụng kháng sinh trong phòng và trị bệnh này trên tôm hiện nay đã gây nhiều tác động tiêu cực đến tăng trưởng và tồn lưu kháng sinh trong tôm hay xảy ra hiện tượng kháng kháng sinh [12].

Nhiều chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. đã được báo cáo có khả năng kháng được vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, chủ yếu nhờ vào khả năng sinh axit hữu cơ, hydrogen peroxide, siderophores, bacteriocin và lysozyme [13], các chủng này được phân lập từ nhiều nguồn gốc khác nhau [14]-[16]. Các chủng *Bacillus* được phân lập trực tiếp từ môi trường nuôi có hiệu quả chủ yếu như *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *Bacillus polyfermenticus*... [17]-[19]. Với ưu điểm đặc biệt của *Bacillus* là có khả năng sinh bào tử nên chúng dễ dàng sinh trưởng và phát triển cả trong môi trường nước cũng như trong hệ tiêu hóa của động vật thủy sản. Ngoài ra nhiều nghiên cứu xác định *Bacillus* có khả năng sinh enzyme ngoại bào, hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp thức ăn dễ hấp thụ, vật nuôi tăng trọng tốt và phân hủy các thức ăn tồn đọng trong ao, bên cạnh đó còn có khả năng làm sạch môi trường [20]-[21].

Hiện nay, các nghiên cứu về sự hiện diện và đánh giá vai trò của vi khuẩn có lợi trong ao nuôi tôm trên địa bàn tỉnh Kiên Giang vẫn còn hạn chế. Từ những thực tế và tồn tại đó thì việc phân lập và xác định khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, cũng như khả năng phân hủy hữu cơ của vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ ao nuôi tôm ở Kiên Giang là điều cần thiết. Kết quả này còn là cơ sở bước đầu cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo ra chế phẩm sinh học hiệu quả trong phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn

Mẫu tôm, bùn và nước được thu từ các ao nuôi tôm nước lợ ở 2 huyện Kiên Lương và Hòn Đất thuộc tỉnh Kiên Giang.

1 g (1 ml) mẫu cho vào ống nghiệm có chứa 9 mL nước muối sinh lý (0,85% NaCl), trộn đều sau đó mẫu được ủ ở 80°C trong 20 phút. Để nguội sau đó pha loãng mẫu 10^{-1} , 10^{-2} , sau đó rút 100 μ L mẫu đã pha loãng trải đều các mẫu trên đĩa môi trường Tryptic Soy Agar (Himedia, *Ấn Độ*) có bổ sung NaCl 1,5% (TSA⁺), ủ ở 28°C trong 24 giờ. Nhận diện khuẩn lạc *Bacillus* sp. theo mô tả của Boottanun [22].

Tất cả các khuẩn lạc nghi ngờ là vi khuẩn *Bacillus* sp. thông qua hình dạng khuẩn lạc được miêu tả sẽ được dùng để nhuộm Gram, kiểm tra tính di động, thử nghiệm oxidase, thử nghiệm catalase, khả năng sinh bào tử. (i) *Phương pháp nhuộm Gram*: Nhỏ 1 giọt nước cất lên lame, tiệt trùng que cấy, lấy 1 ít vi khuẩn trải đều lên giọt nước. Để khô tự nhiên, hơi lướt lame trên ngọn lửa đèn cồn để cố định vi khuẩn. Tiến hành nhuộm Gram, cụ thể, nhỏ dung dịch crystal violet lên lame, để yên 1 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất. Nhỏ dung dịch iodine lên lame, để yên 1 phút. Nhỏ từ acetone lên lame cho đến khi giọt nước trên lame không còn màu tím, rồi rửa lame lại bằng nước cất. Nhỏ dung dịch safranin lên lame, để 2 phút. Sau đó rửa lại bằng nước cất, để khô. Quan sát hình dạng và kích thước ở vật kính 100X có giọt dầu. (ii) *Phương pháp kiểm tra tính di động*: Nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý lên lame, tiệt trùng que cấy, lấy một ít vi khuẩn trải đều lên giọt nước. Đặt lamên lại, quan sát ở vật kính 40X. (iii) *Phương pháp kiểm tra oxidase*: Dùng que cấy lấy một ít vi khuẩn cho tiếp xúc trên que thử oxidase. Quan sát trong 30 giây và ghi nhận sự thay đổi màu sắc. (iv) *Phương pháp kiểm tra catalase*: Nhỏ 1 giọt dung dịch 3% H₂O₂ lên lame. Dùng que cấy

tiệt trùng lấy 1 ít vi khuẩn cho vào dung dịch 3% H₂O₂. Quan sát phản ứng sủi bọt với dung dịch 3% H₂O₂. (v) *Phương pháp kiểm tra khả năng sinh bào tử*: Dùng que cấy vô trùng lấy một ít vi khuẩn hòa vào 1 giọt nước cất ở giữa phiến kính, làm khô trong không khí, hơ nhanh vết bôi trên ngọn lửa đèn cồn 2-3 lần để vi khuẩn gắn chặt vào phiến kính. Nhuộm bằng dung dịch lục malachite trong 10 phút, rửa nước. Nhuộm lại bằng dung dịch safranin trong 30 giây, rửa nước, thấm khô. Quan sát tiêu bản trên kính hiển vi quang học với vật kính dầu có độ phóng đại 100X. Bào tử bắt màu xanh lục, tế bào chất bắt màu đỏ hồng [23], nhằm định danh các chủng vi khuẩn này đến giống *Bacillus*.

