

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Mai

**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH ỨC CHẾ
Vibrio parahaemolyticus GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP CỦA VI
KHUẨN PHÂN LẬP TỪ AO NUÔI TÔM THỂ CHÂN TRẮNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2026

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Mai

**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH ỨC CHẾ
Vibrio parahaemolyticus GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP CỦA VI
KHUẨN PHÂN LẬP TỪ AO NUÔI TÔM THỂ CHÂN TRẮNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 24811020

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS. TS. Lê Thị Nhi Công

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày tháng năm 2026

Trần Thị Mai

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu tại Học viện Khoa học và Công nghệ – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tôi đã nỗ lực rèn luyện và hoàn thành bản luận văn Thạc sĩ thuộc lĩnh vực Sinh học thực nghiệm. Để có được kết quả này, trước hết tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Lê Thị Nhi Công cùng toàn thể cán bộ Phòng Công nghệ Sinh học môi trường – Viện Sinh học, những người đã tận tình chỉ dẫn, động viên và đồng hành cùng tôi trong mọi giai đoạn nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo, Khoa Sinh học, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ và toàn thể quý thầy, cô đã truyền đạt tri thức nền tảng và tạo điều kiện thuận lợi để tôi có thể hoàn thành và bảo vệ thành công luận văn.

Cuối cùng, tôi xin dành lời cảm ơn sâu sắc nhất tới gia đình – điểm tựa vững chắc và là nguồn động viên lớn lao đã luôn hy sinh, ủng hộ để tôi có được thành quả ngày hôm nay.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Tác giả

Trần Thị Mai

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG	viii
DANH MỤC HÌNH.....	ix
MỞ ĐẦU.....	1
TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Tổng quan ngành nuôi tôm thẻ chân trắng (<i>Litopenaeus vannamei</i>) và bệnh hoại tử gan tụy cấp	4
1.1.1. Tổng quan ngành nuôi tôm thẻ chân trắng (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	4
1.1.2. Vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> và bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm thẻ chân trắng	6
1.1.2.1. Đặc điểm sinh học của <i>V. parahaemolyticus</i>	6
1.1.2.2. Tình hình bệnh AHPND trên thế giới và tại Việt Nam	7
1.2. Vi khuẩn và hoạt chất từ vi khuẩn có khả năng kiểm soát <i>Vibrio parahaemolyticus</i> trên tôm.....	10
1.2.1. Vai trò của vi sinh vật có lợi trong kiểm soát <i>V. parahaemolyticus</i> trong nuôi tôm	10
1.2.2. Hoạt chất sinh học từ vi khuẩn và cơ chế tác động lên <i>V. parahaemolyticus</i>	12
1.3. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng các hoạt chất sinh học từ vi khuẩn bản địa trong kiểm soát bệnh do <i>V. parahaemolyticus</i> trên tôm thẻ chân trắng	17
1.3.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	17
1.3.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam.....	18
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. Vật liệu nghiên cứu	21
2.1.1. Vật liệu.....	21
2.1.2. Máy móc và thiết bị chính.....	21

2.1.3. Hoá chất.....	21
2.1.4. Môi trường nuôi cấy	21
2.2. Phương pháp nghiên cứu	21
2.2.1. Phương pháp lấy mẫu.....	22
2.2.2. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn có khả năng sinh các chất kháng <i>V. parahaemolyticus</i> gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng.....	22
2.2.4. Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào và tạo màng sinh học của các chủng lựa chọn	25
2.2.5. Tách chiết các hoạt chất sinh học từ vi khuẩn có khả năng ức chế <i>V. parahaemolyticus</i>	26
2.2.6. Phân tích thành phần hóa học của dịch chiết	27
2.2.6. Đánh giá hoạt tính kháng <i>V. parahaemolyticus</i> của dịch chiết chứa hoạt chất sinh học từ vi khuẩn bằng kỹ thuật khuếch tán trên đĩa thạch (theo Oonmetta-Aree và cộng sự, 2006) [65].....	28
2.2.7. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các hợp chất sinh học có nguồn gốc từ vi khuẩn kháng <i>V. parahaemolyticus</i>	28
2.2.8. Đánh giá độ bền và tính chất sinh học của các hoạt chất kháng <i>V. parahaemolyticus</i>	29
2.2.9. Phương pháp xử lý số liệu.....	30
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	31
3.1. Phân lập, sàng lọc và định danh các chủng vi khuẩn có khả năng kháng <i>V. parahaemolyticus</i> gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng	31
3.1.1. Kết quả phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn kháng <i>V. parahaemolyticus</i>	31
3.1.2. Đặc điểm hình thái và sinh học của các chủng vi khuẩn kháng <i>V. parahaemolyticus</i>	33
3.1.3. Định danh và phân loại các chủng vi khuẩn lựa chọn	38

