

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG PROBIOTIC CỦA VI KHUẨN *Bacillus* spp. TỪ TÔM THẺ CHÂN TRẮNG

Trần Văn Bé Năm¹, Huỳnh Đoàn Phượng Nga¹, Nguyễn Chí Nguyễn¹, La Hoàng Châu², Trần Hữu Hậu^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

²Công ty TNHH Khoa học Công nghệ ATREM

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn những dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. từ ruột tôm thẻ chân trắng có tiềm năng kiểm soát vi khuẩn gây bệnh đường ruột và đồng thời xử lý môi trường ao nuôi tôm. Các mẫu tôm được thu mua ở chợ An Hòa, chợ Hưng Lợi, chợ Xuân Khánh và chợ Tân An, thuộc quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ. Các dòng vi khuẩn được phân lập bằng phương pháp phân lập bào tử trên môi trường LB agar. Khả năng phân giải protein và tinh bột của chúng được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch. Khả năng ức chế *Vibrio parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn được đánh giá bằng phương pháp vạch thẳng vuông góc. Tiếp đó, khả năng kháng kháng sinh của chúng được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán qua đĩa giấy. Cuối cùng, các dòng vi khuẩn tiềm năng thu được sau các đánh giá trên được định danh bằng kỹ thuật phân tích trình tự gen 16S. Nhóm nghiên cứu đã phân lập được 5 dòng vi khuẩn BAH1, BHL5, BXX2, BXX4 và BTA4. Trong đó, dòng BHL5 có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* mạnh với đường kính vô khuẩn đạt 5,50 mm. Dòng BTA4 có khả năng phân giải protein và tinh bột mạnh nhất với đường kính phân giải lần lượt là 23,50 mm và 16,50 mm. Hơn thế, dòng BTA4 có thể kháng được 2 loại kháng sinh ampicillin (10 µg/mL) và tetracycline (30 µg/mL). Phân tích trình tự gen 16S đã xác định dòng BHL5 và BTA4 là *Bacillus* sp. và có độ tương đồng cao với các dòng vi khuẩn trong nhóm *Bacillus subtilis*.

Từ khóa: *Bacillus*, chịu mặn, chịu pH, phân giải hữu cơ, probiotic.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ứng dụng vi sinh, nhất là các chế phẩm sinh học probiotic, để xử lý chất thải hữu cơ, kiểm soát vi khuẩn gây bệnh và hỗ trợ tăng trưởng cho động vật thủy sản luôn là ưu tiên hàng đầu. Probiotic làm tăng số lượng vi khuẩn có lợi, sản xuất các hợp chất kháng khuẩn (bacteriocin), cạnh tranh dinh dưỡng và vị trí bám với mầm bệnh. Hơn nữa, probiotic còn tăng cường đáp ứng miễn dịch và tăng hiệu suất tăng trưởng của vật chủ (Natesan *et al.*, 2014). *Bacillus* là một trong những loài vi khuẩn được sử dụng làm probiotic vì chúng có khả năng phân giải chất hữu cơ, ức chế sự phát triển của vi khuẩn... *Bacillus subtilis* có thể giúp tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) và tôm sú (*Penaeus monodon*) chống lại bệnh Vibriosis do có khả năng tiết bacitracin, gramicidin, polymyxin, tyrothricin và có thể giúp kích thích hệ thống miễn dịch (Bestha *et al.*, 2013). Một số thử nghiệm đã được thực hiện về khả năng ứng dụng ức chế vi khuẩn của probiotic. Sự kết hợp giữa *B. subtilis* và *B. licheniformis* có thể ức chế được vi khuẩn *Yersinia ruckeri* gây bệnh trên cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*). *Bacillus* spp. cũng có thể ức chế được vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh ở cá ngựa vằn (*Danio rerio*) với liều sử dụng $1,5 \times 10^9$ CFU/mL trong 28 ngày (Doan *et al.*, 2021). Thêm vào đó, *Bacillus* còn có thể phân hủy các chất thải hữu cơ. *B. subtilis* BTV1 có khả năng tiết enzyme protease và amylase ngoại bào để phân hủy cơ chất là skim milk, tinh bột và thể hiện tiềm năng trong ứng dụng xử lý nước trong ao nuôi tôm (Hau *et al.*, 2024). Bên cạnh đó, việc phân lập probiotic trực tiếp từ môi trường nuôi hoặc từ cơ thể sinh vật thủy sản giúp cho việc ứng dụng chúng sau này trở nên thuận lợi do các chủng vi sinh vật đã thích nghi với môi trường ao nuôi thực tế. Với những ưu điểm của *Bacillus* spp. cùng khả năng thích nghi với môi trường, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn những dòng *Bacillus* spp. từ ruột tôm thẻ chân trắng có tiềm năng probiotic để ứng dụng trong kiểm soát vi khuẩn gây bệnh, phân hủy chất hữu cơ và xử lý môi trường trong ao nuôi tôm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu tôm thẻ chân trắng được thu mua ở chợ An Hòa, chợ Hưng Lợi, chợ Xuân Khánh và chợ Tân An, thuộc quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ.