2.2. Phương pháp xác định khả năng kháng khuẩn của *Bacillus*

2.2.1. Phương pháp phục hồi vi khuẩn và xác định độc lực của chủng *V. parahaemolyticus* (CM1)

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (CM1) từ bộ sưu tập mẫu bệnh của Khoa NN&PTNT, Trường Đại học Kiên Giang được sử dụng cho các thí nghiệm của nghiên cứu. Trước khi thí nghiệm, chủng CM1 được định danh lại bằng kỹ thuật PCR.

DNA chiết tách và được pha loãng về nồng độ 200 ng/μL sẽ sử dụng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại gen đặc hiệu phát hiện vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính với trình tự mỗi AP4-F1: 5'-ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC-3', AP4-R1: 5'-ACGATTTTCGACGTTCCCCAA-3'; AP4-F2: 5'-TTGAGAATACGGGACGTG GG-3', AP4-R2: 5'-GTTAGTCATGTGAGCACCTTC-3'. Thành phần hóa chất tham gia phản ứng bước 1: 1X PCR buffer (5X), 3 mM MgCl₂ (25 mM), 200 μM dNTPs (10 mM), 5 mM mỗi AP4-F1 (10 mM); 5 mM mỗi AP4-R1 (10 mM), 1,5U Taq DNA polymerase (5U); 2 μL DNA (200 ng/μL) và tổng thể tích cho phản ứng là 25 μL. Điều kiện phản ứng bước 1: 94°C trong 2 phút, tiếp theo 94°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây với 30 chu kỳ, cuối cùng 72°C trong 2 phút. Thành phần hóa chất tham gia phản ứng bước 2: 1X PCR buffer (5X), 3 mM MgCl₂ (25 mM), 200 μM dNTPs (10 mM), 3,75 mM mỗi AP4-F2 (10 mM); 3,75 mM mỗi AP4-R2 (10 mM); 1,5U Taq DNA polymerase (5U); 2 μL sản phẩm PCR bước 1 và tổng thể tích cho phản ứng là 25 μL. Điều kiện phản ứng bước 2: 94°C trong 2 phút, tiếp theo 94°C trong 20 giây, 55°C trong 20 giây, 72°C trong 20 giây với 25 chu kỳ, cuối cùng 72°C trong 2 phút. Mẫu có vạch 1269 bp (sản phẩm PCR bước 1) và 230 bp (sản phẩm PCR bước 2) là chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính [24] để đảm bảo chủng này mang gen độc lực gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (*Vp_{AHPND}*).

2.2.2. Phương pháp vạch vuông góc

Dùng que cấy tuyệt trùng lấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, sau đó cấy thẳng lên bề mặt đĩa môi trường TSA⁺, tiếp tục dùng que cấy lấy chủng vi khuẩn *Bacillus* cấy thẳng vạch vuông góc với vạch đầu tiên. Ủ đĩa ở 28°C và quan sát sau 24 giờ để xác định khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của vi khuẩn *Bacillus* [25].

2.2.3. Phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính kháng khuẩn ở thí nghiệm vạch vuông góc sẽ được sử dụng để khảo sát khuếch tán đĩa thạch, nhằm xác định khả năng sản sinh chất diệt khuẩn. Cụ thể, trải chủng CM1 (mật số 10⁷ CFU/mL) lên đĩa môi trường TSA⁺. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* được nuôi trong môi trường Nutrient broth (Himedia, Ấn Độ) bổ sung NaCl 1,5% (NB⁺) sau 24 giờ thì tiến hành ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Sau đó rút 50 μL dịch nổi sau khi ly tâm cho vào giếng có đường kính 6 mm trên đĩa thạch đã trải chủng CM1. Để ổn định đĩa trong tủ lạnh trong 2 giờ và tiếp tục ủ ở 28°C trong 24 giờ. Đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng kháng khuẩn tạo thành [26].

2.2.4. Phương pháp đồng nuôi cấy

Chọn 01 chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính cao nhất ở thí nghiệm khuếch tán đĩa thạch dùng cho thí nghiệm đồng nuôi cấy. Cụ thể, vi khuẩn gây bệnh và dung dịch *Bacillus* được tăng sinh

trong NB⁺ sau 24 giờ. Dung dịch vi khuẩn cho vào các ống nghiệm có chứa 5 mL môi trường NB⁺, với tỉ lệ 1:1 sao cho mật số vi khuẩn cuối cùng ở mỗi ống nghiệm đạt 10⁴, 10⁵, 10⁶ và 10⁷ CFU/mL (Bảng 1). Đồng nuôi cấy dung dịch trên ở 28°C trong 2 ngày. Kiểm tra mật số vi khuẩn sau mỗi 24 giờ bằng cách đếm khuẩn lạc trên môi trường TCBS Agar (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, Himedia, Ấn Độ) [27].