3.2. Tách chiết, đánh giá hoạt tính kháng <i>V. parhaemolyticus</i> và xác định thành phần hóa học của hoạt chất sinh học từ vi khuẩn lựa chọn	42
3.2.1. Tách chiết và đánh giá hoạt tính kháng <i>V. parhaemolyticus</i> của dịch chiết chứa hoạt chất sinh học từ vi khuẩn	42
3.2.2. Xác định thành phần hóa học của dịch chiết ethyl acetate	45
3.3. Đánh giá hiệu quả ức chế và xác định nồng độ ức chế của các dịch chiết đã tách chiết được	53
3.3.1. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)	53
3.3.2. Độ bền nhiệt và độ ổn định pH.....	56
3.3.3. Ảnh hưởng của enzyme.....	58
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	60
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	61

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng anh	Tiếng việt
AHPND	Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease	Bệnh hoại tử gan tụy cấp
AMPs	Antimicrobial Peptides	Peptide kháng khuẩn
Biofilm	Biofilm	Màng sinh học
CFS	Cell-Free Supernatant	Dịch nổi sau ly tâm (không chứa tế bào)
EMS	Early Mortality Syndrome	Hội chứng chết sớm
FAO	Food and Agriculture Organization	Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hợp Quốc
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
LAB	Lactic Acid Bacteria	Nhóm vi khuẩn lactic
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry	Phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
NRPS	Non-Ribosomal Peptide Synthetase	Hệ enzyme tổng hợp peptide không phụ thuộc ribosome
NTTS	Aquaculture	Nuôi trồng thủy sản
OIE	World Organisation for Animal Health	Tổ chức Thú y Thế giới
OTC	Oxytetracycline	Oxytetracycline (một loại kháng sinh)
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase (kỹ thuật nhân bản DNA)
PKS	Polyketide Synthase	Hệ enzyme tổng hợp polyketide
RiPPs	Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides	Các peptide được tổng hợp qua ribosome và biến đổi hậu dịch mã

SEM	Scanning Electron Microscope	Kính hiển vi điện tử quét
TAN	Total Ammonia Nitrogen	Tổng hàm lượng nitơ amoniac
VASEP	Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers	Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam
VpAHPND	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> causing AHPND	Các chủng <i>Vibrio parahaemolyticus</i> gây bệnh hoại tử gan tụy cấp
XRD	X-Ray Diffraction	Nhiều xạ tia X

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Khả năng kháng <i>V. parahaemolyticus</i> của 02 chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu nước, bùn ao, tôm khoẻ và tôm bệnh tại ao nuôi tôm thẻ chân trắng	32
Bảng 3.2. Hình thái khuẩn lạc và tế bào các chủng vi khuẩn kháng <i>V. parahaemolyticus</i>	34
Bảng 3.3. Khả năng sinh các enzyme ngoại bào (cellulase, protease, amylase và lipase) của các 2 chủng vi khuẩn	37
Bảng 3.4. Kết quả phân loại của 2 chủng vi khuẩn được lựa chọn.....	40
Bảng 3.5. Hoạt tính kháng <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NT09 của các cao chiết từ hai chủng BL và B2 thu nhận bằng các dung môi khác nhau.....	43
Bảng 3.6. Giá trị MIC của các cao chiết từ hai chủng BL và B2 đối với <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NT09.....	54
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính kháng <i>Vibrio parahaemolyticus</i> của các cao chiết từ hai chủng BL và B2	56
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính kháng <i>V. parahaemolyticus</i> của các cao chiết từ hai chủng BL và B2	57
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của enzyme đến hoạt tính kháng <i>V. parahaemolyticus</i> của các dịch chiết từ hai chủng BL và B2	58