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* - phân lập từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng ở huyện Trần Đề, tỉnh Sóc Trăng - được nhận từ Bộ môn Vi sinh vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn *Bacillus* từ ruột tôm thẻ chân trắng

Vi khuẩn *Bacillus* được phân lập bằng phương pháp phân lập bào tử theo mô tả của Hau và đồng tác giả (2024). Cụ thể, tôm sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm được khử trùng bề mặt với cồn 70%, tách lấy phần ruột, đồng nhất với 10 mL môi trường LB lỏng và đun cách thủy ở 80°C trong 20 phút (để loại bỏ tế bào sinh dưỡng). Sau khi xử lý với nhiệt độ, mẫu được pha loãng, trải trên môi trường LB agar, ủ ở nhiệt độ phòng (27±3°C) trong 24 giờ, quan sát hình thái và tách riêng các dòng vi khuẩn trên môi trường LB agar.

Khả năng phân giải chất hữu cơ

Khả năng phân giải protein và tinh bột được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch theo mô tả của Hau và đồng tác giả (2024). Huyền phù vi khuẩn được ly tâm lạnh (4°C) với tốc độ 12.000 rpm trong 15 phút và thu phần dịch nổi phía trên. Chuyển 10 µL vào các giếng (đường kính 6 mm) trên môi trường protein (skim milk agar) hoặc môi trường tinh bột (starch agar), ủ nhiệt độ phòng và sau 24 giờ tiến hành quan sát khả năng phân giải. Khả năng phân giải chất hữu cơ được tính bằng công thức:

$$\text{Khả năng phân giải } (\Delta D) = D - d$$

Trong đó: D: Đường kính vòng phân giải cơ chất (mm); d: Đường kính lỗ đục (mm).

Khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Khả năng ức chế vi khuẩn được khảo sát bằng phương pháp vạch thẳng vuông góc theo mô tả của Purivirojkul và đồng tác giả (2007). Cây vi khuẩn *Bacillus* theo một đường thẳng trên môi trường LB agar, ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tiến hành cấy vi khuẩn gây bệnh theo các vạch ngang vuông góc với vạch vi khuẩn *Bacillus*, tiếp tục ủ ở nhiệt độ phòng và sau 24 giờ tiến hành đo chiều rộng vùng kháng khuẩn.

Khả năng chịu kháng sinh

Khả năng chịu kháng sinh của các dòng vi khuẩn *Bacillus* được xác định bằng phương pháp khuếch tán qua đĩa giấy. Trải vi khuẩn trên môi trường LB agar, để khô tự nhiên trong 30 phút, sau đó đặt các đĩa giấy đã được tẩm kháng sinh (ampicillin - 10 µg/mL và tetracycline - 30 µg/mL) lên môi trường agar. Mức độ nhạy cảm với kháng sinh được đánh giá theo mô tả của Nithya và đồng tác giả (2013).

Khả năng chịu pH

Khả năng chịu pH được xác định bằng phương pháp nuôi trong môi trường LB lỏng và đếm khuẩn lạc theo mô tả của Arici và đồng tác giả (2004). Chuyển 1 mL vi khuẩn vào 9 mL môi trường LB lỏng (pH của môi trường ở các mức từ 7, 8 và 9, đây là ngưỡng thích hợp cho tôm thẻ phát triển). Sau đó, mẫu được ủ lắc (120 rpm) ở nhiệt độ phòng và xác định mật độ vi khuẩn sau 24 giờ.