Bảng 1. Thiết kế thí nghiệm đồng nuôi cấy

Nghiem thức	Nồng độ <i>Bacillus</i> (CFU/mL)	Nồng độ <i>Vp_{AHPND}</i> (CFU/mL)
NT1	10 ⁵	10 ⁴
		10 ⁵
NT2	10 ⁶	10 ⁴
		10 ⁵
		10 ⁶
NT3	10 ⁷	10 ⁴
		10 ⁵
		10 ⁶
		10 ⁷
ĐC1 (Không chứa chủng <i>Bacillus</i>)		10 ⁴
		10 ⁵
		10 ⁶
		10 ⁷
ĐC2 (Không chứa <i>V. parahaemolyticus</i>)	10 ⁵	
	10 ⁶	
	10 ⁷	

2.3. Phương pháp xác định khả năng kháng *Vp_{AHPND}* của vi khuẩn *Bacillus* ở các nồng độ pH, nhiệt độ và độ mặn khác nhau

Chọn chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng kháng *Vp_{AHPND}* cao được sử dụng để thực hiện thí nghiệm này. Cụ thể:

Khảo sát khả năng chịu mặn: Chuẩn bị môi trường NB bổ sung NaCl (1; 2; 3% (w/v)). Nuôi tăng sinh vi khuẩn *Bacillus* và tuyển chọn vi khuẩn gây bệnh trong môi trường NB⁺ ở 28°C trong 24 giờ. Thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm 7000 vòng/phút trong 5 phút. Hòa tan sinh khối bằng 1 mL nước muối sinh lý sau đó chuyển dịch huyền phù vi khuẩn vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường NB⁺ với mật số vi khuẩn theo kết quả thí nghiệm đồng nuôi cấy, nuôi lác ủ ở 28°C trong 24 giờ [28]. Sau đó 24 giờ, tiến hành xác định mật số vi khuẩn *Vp_{AHPND}* bằng phương pháp nhỏ giọt trên môi trường TCBS Agar [29].

Khảo sát khả năng chịu pH: Đồng nuôi cấy vi khuẩn thử nghiệm, vi khuẩn gây bệnh sau đó nuôi lác trong môi trường NB⁺ được thay đổi pH về các mức 6, 7, 8, 9. Cách tiến hành tương tự như ở độ mặn.

Khảo sát khả năng chịu nhiệt độ: Đồng nuôi cấy vi khuẩn thử nghiệm, vi khuẩn gây bệnh sau đó nuôi lác ở các mức 25, 30, 35, 40°C. Cách tiến hành tương tự như ở độ mặn.

2.4. Phương pháp xác định hoạt tính phân giải protein, tinh bột, cellulose

Chọn chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng kháng *Vp_{AHPND}* cao được sử dụng để thực hiện thí nghiệm này. Phương pháp thực hiện theo Tâm [30] bằng cách định tính khả năng sinh enzyme cellulase, amylase và protease phân giải cellulose, tinh bột và protein tương ứng. Cụ thể, chấm điểm chủng *Bacillus* lên đĩa môi trường starch Agar, CMC Agar, SM Agar (Himedia, Ấn Độ), sau đó ủ các đĩa khảo sát ở 28°C trong 24 giờ. Sử dụng các thuốc nhuộm lugol để hiện vòng phân giải trên đĩa thạch đối với xác định khả năng sinh enzyme cellulase, amylase phân giải cellulose và tinh bột của vi khuẩn *Bacillus*. Chúng có khả năng phân hủy hữu cơ khi xuất hiện vòng phân giải xung quanh điểm chấm vi khuẩn trên đĩa thạch.

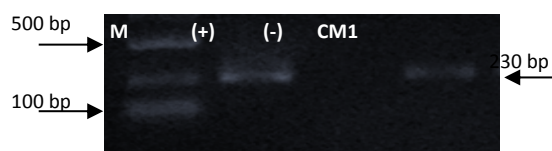
2.5. Tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *Bacillus*

Tính nhạy cảm kháng sinh của chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng kháng Vp_{AHPND} cao được xác định bằng phương pháp đĩa khuếch tán đĩa thạch (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI). Đặt các đĩa kháng sinh (levofloxacin 5 μ g (Lx), kanamycin 30 μ g (Kn), sulfamethoxazole/trimethoprim 23,75/1,25 μ g (Bt), doxycycline 30 μ g (Dx), tetracycline 30 μ g (Te)) trên bề mặt đĩa thạch có trải sẵn vi khuẩn *Bacillus*, sau đó ủ 28°C sau 24 giờ. Đo đường kính vùng ức chế tính theo mm.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả kiểm tra độc tính của chủng vi khuẩn CM1

Chủng vi khuẩn CM1 được kiểm tra lại độc lực gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính bằng kỹ thuật PCR với đoạn gen đặc hiệu [24]. Kết quả PCR chủng CM1 với sản phẩm khuếch đại là 230 bp (Hình 1), đoạn gen nằm trên plasmid 70 kbp pVA của chủng *V. parahaemolyticus*. Như vậy chủng vi khuẩn CM1 là chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm (Vp_{AHPND}), chủng này sẽ được sử dụng cho thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Bacillus*.