DANH MỤC HÌNH

Hình 1: Tỷ lệ nhiễm bệnh trên tôm giống và tôm thương phẩm từ năm 2022-2024 [3]	10
Hình 3.1. Khả năng kháng <i>V. parahaemolyticus</i> chủng B2 và BL.....	33
Hình 3.2. Hình thái tế bào chủng vi khuẩn BL và B2 dưới kính hiển vi điện tử quét ..	35
Hình 3.3. Kết quả đánh giá định tính khả năng sinh enzyme ngoại bào của 2 chủng vi khuẩn B2 và BL (A: Khả năng sinh protease; B: Khả năng sinh cellulase; C: Khả năng sinh lipase).....	36
Hình 3.5. Vị trí phân loại của các chủng vi khuẩn lựa chọn và các loài có quan hệ họ hàng gần	40
Hình 3.6. Hoạt tính kháng <i>Vibrio parahaemolyticus</i> của các cao chiết từ hai chủng BL và B2 thu nhận bằng dung môi ethyl acetate	43
Hình 3.7. Phổ UV của hoạt chất thu được; a) Bước song hấp thụ cực đại; b) Tạp chất hấp thụ ánh sáng	47
Hình 3.8. Phổ FTIR của hoạt chất thu được	48
Hình 3.9. Giảm đồ XRD của hoạt chất thu được	49
Hình 3.10. Kết quả LC-MS của hoạt chất thu được.....	51
Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của oxytetracycline	52

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, ngành nuôi trồng thủy sản phát triển mạnh mẽ, trong đó ngành nuôi tôm, đã đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp nguồn protein động vật chất lượng cao cho con người. Tuy nhiên, sự phát triển theo hướng thâm canh và siêu thâm canh cũng kéo theo nhiều rủi ro về dịch bệnh, trong đó nổi bật là các bệnh do vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* gây ra. Trong đó, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) được xem là một trong những bệnh nguy hiểm nhất, gây tỷ lệ chết cao, làm suy giảm năng suất, chất lượng sản phẩm và gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho người nuôi. *Vibrio parahaemolyticus* được xem là một trong các nguyên nhân gây bệnh AHPND.

Mặc dù *Vibrio parahaemolyticus* đã được xác định là tác nhân chính gây hội chứng AHPND ở tôm, việc kiểm soát hiện nay vẫn chủ yếu dựa vào kháng sinh. Tuy nhiên, sự lạm dụng kéo dài đã thúc đẩy sự xuất hiện của các chủng vi khuẩn kháng thuốc, gây khó khăn trong điều trị và làm gia tăng rủi ro an toàn thực phẩm do tồn dư hóa chất. Bên cạnh đó, kháng sinh còn phá vỡ cân bằng hệ vi sinh có lợi trong ao nuôi, dẫn đến suy giảm sức khỏe sinh thái. Trong bối cảnh các thị trường quốc tế ngày càng siết chặt quy định về dư lượng kháng sinh, việc nghiên cứu và áp dụng các giải pháp thay thế bền vững đã trở thành yêu cầu cấp thiết đối với ngành thủy sản.

Trong bối cảnh đó, việc ứng dụng các chủng vi khuẩn có lợi (probiotics), đặc biệt là những chủng được phân lập trực tiếp từ môi trường nuôi bản địa, đang nổi lên như một giải pháp đầy hứa hẹn. Các vi khuẩn bản địa không chỉ góp phần tái thiết lập cân bằng hệ vi sinh trong ao nuôi mà còn tạo ra hàng rào sinh học tự nhiên giúp ức chế sự xâm nhiễm của vi khuẩn gây bệnh. So với các chế phẩm ngoại nhập, nhóm vi khuẩn bản địa có ưu thế nổi bật nhờ khả năng thích nghi cao với điều kiện môi trường đặc thù như độ mặn, nhiệt độ và pH, qua đó giúp nhanh chóng thiết lập mật độ quần thể và duy trì hoạt tính sinh học ổn định, từ đó tối ưu hóa hiệu quả ức chế mầm bệnh.

Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây đã chú trọng đến việc khai thác những hợp chất sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật. Trong đó, bacteriocin – các peptide kháng khuẩn do vi khuẩn tổng hợp – được xem là một giải pháp thay thế đầy tiềm năng cho kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản. Nhiều chủng vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus*

subtilis, *B. pumilus*... đã được chứng minh có khả năng ức chế *Vibrio* thông qua nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm cạnh tranh dinh dưỡng và vị trí bám, tiết enzyme ngoại bào, sản sinh các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên (bacteriocin, peptide kháng khuẩn, acid hữu cơ, hợp chất phenolic, biosurfactant, ...) và kích thích hệ miễn dịch không đặc hiệu của vật nuôi cho thấy tiềm năng lớn trong phòng ngừa bệnh. Do đó, khai thác và tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn từ vi sinh vật bản địa mang lại giá trị khoa học lẫn thực tiễn, góp phần phát triển các chế phẩm sinh học phục vụ nuôi tôm theo hướng bền vững.