Khả năng chịu mặn

Khả năng chịu mặn được xác định bằng phương pháp nuôi trong môi trường LB lỏng và đếm khuẩn lạc theo mô tả của Hau và đồng tác giả (2022). Chuyển 1mL vi khuẩn vào 9 mL môi trường LB lỏng (độ mặn của môi trường ở các mức từ 1, 2 và 3% NaCl, đây là ngưỡng thích hợp cho tôm thẻ phát triển). Sau đó mẫu được ủ lắc (120 rpm) ở nhiệt độ phòng và xác định mật độ vi khuẩn sau 24 giờ.

Khả năng bám dính

Khả năng tự bám dính được thực hiện theo mô tả của Algburi và đồng tác giả (2016). Sau khi được tăng sinh trong môi trường LB lỏng, vi khuẩn được thu thập bằng phương pháp ly tâm dịch nuôi cấy ở tốc độ 2.000 rpm trong 20 phút và thu tế bào vi khuẩn. Tế bào vi khuẩn được rửa 2 lần với dung dịch đệm PBS (NaCl 8,00 g/L; KCl 0,20 g/L; Na₂HPO₄ 1,44 g/L; KH₂PO₄ 0,24 g/L; pH = 7,4). Tiến hành đo OD ở bước sóng 600 nm và điều chỉnh mật độ vi khuẩn là 10⁸ CFU/mL. Vi khuẩn được nuôi trong ống nghiệm và kiểm tra mật số ở các mốc thời gian 0, 1, 2, 3 và 4 giờ. Khả năng bám dính được xác định bằng công thức:

$$\text{Khả năng tự bám dính } (\%) = (A_0 - A_t)/A_0 \times 100$$

Trong đó: A₀: Giá trị OD₆₀₀ của dung dịch ở 0 giờ; A_t: Giá trị OD₆₀₀ của dung dịch ở các mốc thời gian tương ứng.

Nhận diện vi khuẩn tuyển chọn

Dòng vi khuẩn *Bacillus* đã tuyển chọn được xác định loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Vùng trình tự 16S rDNA được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') và 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') với thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt được thực hiện theo mô tả của Thi và đồng tác giả (2022). Thành phần phản ứng với thể tích 50 µL gồm 25 µL nước khử ion, 20 µL Mytaq mix (Bioline, Anh), 1 µL mỗi mồi 27F và 1492R (20 µM), 3µL DNA mẫu. Chu kỳ nhiệt gồm các giai đoạn: tiền biến tính 95°C trong 3 phút; sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước: biến tính ở 95°C trong 1 phút, bắt cặp ở 56°C trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 2 phút; giai đoạn ổn định ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2%. Băng DNA sáng, rõ và không có băng phụ được giải trình tự tại công ty Trách nhiệm hữu hạn DNA

Sequencing. Kết quả giải trình tự được kiểm tra bằng phần mềm Bioedit và trình tự DNA được so sánh với cơ sở dữ liệu của Ngân hàng gen thông qua công cụ BLASTN (NCBI) để xác định ở mức độ loài.

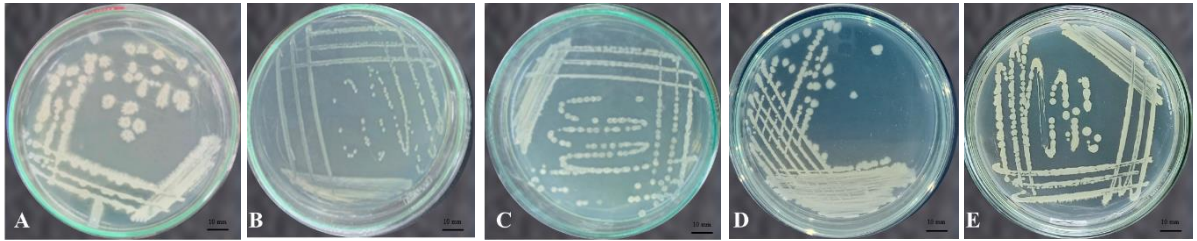
Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Minitab 16.0 để phân tích phương sai ANOVA và so sánh trung bình sự khác biệt bằng kiểm định Tukey. Sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel 2016 để vẽ các biểu đồ thể hiện các kết quả.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn *Bacillus*