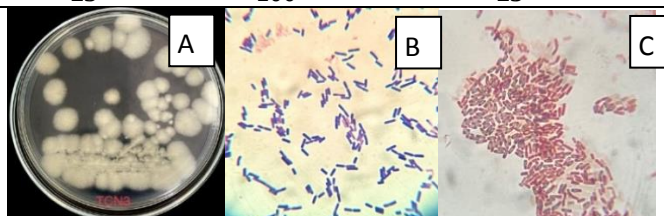
Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR đối với chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* CM1 (Vp_{AHPND}). Giếng M: thang DNA 1kb, giếng (+): đối chứng dương *V. parahaemolyticus*, giếng (-): đối chứng âm, giếng CM1: chủng vi khuẩn CM1

3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn *Bacillus* từ ao nuôi tôm

Nghiên cứu đã tiến hành thu được 25 mẫu, trong đó ở Kiên Lương có 19 mẫu (chiếm 76%) và Hòn Đất 6 mẫu (chiếm 24%) (Bảng 2). Từ các mẫu nêu trên đã phân lập được 23 chủng vi khuẩn *Bacillus*, các chủng này có sự tương đồng về các đặc điểm hình dạng khuẩn lạc (Hình 2A), vi khuẩn Gram dương hình que (Hình 2B), phản ứng dương tính với catalase, oxydase, có tính di động và sinh bào tử (Hình 2C) (Bảng 3) theo mô tả của các nghiên cứu trước đó [16], [19], [22].

Bảng 2. Kết quả phân lập vi khuẩn *Bacillus* từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh ở huyện Hòn Đất, Kiên Lương

Địa điểm	Mẫu thu	Tỷ lệ (%)	Chủng <i>Bacillus</i>	Tỷ lệ (%)
Hòn Đất	6	24	8	35
Kiên Lương	19	76	15	65
Tổng	25	100	23	100



Hình 2. Một số hình thái chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập. (A) Hình dạng khuẩn lạc, (B) Hình dạng tế bào nhuộm Gram, (C) hình dạng bào tử

Bảng 3. Kết quả hình thái khuẩn lạc và đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *Bacillus* phân lập

TT	Chủng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc						Đặc điểm sinh hoá				
		Bề mặt	Hình dạng	Màu sắc	Bia	Độ nổi	Gram	Hình dạng	Di động	Oxydase	Catalase	Bào tử
1	TCN6.1	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que ngắn	+	+	+	+
2	TCN6.2	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
3	TCT2.1	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
4	TCT4.1	Nhăn	Tròn	Trắng trong	Răng cưa	Nhò cao	+	Que ngắn	+	+	+	+
5	TCN6	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
6	TCT2b2	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
7	TCT2b3	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que ngắn	+	+	+	+
8	TCN2	Nhăn	Tròn	Trắng trong	Răng cưa	Nhò cao	+	Que ngắn	+	+	+	+
9	TCN3	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que ngắn	+	+	+	+
10	TCN4	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que ngắn	+	+	+	+
11	TCN10	Nhăn	Tròn	Trắng trong	Răng cưa	Nhò cao	+	Que ngắn	+	+	+	+
12	TCN4a1	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
13	TCN4b1	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
14	TCB6.1	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que ngắn	+	+	+	+
15	TCT5b1	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que ngắn	+	+	+	+
16	TCN2a	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
17	TCN2b1	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
18	TCN2b2	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
19	TCN3a	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que ngắn	+	+	+	+
20	TCN3b	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que ngắn	+	+	+	+
21	TCT2b1	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
22	TCN1	Trơn	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Phẳng	+	Que dài	+	+	+	+
23	TCN9	Nhăn	Tròn	Trắng trong	Răng cưa	Nhò cao	+	Que ngắn	+	+	+	+

3.3. Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* đối kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

3.3.1. Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của các chủng *Bacillus*

Kết quả khảo sát cho thấy 11/23 chủng vi khuẩn *Bacillus* thể hiện khả năng đối kháng với dòng vi khuẩn kiểm định (CM1) bằng phương pháp vạch cây vuông gốc (Hình 3A). Trong đó, số chủng *Bacillus* kháng V_{PAHPND} phân lập tại huyện Kiên Lương là 9 chủng (chiếm 82%) và huyện Hòn Đất là 2 chủng (chiếm 18%). 11 chủng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng với CM1 được sử dụng để khảo sát khả năng sản sinh chất diệt khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả cho thấy đường kính kháng khuẩn dao động từ 1,33-17,33 mm, trong đó hai chủng thể hiện khả năng kháng khuẩn cao là chủng TCT4.1 và TCN3 với đường kính kháng khuẩn lần lượt là 14 và 17,33 mm (Bảng 4, Hình 3B).