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* của các chủng vi sinh vật, nhưng các nghiên cứu tập trung vào việc tách chiết và ứng dụng các hợp chất sinh học từ vi khuẩn để kiểm soát *V. parahaemolyticus* trong nuôi tôm vẫn còn hạn chế, đặc biệt đối với các chủng vi khuẩn bản địa được phân lập từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng. Xuất phát từ thực tiễn đó, đề tài “**Nghiên cứu tuyển chọn và đánh giá đặc tính ức chế *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp của vi khuẩn phân lập từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng**” được thực hiện như một bước đi quan trọng nhằm định hướng phát triển các chế phẩm sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật.

Mục tiêu tổng quát của Đề tài:

Xác định các chủng vi khuẩn có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* và nồng độ ức chế tối thiểu của dịch chiết đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*,

Mục tiêu cụ thể:

- Tuyển chọn được ít nhất 02 chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn chống lại *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng

- Tách chiết được các nhóm hoạt chất sinh học (như bacteriocin) từ các vi khuẩn có lợi có khả năng ức chế hiệu quả chủng *V. parahaemolyticus* từ các chủng vi khuẩn đã phân lập và tuyển chọn

- Xác định nồng độ ức chế *V. parahaemolyticus* của các dịch chiết tách chiết được

Nội dung nghiên cứu:

*Nội dung 1: Phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh các chất kháng *V. parahaemolyticus*.*

- Thu thập và phân lập các chủng vi khuẩn từ các mẫu bùn và nước tại các ao nuôi tôm. Sau đó, tiến hành sàng lọc để tìm ra các chủng có khả năng sinh các chất kháng *V. parahaemolyticus*

- Nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào, cũng như các đặc điểm sinh lý, sinh hóa và phân loại các chủng vi khuẩn đã được lựa chọn.

Nội dung 2: Tách chiết các hoạt chất sinh học có khả năng ức chế V. parahaemolyticus từ các chủng vi khuẩn đã được chọn lọc.

Nội dung 3: Đánh giá hiệu quả ức chế và xác định nồng độ ức chế của các dịch chiết đã tách chiết được

TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan ngành nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) và bệnh hoại tử gan tụy cấp

1.1.1. Tổng quan ngành nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)

Trong hai thập kỷ gần đây, ngành nuôi trồng thủy sản (NTTS) toàn cầu đã có sự phát triển mạnh mẽ và trở thành một trong những lĩnh vực sản xuất thực phẩm có tốc độ tăng trưởng cao. Ngành này không chỉ cung cấp nguồn thực phẩm giàu protein mà còn đóng góp đáng kể vào tăng trưởng kinh tế thông qua việc gia tăng giá trị trong chuỗi sản xuất, chế biến và thương mại thủy sản [1]. Theo báo cáo của FAO, sản lượng NTTS không ngừng tăng trưởng cho thấy một xu hướng tất yếu: thay thế dần việc khai thác tự nhiên bằng các mô hình nuôi có kiểm soát và đạt hiệu suất cao.

Trong bối cảnh đó, nuôi tôm được xem là một trong những lĩnh vực phát triển năng động nhất của NTTS, nhờ giá trị kinh tế cao và nhu cầu tiêu thụ ngày càng gia tăng trên thị trường quốc tế. Trong số các đối tượng nuôi, tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) hiện chiếm ưu thế do tốc độ sinh trưởng nhanh, khả năng thích nghi rộng và hiệu quả chuyển hóa thức ăn cao. Theo báo cáo SOFIA 2022 của FAO, sản lượng tôm thẻ chân trắng toàn cầu đạt khoảng 5,81 triệu tấn vào năm 2020, chiếm tỷ trọng lớn trong tổng sản lượng tôm nuôi. Hoạt động nuôi tập trung chủ yếu tại các quốc gia như Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Việt Nam và Ecuador, trong đó Ecuador là một trong những quốc gia dẫn đầu về sản lượng.