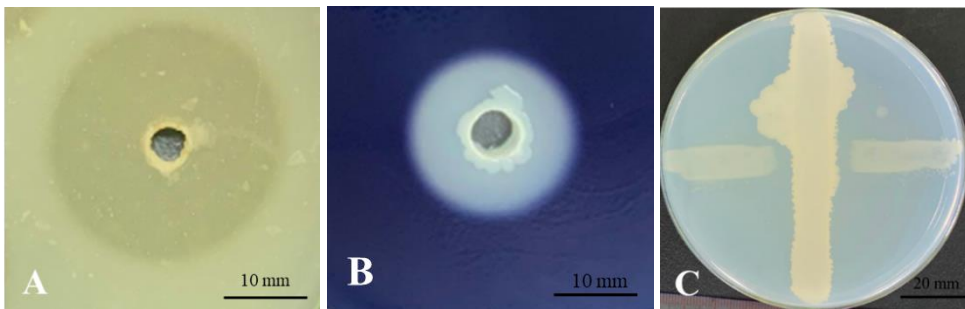
Năm dòng vi khuẩn đã được phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng dựa trên hình thái khuẩn lạc trên môi trường LB agar và hình thái tế bào được ghi nhận dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 100X sau 24 giờ nuôi cấy (Hình 1). Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn đa số có hình dạng không đều, lồi, màu trắng đục, bìa nguyên hoặc chia thùy và kích thước từ 1,5 đến 6,7 mm. Tất cả đều có tế bào hình que, Gram dương và có khả năng chuyển động.



Hình 1. Khuẩn lạc các dòng vi khuẩn
A: BHA1; B: BHL5; C: BXK2; D: BXK4; E: BTA4 trên môi trường LB agar.

Khả năng phân giải chất hữu cơ

Các dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh ra enzyme ngoại bào (amylase và protease) nhằm phân giải protein và tinh bột (bảng 1 và hình 2). Trong đó, khả năng phân giải protein và tinh bột của dòng BTA4 mạnh nhất lần lượt là 23,50 mm và 16,50 mm (khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng còn lại). Dòng BAH1, BXK2, BXK4 và BHL5 cũng có khả năng phân giải mạnh với đường kính vòng phân giải protein từ 19,50 mm và tinh bột từ 15,00 mm. Trong các công trình nghiên cứu trước đây, *Bacillus* có thể phân hủy được protein với đường kính vòng phân giải lớn hơn 20 mm, *Bacillus cereus* có thể phân giải tinh bột rất mạnh với đường kính vòng phân giải đạt 49,55 mm (Yerobessor *et al.*, 2022). Khả năng tiết enzyme của vi khuẩn giúp cho tôm tiêu hóa tốt hơn và dễ dàng hấp thu chất dinh dưỡng. Bên cạnh đó, những dòng vi khuẩn trong nghiên cứu còn có thể ức chế được vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, nổi trội nhất là dòng BHL5 (Bảng 1).



Hình 2. Kết quả thí nghiệm khả năng phân giải
A: Protein; B: Phân giải tinh bột; C: Ức chế *V. parahaemolyticus*.

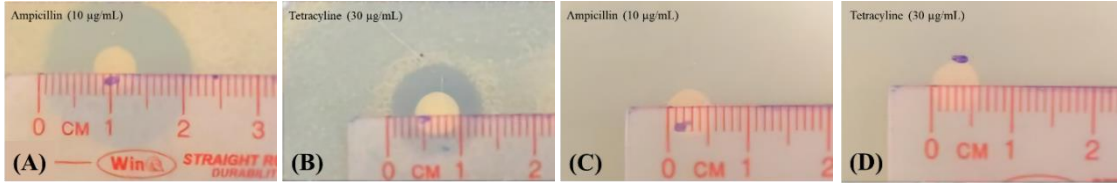
Bảng 1. Khả năng phân giải chất hữu cơ và ức chế *Vibrio parahaemolyticus*