Bảng 4. Khả năng kháng khuẩn V_{PAHPND} của các chủng *Bacillus* phân lập

STT	Ký hiệu	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Địa điểm phân lập
1	TCN6.1	3,67	Kiên Lương
2	TCN6.2	4,33	
3	TCN2.1	2,00	
4	TCT4.1	14,00	
5	TCN6	3,33	
6	TCN2	2,67	
7	TCN3	17,33	
8	TCN4	2,67	
9	TCN10	3,00	
10	TCT2b2	3,00	Hòn Đất
11	TCT2b3	1,33	



Hình 3. Đặc điểm kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* của vi khuẩn *Bacillus* (TCN3). (A) Kết quả kháng khuẩn bằng phương pháp vạch vuông gốc, (B) Kết quả kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy *B. subtilis* có khả năng sinh bacteriocin AMPNT-6 (AMP

- Antimicrobial peptides) ức chế *V. parahaemolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn lên đến 15,5 mm [31]. Hay chủng *Bacillus polyfermenticus* F27 đối kháng *V. parahaemolyticus* NT7 với đường kính lớn nhất là 18,5 mm [15]. Ngoài ra, *Bacillus* được phát hiện có khả năng kháng các loài khác thuộc giống *Vibrio*. *B. pumilis* có khả năng đối kháng với *V. 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 [28], các chủng *B. subtilis* B1, *B. subtilis* B2, *B. amyloliquefaciens* B4 trong đó vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B4 là tốt nhất với đường kính vòng kháng khuẩn $52,67 \pm 4,31$ mm ở thời điểm 48h; hai chủng *B. subtilis* B1, *B. subtilis* B2 lần lượt là $49,67 \pm 3,15$ mm, $44,07 \pm 5,19$ mm [14]. Do vậy, trong nghiên cứu này đã phân lập được các chủng *Bacillus* sp. kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ở mức kháng và nhạy [32]. Đồng thời chủng vi khuẩn TCN3 thể hiện khả năng kháng khuẩn cao nhất được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

3.3.2. Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của chủng *Bacillus* TCN3 bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch và đồng nuôi cấy

Kết quả trình bày bảng 4 cho thấy khi có sự hiện diện của *Bacillus*, mật số *V. parahaemolyticus* sau 24 giờ và 48 giờ nuôi cấy giảm xuống chỉ còn 10^1 - 10^2 mặc dù mật số ban đầu là từ 10^4 - 10^7 (Bảng 5). Khi mật số *Bacillus* càng cao thì hiệu quả làm giảm *V. parahaemolyticus* càng nhanh và càng lớn. Nhìn chung sự phát triển hay kiểm hãm tác nhân *Vp_{AHPND}* phụ thuộc vào mật độ ban đầu của *V. parahaemolyticus* (CM1) và TCN3

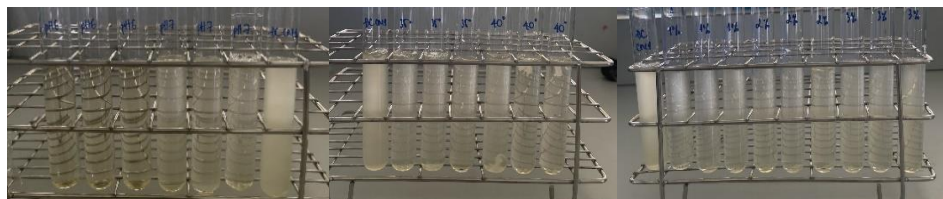
Bảng 5. Kết quả mật độ *V. parahaemolyticus* (CFU/mL) sau 24 và 48 giờ đồng nuôi cấy với chủng *Bacillus* (TCN3)

		Mật độ <i>V. parahaemolyticus</i> (CM1) ban đầu (CFU/mL)				
		Không chứa <i>V. parahaemolyticus</i>	10^4	10^5	10^6	10^7
<i>Sau 24 giờ đồng nuôi cấy</i>						
Không chứa <i>Bacillus</i> (TCN3)			$3,9 \times 10^7$	$5,9 \times 10^7$	$7,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
Chủng <i>Bacillus</i> (TCN3) 10^5	0		$2,7 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	-	-
Chủng <i>Bacillus</i> (TCN3) 10^6	0		$1,1 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$	-
Chủng <i>Bacillus</i> (TCN3) 10^7	0		0	$2,1 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$
<i>Sau 48 giờ đồng nuôi cấy</i>						
Không chứa <i>Bacillus</i> (TCN3)			$1,04 \times 10^8$	$5,9 \times 10^7$	$1,22 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
Chủng <i>Bacillus</i> (TCN3) 10^5	0		$5,5 \times 10^1$	$5,5 \times 10^1$	-	-
Chủng <i>Bacillus</i> (TCN3) 10^6	0		0	$1,5 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$	-
Chủng <i>Bacillus</i> (TCN3) 10^7	0		0	0	$1,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$