Sự phát triển của nghề nuôi tôm thẻ chân trắng không chỉ thể hiện ở việc mở rộng quy mô mà còn ở sự cải thiện đáng kể về năng suất. Nhờ áp dụng các mô hình nuôi thâm canh và siêu thâm canh, năng suất có thể đạt trên 7 tấn/ha/năm trong điều kiện quản lý phù hợp; một số nghiên cứu tại Ấn Độ ghi nhận năng suất trung bình đạt khoảng $7,86 \pm 1,04$ tấn/ha/năm [2, 3]. Những kết quả này cho thấy tiềm năng lớn trong việc nâng cao sản lượng thông qua tối ưu hóa kỹ thuật nuôi.

Song song với sự gia tăng sản lượng, nhu cầu tiêu thụ tôm trên thị trường quốc tế tiếp tục tăng, tạo động lực mạnh mẽ cho việc mở rộng quy mô sản xuất. Theo số liệu từ Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (VASEP), nhu cầu nhập khẩu tôm tại Liên minh châu Âu trong năm 2024 tăng khoảng

14%, trong khi thị trường Nhật Bản ghi nhận mức tăng 11%. Sang nửa đầu năm 2025, kim ngạch xuất khẩu tôm của các quốc gia sản xuất lớn như Việt Nam và Ấn Độ tăng khoảng 25%, còn Ecuador đạt mức tăng trưởng gần 24% so với cùng kỳ năm trước [4, 5, 6]. Những xu hướng này tiếp tục khẳng định vai trò trọng yếu của ngành nuôi tôm trong chuỗi cung ứng thủy sản toàn cầu.

Tại Việt Nam, tôm thẻ chân trắng đã trở thành đối tượng nuôi chủ lực, đóng góp lớn vào tổng sản lượng cũng như giá trị xuất khẩu thủy sản. Theo thống kê của Cục Thủy sản, sản lượng tôm năm 2024 đạt khoảng 1,264 triệu tấn, trong đó tôm thẻ chân trắng chiếm khoảng 980.000 tấn, vượt xa sản lượng tôm sú (khoảng 284.000 tấn) [6]. Đồng thời, kim ngạch xuất khẩu tôm tăng khoảng 15% so với năm trước, cho thấy xu hướng chuyển dịch rõ rệt sang các đối tượng nuôi có năng suất cao và đáp ứng tốt yêu cầu thị trường.

Để tối ưu hóa sản lượng và lợi nhuận, nghề nuôi tôm thẻ chân trắng ở Việt Nam đã chuyển mạnh từ hình thức quảng canh sang các mô hình thâm canh và siêu thâm canh với mật độ thả nuôi cao. Tuy nhiên, việc gia tăng mật độ đã kéo theo nhiều thách thức về môi trường, đặc biệt là sự tích tụ mùn bã hữu cơ từ thức ăn dư thừa và chất thải của tôm. Hệ quả là chất lượng nước suy giảm, các chỉ số quan trọng như pH, oxy hòa tan và hàm lượng dinh dưỡng biến động bất lợi, làm mất cân bằng hệ sinh thái ao nuôi và gia tăng nguy cơ bùng phát dịch bệnh.

Những biến động môi trường này làm mất cân bằng hệ vi sinh vật và tạo điều kiện tối ưu cho sự phát triển của các nhóm vi khuẩn gây bệnh. Đáng quan tâm là các đại diện từ chi *Vibrio*, tiêu biểu là *Vibrio parahaemolyticus*, thường bùng phát mạnh về số lượng khi các yếu tố môi trường biến động xấu, trở thành nguồn cơn của những bệnh lý nghiêm trọng như hội chứng AHPND. Sự hoành hành của dịch bệnh này không đơn thuần gây sụt giảm sản lượng mà còn kéo theo những tổn thất tài chính nặng nề, trực tiếp đe dọa đến khả năng phát triển lâu dài của lĩnh vực nuôi tôm.

Trước tình hình đó, việc tìm kiếm các phương thức quản lý mầm bệnh dựa trên nền tảng sinh học, đảm bảo tiêu chí an toàn và thân thiện với môi trường đang trở thành một ưu tiên hàng đầu. Hướng tiếp cận này không chỉ giúp tiết chế việc sử dụng kháng sinh mà còn hỗ trợ bảo tồn sự ổn định của hệ vi sinh

vật bản địa, từ đó tối ưu hóa năng suất cho các mô hình nuôi tôm thẻ chân trắng hiện nay.