Vi khuẩn	Phân giải protein (mm)	Phân giải tinh bột (mm)	Ức chế <i>V. parahaemolyticus</i> (mm)
BAH1	21,17 ^b ±0,29	15,33 ^b ±0,29	4,50 ^{ab} ±0,20
BHL5	21,50 ^b ±0,00	15,00 ^b ±0,00	5,50 ^a ±0,17
BXK2	21,00 ^b ±0,00	15,33 ^b ±0,29	4,00 ^b ±0,26
BXK4	19,50 ^c ±0,50	15,17 ^b ±0,50	3,80 ^b ±0,82
BTA4	23,50 ^a ±0,50	16,50 ^a ±0,50	3,90 ^b ±0,36

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột đi kèm theo các ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Khả năng chịu kháng sinh và khả năng bám dính

Các dòng vi khuẩn phân lập đều có thể chịu được điều kiện bất lợi như môi trường có chứa kháng sinh, môi trường có pH cao và môi trường có độ mặn cao. Dòng BTA4 có khả năng kháng lại ampicillin (10 µg/mL) và tetracycline (30 µg/mL). Dòng BHA1, BHL5, BXH2 và BXH4 đều nhạy cảm với 2 loại kháng sinh ở nồng độ như trên (Bảng 2 và Hình 3). Trong nghiên cứu của Melody và đồng tác giả (2021) đã phân lập và khảo sát khả năng kháng kháng sinh của 44 dòng vi khuẩn *Bacillus* và kết quả có 47,70% kháng lại với ampicillin (10 µg) và 4,50% dòng vi khuẩn kháng lại tetracycline (30 µg). Khả năng bám dính giúp vi khuẩn có thể sống bên trong hệ tiêu hóa của vật chủ tốt hơn. Sau 180 phút khảo sát, có hơn 60% lượng vi khuẩn BTA4, BHL5 bám vào bề mặt giá thể. BXK2, BXK4, BAH1 khả năng bám dính thấp hơn chỉ từ 46% (Bảng 2).



Hình 3. Kết quả kiểm tra khả năng kháng kháng sinh bằng đĩa giấy
A: Vi khuẩn BHA1 với ampicillin; B: Tetracycline; C: Vi khuẩn BTA4 với ampicillin; D: Tetracycline.

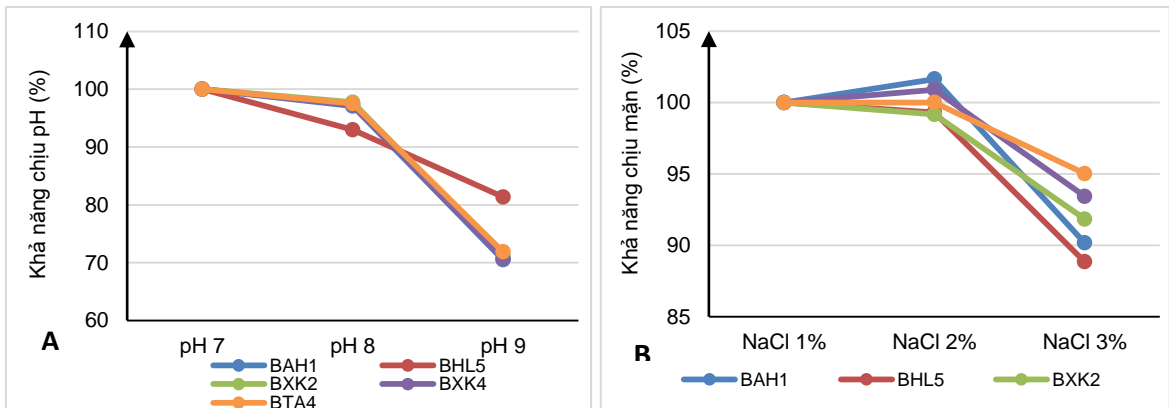
Bảng 2. Khả năng chịu kháng sinh và bám dính trên bề mặt giá thể

Vi khuẩn	Ampicillin (10 µg/mL)		Tetracycline (30 µg/mL)		Khả năng bám dính (%)		
	Đường kính (mm)	Tính nhạy cảm	Đường kính (mm)	Tính nhạy cảm	60 phút	120 phút	180 phút
BAH1	11,50	S ⁺	10,67	S ⁺	15,31 ^d ±0,83	39,04 ^c ±1,50	46,29 ^c ±1,22
BHL5	11,33	S ⁺	9,83	S ⁺	22,99 ^{bc} ±1,21	47,22 ^b ±0,88	61,24 ^a ±0,76
BXH2	19,67	S ⁺⁺	12,83	S ⁺	19,02 ^a ±1,61	35,38 ^a ±2,33	49,96 ^a ±1,47
BXH4	21,17	S ⁺⁺	13,17	S ⁺	25,30 ^{ab} ±3,26	38,23 ^c ±1,69	51,01 ^{bc} ±2,60
BTA4	6,00	R	6,00	R	28,77 ^b ±0,89	56,14 ^c ±0,55	62,40 ^b ±0,89