Cạnh tranh về dinh dưỡng và tiết ra chất kháng sinh có thể là các cơ chế mà chủng TCN3 đã thực hiện để ức chế *Vp_{AHPND}* trong thí nghiệm đồng nuôi cấy. Cũng tương tự như các nghiên cứu trước đây, Nghiên cứu của Phụng và ctv [19] chủng *Bacillus* B1 bắt đầu từ nồng độ 10^5 CFU/mL có khả năng ức chế hoàn toàn *Vp_{AHPND}* trong 24 giờ khảo sát. Hay các chủng *Bacillus* (CM3.1, TV1.2 và CM2.2) từ nồng độ 10^5 CFU/mL có khả năng ức chế *Vp_{AHPND}* trong 120 giờ khảo sát [16]. Vaseeharan and Ramasamy [27] 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. Trong điều trị *in-vitro* và *in-vivo* *Bacillus* sp. có khả năng ức chế được *V. harveyi*, làm giảm mật độ vi khuẩn *V. harveyi* từ 10^6 xuống 10^5 CFU/mL trong thời gian 24 đến 48 giờ. Như vậy, so với các nghiên cứu trước đây chủng TCN3 từ mật độ 10^5 CFU/mL có khả năng ức chế *Vp_{AHPND}* trong 48 giờ nuôi chung [25].

3.3.3. Khả năng kháng *Vp_{AHPND}* của chủng *Bacillus* TCN3 ở các nồng độ pH, nhiệt độ và độ mặn khác nhau

Kết quả khảo sát khả năng kháng *Vp_{AHPND}* ở các giá trị pH khác nhau cho thấy chủng vi khuẩn TCN3 mật độ 10^7 CFU/mL có khả năng ức chế hoàn toàn *Vp_{AHPND}* mật độ 10^4 CFU/mL ở các giá trị pH 6, 7, 8 và 9. Kết quả tương tự, chủng TCN3 có khả năng ức chế *Vp_{AHPND}* ở các nhiệt độ 20, 25, 30 và 35°C sau 24 giờ nuôi cấy. Ở độ mặn 1; 2; 3% chủng TCN3 cũng ức chế sự phát triển của *Vp_{AHPND}* (Hình 4).



Hình 4. Sự phát triển của vi khuẩn *VpAHPND* khi nuôi chung với chủng *Bacillus* TCN3 ở các nồng độ pH, nhiệt độ và độ mặn khác nhau

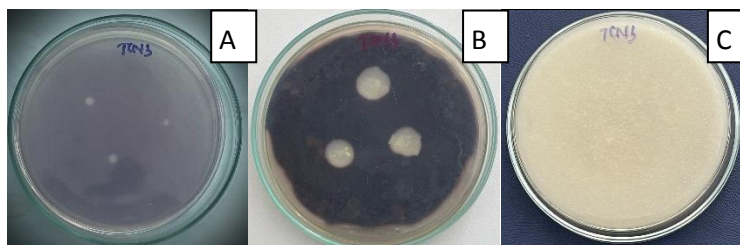
Theo nghiên cứu của Phúc và ctv. [33] chủng *Bacillus* BN1 và BD23.1 sinh trưởng và phát triển tốt ở pH 5-9. Chủng *B. subtilis* BRB2.1 và *B. siamensis* BDK2.3 phát triển đạt mật số cao nhất ở giá trị pH là 7,0 sau 24 giờ nuôi, ngoài ra ở pH 5,0 đến 8,0 sự phát triển của hai chủng này không khác biệt có ý nghĩa thống kê [34]. Ngoài ra, một số nghiên cứu trước đây chứng minh các chủng *Bacillus* có khả năng chịu được phổ muối từ 0,5-4% [19], [34]. *Bacillus* có khoảng nhiệt độ phát triển tối ưu rộng trong khoảng giá trị 26-40°C [34]. Điều này cho thấy các chủng *Bacillus* đều có khả năng chống chịu pH, độ mặn và nhiệt độ khá rộng và việc chủng TCN3 có khả năng thích ứng với các yếu tố này và không ảnh hưởng đến khả năng sản sinh chất diệt khuẩn.

3.3. Tính nhạy cảm kháng sinh và hoạt tính phân giải protein, tinh bột, cellulose của chủng *Bacillus* TCN3

Kết quả cho thấy chủng TCN3 không thấy có sự giải các hợp chất hữu cơ (Bảng 6, Hình 5), tuy nhiên chủng này đều nhạy với năm loại kháng sinh thử nghiệm (Bảng 6). Chủng vi khuẩn được chọn để tạo chế phẩm probiotic phải đảm bảo tính còn nhạy với nhiều loại kháng sinh thì có tính an toàn về mặt sinh học càng cao, nên chúng sẽ không chứa plasmid hoặc các gene kháng kháng sinh của các kháng sinh được sử dụng [35].