1.1.2. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm thẻ chân trắng

1.1.2.1. Đặc điểm sinh học của *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus là vi khuẩn Gram âm thuộc họ *Vibrionaceae*, phân bố rộng rãi trong các môi trường nước mặn và nước lợ, đặc biệt phổ biến tại các vùng ven biển, cửa sông và hệ thống nuôi trồng thủy sản [7, 8]. Loài vi khuẩn này được xem là một trong những thành phần quan trọng của hệ vi sinh vật tự nhiên trong môi trường nước, đồng thời cũng là tác nhân gây bệnh đáng chú ý đối với cả động vật thủy sản và con người.

*** Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa**

Về hình thái, *V. parahaemolyticus* có dạng trực khuẩn ngắn, hơi cong (comma-shaped), không sinh bào tử và không có vỏ. Vi khuẩn có khả năng di động nhờ một roi cực (polar flagellum), giúp tăng khả năng di chuyển và bám dính trong môi trường nước [8]. Ngoài ra, vi khuẩn còn có thể biểu hiện roi ngang (lateral flagella) khi phát triển trên bề mặt rắn, góp phần tăng khả năng lan rộng và hình thành khuẩn lạc [7].

Xét về phương diện sinh lý, *V. parahaemolyticus* được phân loại là nhóm vi sinh vật ưa mặn (halophilic), nghĩa là sự hiện diện của muối ăn (NaCl) là điều kiện tiên quyết cho các hoạt động sống của chúng. Theo các báo cáo khoa học trước đây [9] loài vi khuẩn này có thể phát triển trong dải nồng độ muối khá rộng, từ 0,5% đến 10%, nhưng đạt tốc độ sinh trưởng cực đại ở mức 2–3%. Bên cạnh đó, nhờ đặc tính hiếu khí tùy nghi (facultative anaerobe), chúng có thể duy trì sự tồn tại trong cả môi trường giàu oxy lẫn thiếu oxy, tạo nên khả năng thích ứng linh hoạt trước những biến động của hệ sinh thái ao nuôi [8].

Về đặc điểm sinh hóa, *V. parahaemolyticus* có phản ứng oxidase và catalase dương tính, là các đặc điểm quan trọng trong phân loại và nhận diện vi khuẩn [9]. Vi khuẩn có khả năng sử dụng đa dạng các nguồn carbon hữu cơ và tham gia vào quá trình chuyển hóa carbohydrate thông qua con đường lên men, tạo ra các sản phẩm axit [7]. Ngoài ra, loài này có khả năng bám dính mạnh và hình thành màng sinh học (biofilm), giúp tăng khả năng tồn tại trong điều kiện bất lợi và góp phần vào cơ chế gây bệnh [8].

*** Điều kiện sinh trưởng và phân bố trong môi trường nuôi tôm**

V. parahaemolyticus là vi khuẩn ưa nhiệt trung bình (mesophilic), với khoảng nhiệt độ sinh trưởng từ 10 đến 40°C, trong đó nhiệt độ tối ưu thường nằm trong khoảng 30–35°C [9]. Bên cạnh tính ưa mặn, loài vi sinh vật này còn sở hữu khả năng chống chịu trong dải pH khá rộng, dao động từ 5 đến 10. Tuy nhiên, theo các ghi nhận khoa học [7], ngưỡng pH lý tưởng nhất cho sự tăng trưởng của chúng nằm trong khoảng 7,5 đến 8,5 – vốn là các chỉ số đặc trưng trong môi trường nuôi tôm. Chính sự tương thích hoàn hảo về mặt điều kiện lý - hóa này là yếu tố then chốt giúp *V. parahaemolyticus* có thể khu trú và phát triển mạnh mẽ trong các mô hình nuôi tôm thâm canh hiện nay.

Trong môi trường nuôi tôm, *V. parahaemolyticus* có thể tồn tại dưới nhiều dạng khác nhau, bao gồm dạng sống tự do trong cột nước, bám trên các hạt hữu cơ lơ lửng, hoặc liên kết với sinh vật phù du và vật chủ thủy sản [7]. Vi khuẩn này có khả năng thích nghi nhanh với các biến động môi trường, đặc biệt trong điều kiện giàu chất hữu cơ, nơi mật độ vi khuẩn có thể tăng nhanh và chiếm ưu thế trong quần xã vi sinh vật [10].