Ghi chú: R: Kháng (≤ 6 mm); S⁺: Nhạy cảm yếu ($6 < S^+ \leq 15$ mm); S⁺⁺: Nhạy cảm vừa ($15 < S^{++} \leq 26$ mm); S⁺⁺⁺: Nhạy cảm mạnh ($26 < S^{+++} \leq 35$ mm) (Nithya et al., 2013).

Khả năng chịu pH cao, độ mặn cao

Môi trường trung tính với pH 7 và mật số các dòng vi khuẩn khảo sát là 100%, khi pH môi trường tăng lên, mật số vi khuẩn có biểu hiện giảm xuống. Khi tăng pH đến 9, tỉ lệ sống sót của BHL5 là 81% và các dòng vi khuẩn còn lại đạt 71% (Hình 4A). Độ mặn phù hợp cho các dòng vi khuẩn phát triển từ 1 đến 2% (NaCl) và mật số giảm xuống khi độ mặn đạt 3% (hình 4B). Độ mặn từ 1,5 đến 2% và pH 7,5 đến 8,5 là phù hợp cho tôm thẻ chân trắng phát triển, nên dòng BTA4 rất có tiềm năng trong việc nghiên cứu chế phẩm sinh học trong xử lý môi trường nước trong ao nuôi tôm.



Hình 4. Kết quả khả năng chống chịu
A: Môi trường pH cao; B: Môi trường độ mặn cao.

Định danh vi khuẩn được tuyển chọn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Nhìn chung, dòng BHL5 có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mạnh, bám dính tốt, chịu pH cao. Dòng BTA4 có khả năng phân giải mạnh, chịu được độ mặn cao. Nên cả 2 dòng BHL5 và BTA4 được lựa chọn để định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Qua phân tích và so sánh trình tự vùng gen 16S rRNA với dữ liệu trên cơ sở dữ liệu về gen (NCBI) bằng công cụ BLASTN đã xác định BHL5 và BTA4 thuộc chi *Bacillus* (Bảng 3).

Bảng 3. Độ tương đồng trình tự vùng gen của khuẩn BHL5 và BTA4 với cơ sở dữ liệu NCBI

Vi khuẩn	Độ dài (nt)	Độ phủ (%)	Độ tương đồng (%)	Loài
BHL5	969	100	99,69	<i>Bacillus subtilis</i> (AY971362.1)
			99,59	<i>Bacillus velezensis</i> (PP930596.1)
			99,59	<i>Bacillus inaquosorum</i> (PP917517.1)
			99,59	<i>Bacillus tequilensis</i> (PP813694.1)
			99,59	<i>Bacillus stercoris</i> (PP794961.1)
BTA4	988	100	99,60	<i>Bacillus velezensis</i> (CP014990.2)
			99,60	<i>Bacillus siamensis</i> (OP317184.1)
			99,60	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP082283.1)
			99,50	<i>Bacillus subtilis</i> (PP930724.1)

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá và tuyển chọn được 2 dòng vi khuẩn có tiềm năng probiotic sử dụng cho nuôi trồng tôm thẻ chân trắng. *Bacillus* sp. BHL5 và *Bacillus* sp. BTA4 có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus*, phân hủy chất hữu cơ, chống chịu lại điều kiện môi trường có kháng sinh, chịu được pH cao và độ mặn cao. Nghiên cứu cần tiếp tục đánh giá khả năng ức chế các chủng vi khuẩn gây bệnh cho tôm thẻ chân trắng và khả năng xử lý chất hữu cơ ở quy mô bể nuôi tôm 1 m³.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Algburi A, Volski A, Cugini C, Walsh EM, Chistyakov VA, Mazanko MS, Bren AB, Dicks LM, Chikindas ML (2016). Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *J Adv Microbiol*, 6 (6): 432.