Bảng 6. Kết quả kháng kháng sinh và phân giải hợp chất hữu cơ của chủng vi khuẩn *Bacillus* (TCN3)

Ký hiệu chủng	Đường kính kháng khuẩn kháng khuẩn (mm)					Hoạt tính phân giải hợp chất hữu cơ		
	Lv	Kn	Bt	Dx	Te	Cellulose	Tinh bột	Protein
TCN3	33,5	22,5	32	28	17,5	-	-	-



Hình 5. Đặc điểm phân giải hữu cơ của chủng vi khuẩn *Bacillus* (TCN3). (A) Phân giải tinh bột, (B) Phân giải cellulose, (C) Phân giải protein

Tuy nhiên chủng TCN3 rất có tiềm năng trong phòng bệnh *VpAHPND* rất cao. Do đó, cần được giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA của chủng TCN3 để định danh đến loài và tiếp tục nghiên cứu tác động của chủng TCN3 lên miễn dịch và khả năng kháng bệnh *Vibrio parahaemolyticus* của tôm thẻ chân trắng.

4. Kết luận

Phân lập được 23 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. bao gồm 8 chủng ở huyện Hòn Đất và 15 chủng ở huyện Kiên Lương. Trong đó có 11 chủng có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* với đường kính kháng khuẩn dao động từ 1,33-17,33 mm.

Chủng *Bacillus* TCN3 có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* với đường kính kháng khuẩn 17,33 mm. Sau 24 giờ đồng nuôi cấy, *Bacillus* làm cho mật số của *V. parahaemolyticus* chỉ còn

10^2 CFU/ml dù mật số ban đầu là từ 10^4 - 10^7 CFU/mL. Ngoài ra TCN3 có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* trong điều kiện môi trường khác nhau về pH, nhiệt độ, độ mặn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] L. Tran, L. Nunan, R. M. Redman, L. L. Mohny, C. R. Pantoja, K. Fitzsimmons, and D. V. Lightner, "Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp," *Dis Aquat Organ*, vol. 105, pp. 45-55, 2013.
- [2] H. Kondo, P. T. Van, L. T. Dang, and I. Hirono, "Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam," *Genome Announc*, vol. 3, pp. 1110-1128, 2015.
- [3] J. Xiao, L. Liu, and Y. Ke, "Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species," *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 42177-42177, 2017.
- [4] X. Dong, H. Wang, G. Xie, P. Zou, C. Guo, Y. Liang, and J. Huang, "An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the pirVP gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease," *Emerging Microbes & Infections*, vol. 6, p. 2, 2017.
- [5] L. Liu, J. Xiao, M. Zhang, W. Zhu, X. Xia, X. Dai, Y. Pan, S. Yan, and Y. Wang, "A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*," *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 153, pp. 156-164, 2018.
- [6] L. Restrepo, B. Bayot, S. Arciniegas, L. Bajana, I. Betancourt, F. Panchana, and A. Reyes Munoz, "PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal *Orientalis* clade," *Sci Rep.*, vol. 8, p. 13080, 2018.
- [7] L. Xiaosha, L. Zhou, Y. Shuling, and W. Yongjie, "Complete genome sequence analysis of the *Vibrio owensii* strain SH-14 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease," *Archives of Microbiology*, vol. 202, pp. 1097-1106, 2020.
- [8] NACA, *Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: EMS/AHPNS*, Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand, 2012.
- [9] FAO, *Report of the FAO/MARD Technical Workshop on EMS or AHPNS of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, 25-27 June 2013*. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053, Rome, Italy, pp. 54, 2013.
- [10] X. Hong, L. Lu, and D. Xu, "Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)," *Aquac. Int.*, vol. 24, no. 2, pp. 577-593, 2016.
- [11] L. D. De La Peña, N. A. Cabillon, D. D. Catedral, E. C. Amar, R. C. Usero, W. D. Monotilla, A. T. Calpe, D. D. Fernandez, and C. P. Saloma, "Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines," *Dis Aquat Org*, vol. 116, pp. 251-254, 2015.
- [12] B. Xie, J. Qin, H. Yang, X. Wang, Y. H. Wang, and T. Y. Li, "Organic aquaculture in China: A review from a global perspective," *Aquaculture*, vol. 414, pp. 243-253, 2013.
- [13] A. Farzanfar, "The use of probiotics in shrimp aquaculture," *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 48, no. 2, pp. 149-158, 2006.
- [14] T. B. Đ. Nguyen, Q. K. V. Tran, V. K. Nguyen, and Q. L. Nguyen, "Isolation and selection of *Bacillus* strains resistance to *Vibrio parahaemolyticus* bacteria causing acute hepatopancreatic necrosis disease in Thua Thien Hue province," *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, vol. 100, no. 1, 2015.
- [15] V. M. Nguyen, A. T. Le, Q. L. Phan, N. L. Duong, K. Đ. Tran, N. Y. N. Vo, T. A. N. Tran, and T. N. T. Nguyen, "Biocontrol activity of *Vibrio parahaemolyticus* NT7 isolated from the shrimp AHPNS by *Bacillus polyfermenticus* F27 isolated from perionyx excavates," *Ho Chi Minh City Open University Journal of Science*, vol. 14, no. 1, pp. 71-83, 2019.
- [16] T. T. N. Pham, H. H. Vu, N. U. Vu, and T. G. Huynh, "Selection of *Bacillus* sp. bacteria having organic matter decomposition ability and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* causing disease in Penaeid shrimp," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 57, no. 3B, pp. 191-199, 2021.

- [17] M. A. Burford, E. L. Peterson, J. F. C. Baiano, and N. P. Preston, "Bacteria in shrimp pond sediments, their role in mineralizing nutrients and some suggested sampling strategies," *Aquaculture Research*, vol. 29, pp. 843-849, 1998.
- [18] A. Mahdhi, B. Harbi, M. Á. Esteban, K. Chaieb, F. Kamoun, and A. Bakhrouf, "Using mixture design to construct consortia of potential probiotic *Bacillus* strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*," *Biocontrol science and technology*, vol. 20, no. 9, 983-996, 2010.
- [19] H. P. Vo, T. H. Vo, T. H. N. Nguyen, H. P. Le, H. T. Nguyen, L. H. Nguyen, and T. B. T. Le, "Evaluation of antagonism properties of *Bacillus licheniformis* (B1) against *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) on shrimp in-vitro condition," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 54, no. 2, pp. 91-100, 2018.
- [20] F. K. Kuebutornye, E. D. Abarike, and Y. Lu, "A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture," *Fish & shellfish immunology*, vol. 87, pp. 820-828, 2019.
- [21] V. Hlordzi, F. K. Kuebutornye, G. Afriyie, E. D. Abarike, Y. Lu, S. Chi, and M. A. Anokyewaa, "The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review," *Aquaculture Reports*, vol. 18, pp. 100503, 2020.
- [22] P. Boottanun, C. Potisap, J. G. Hurdle, and R. W. Sermiswan, "Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*," *AMB Express*, vol. 7, no. 1, p. 16, 2017.
- [23] A. Oktari, Y. Supriatin, M. Kamal, and H. Syafrullah, "The bacterial endospore stain on schaeffer fulton using variation of methylene blue solution," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 812, no. 1, p. 012066, 2007.
- [24] S. Dangtip, R. Sirikharin, P. Sanguanrut, S. Thitamadee, K. Sritunyalucksana, and T. W. Flegel, "AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*," *Aquaculture Reports*, vol. 2, pp. 158-162, 2015.
- [25] W. Purivirojkul and N. Areechon, "Application of *Bacillus* spp. isolated from the intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) from natural habitat for control pathogenic bacteria in aquaculture," *Agriculture and Natural Resources*, vol. 41, no. 5, pp. 125-132, 2007.
- [26] R. Chythanya, I. Karunasagar, and I. Karunasagar, "Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain," *Aquaculture*, vol. 208, no. (1-2), pp. 1-10, 2002.
- [27] B. A. R. P. Vaseeharan and P. Ramasamy, "Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*," *Letters in applied microbiology*, vol. 36, no. 2, pp. 83-87, 2003.
- [28] V. D. N. Tran, V. D. Nguyen, and N. B. Vo, "Probiotic activity, classification characteristics and appropriate farming conditions of *Bacillus pumilus* B3.10.2 strain isolated on *Panulirus ornatus*," *Journal of Fisheries Science and Technology*, vol. 1, pp. 177-183, 2014.
- [29] H. Hoben and P. Somasegaran, "Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 44, no. 5, pp. 1246-1247, 1982.
- [30] N. T. T. Huynh and V. T. Huynh, "Characteristics of *Bacillus* spp. from white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Kien Giang province," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 56, no. 2B, pp. 44-52, 2020.
- [31] D. Xu, Y. Wang, L. Sun, H. Liu, and J. Li, "Inhibitory activity of a novel antibacterial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp," *Food control*, vol. 30, no. 1, pp. 58-61, 2013.
- [32] V. Lorian, "Antibiotics in laboratory medicine". In: J. F. Acar, and F. W. Goldstein (Eds.). Disk susceptibility test (4th ed.). London: William and Walkins Awaverly, p.1, 1995.
- [33] N. V. Phuc and P. T. P. Trang, "Isolation, identification and determination of beneficial properties of *Bacillus* spp. from shrimp ponds in Ben Tre province," *HCMUE J. Sci*, vol. 64, pp. 94-102, 2014.
- [34] A. X. Le, "Research and application of *Bacillus* sp. against *Vibrio parahaemolyticus* in industrial shrimp farming," Doctoral thesis, Can Tho University, p. 225, 2019.
- [35] H. Y. Le and Đ. H. Nguyen, "Evaluation of the probiotic properties of *Bacillus subtilis* strains isolated from the Mekong Delta," *Can Tho University Journal of Science*, no. Agriculture 2, pp. 26-32, 2016.