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

Bestha L, Buddolla V, Gopal DVRS (2013). Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *J Pathog*, 2013: 1-13.

Doan HV, Soltani M, Ring E (2021). In vitro antagonistic effect and in vivo protective efficacy of Gram-positive probiotics versus Gram-negative bacterial pathogens in finfish and shellfish. *Aquaculture*, 540.

Hau TH, Van TTB, Quynh CNT, Oanh TTH, Huy LAG, Luu NH, Thi NPA (2024). Inhibition of biofilm-forming bacteria and probiotic potential of *Bacillus* spp, isolated from aquaculture ponds. *Malays J Microbiol*, 20(4): 1-8.

Hau TH, Viet NA, Khang HN, Van TTB, Thi NPA (2022). Selection of bacteria capable of proteolytic and inhibitory *Vibrio* spp. from traditional fish sauce. *Can Tho University Journal of Science*, 58(2): 192-199.

Melody AA, Kwaku A, Yuan L, Yishan L, Felix K AK, Berchie A, Iddrisu S (2021). Prevalence of virulence genes and antibiotic susceptibility of *Bacillus* used in commercial aquaculture probiotics in China. *Aquac Rep*, 21: 1-14.

Natesan S, Gopal S, Perumal V, Balasubramaniam A (2014). *Lactobacillus* sp. a potent probiotic for disease free shrimp aquaculture. *Int J Recent Sci Res*, 5(6): 1031-1045.

Nithya V, Halami PM (2013). Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Ann Microbiol*, 63 (1): 129-137.

Purivirojkul W, Areechon N (2007). Application of *Bacillus* spp. isolated from the intestine of blacktiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from natural habitat for control pathogenic bacteria in aquaculture. *Kasetsart J (Nat Sci)*, 41: 125-132.

Thi NPA, Hau TH, Huynh NTN, Liem HV, Thi TKD, Hoa DH, Van TTB, Khang DT (2022). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Vietnamese sour-fermented fish product. *Malays J Microbiol*, 18(2): 222-226.

Yerobessor D, Namwin SS, Marius KS, Clarisse BC, Iliassou M, Lewis IE, Alfred ST, Jerry OU, Mamoudou HD (2022). Assessment of probiotic and technological properties of *Bacillus* spp. isolated from Burkina Faso. *BMC Microbiol*, 22: 228.

ISOLATION AND EVALUATION OF PROBIOTIC POTENTIAL OF BACTERIA *Bacillus* spp. FROM WHITE LEG SHRIMP

Tran Van Be Nam¹, Huynh Doan Phuong Nga¹, Nguyen Chi Nguyen¹, La Hoang Chau², Tran Huu Hau^{1*}

¹Institute of Food and Biotechnology, Can Tho university

²Scientific and Technological ATREM Co. Ltd.

SUMMARY

This study aimed to isolate *Bacillus* spp. from the gut of white-leg shrimp with potential for controlling gut-associated pathogens and treating aquaculture environments. Shrimp samples were collected from An Hoa, Hung Loi, Xuan Khanh, and Tan An markets in Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam. Bacterial strains were isolated using the spore isolation method on LB agar medium. Their protein and starch degradation abilities were assessed using the well diffusion method. The ability of the isolated strains to inhibit *Vibrio parahaemolyticus* was evaluated using the perpendicular streak method. Subsequently, their antibiotic resistance was assessed using the paper disc diffusion method. Finally, the potential bacterial strains obtained after these evaluations were identified using 16S rRNA gene sequence analysis. Among five isolated bacterial strains (BHA1, BHL5, BXK2, BXK4, and BTA4), the strain BHL5 exhibited strong inhibition of *V. parahaemolyticus* with a diameter of inhibition of 5.50 mm. Strain BTA4 showed the strongest protein and starch degradation abilities with degradation diameter of 23.50 mm and 16.50 mm, respectively. Moreover, strain BTA4 was resistant to two antibiotics, ampicillin (10 µg/mL) and tetracycline (30 µg/mL). 16S rRNA gene sequence analysis identified strains BHL5 and BTA4 as *Bacillus* sp. and showed high similarity to strains in the *Bacillus subtilis* group.

Keywords: *Bacillus*, salt tolerance, pH tolerance, organic decomposition, probiotic.

* Author for correspondence: Tel: 903836469; Email: thau@ctu.edu.vn