Tại các mô hình nuôi tôm mật độ cao (thâm canh và siêu thâm canh), lượng chất thải và thức ăn dư thừa tích tụ quá mức đã làm tăng tải lượng hữu cơ, dẫn đến hiện tượng mất cân bằng hệ vi sinh vật (microbial dysbiosis). Trạng thái mất cân bằng này tạo điều kiện lý tưởng cho sự bùng phát của các loài *Vibrio* spp., đặc biệt là *V. parahaemolyticus* khi chúng nhanh chóng gia tăng mật độ và trở thành nhóm chiếm ưu thế trong quần thể vi khuẩn [10]. Chính vì vậy, việc theo dõi sự biến động của loài vi khuẩn này được xem là chỉ số quan trọng để dự báo rủi ro dịch bệnh và đánh giá mức độ ô nhiễm của môi trường ao nuôi.

1.1.2.2. Tình hình bệnh AHPND trên thế giới và tại Việt Nam

*** Tình hình dịch bệnh tại các quốc gia nuôi tôm chính**

AHPND do các chủng vi khuẩn thuộc chi *Vibrio*, chủ yếu là *Vibrio parahaemolyticus* mang gen độc lực đặc hiệu, đã trở thành một trong những mối đe dọa nghiêm trọng nhất đối với ngành nuôi tôm toàn cầu. Bệnh ảnh hưởng chủ yếu đến các loài tôm he có giá trị kinh tế cao như tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) và tôm sú (*Penaeus monodon*), với đặc trưng là tiến triển nhanh, tỷ lệ tử vong cao và khả năng lây lan rộng. Đáng chú ý, mức độ ảnh

hưởng của bệnh có sự khác biệt theo khu vực: tại châu Á, tỷ lệ tử vong chủ yếu xảy ra ở giai đoạn nuôi thương phẩm, trong khi tại khu vực Mỹ Latinh, tác động lớn hơn lại tập trung ở giai đoạn tôm giống và hậu ấu trùng. Sự khác biệt này có thể liên quan đến mật độ thả nuôi thấp hơn và phương thức quản lý khác biệt tại các trang trại ở Mỹ Latinh [11].

Tại Thái Lan, AHPND đã gây ra sự sụt giảm nghiêm trọng về sản lượng tôm nuôi. Trước khi dịch bệnh bùng phát, sản lượng tôm đạt khoảng 611.194 tấn vào năm 2011; tuy nhiên, đến giai đoạn 2014–2015, sản lượng chỉ còn khoảng 200.000 tấn, tương đương mức giảm trên 60% [12]. Bệnh được phát hiện lần đầu vào tháng 8 năm 2011 tại khu vực phía đông Vịnh Thái Lan, sau đó nhanh chóng lan rộng ra các tỉnh ven biển phía đông như Chantaburi, Rayong, Trat và Chachoengsao, trước khi lan sang các khu vực miền trung và miền nam, bao gồm Nakorn-Pathom, Chumphon, Surat Thani, Nakorn-Srithammarat, Songkhla, Krabi và Phuket [13, 14].

Tại Malaysia, AHPND được ghi nhận lần đầu vào năm 2010 tại các bang Pahang và Johor, sau đó lan rộng sang các bang khác như Perak, Penang và Kedah vào năm 2011. Trong giai đoạn tiếp theo, sự hiện diện của dịch bệnh lần lượt được ghi nhận tại Sabah, Sarawak (2012), Terengganu (2013), cũng như Melaka và Johor (2014). Đáng chú ý, tần suất xuất hiện của bệnh đã ghi nhận sự sụt giảm rõ rệt theo thời gian: từ mức đỉnh điểm 50% vào năm 2011 xuống còn 26% (2012), 34% (2013), và tiếp tục hạ thấp xuống 13% (2014), 4% (2015) [15, 14]. Kết quả này là minh chứng cho sự thành công của các chiến lược kiểm soát dịch tễ và nỗ lực tối ưu hóa môi trường nuôi trồng.

Tác động của AHPND tại Mexico đã dẫn đến một cuộc khủng hoảng về sản lượng tôm nuôi khi con số này bị kéo giảm hơn một nửa chỉ trong vòng 12 tháng. Cụ thể, sản lượng đã lao dốc từ mức 83.600 tấn vào năm 2012 xuống chỉ còn khoảng 39.300 tấn khi bước sang năm 2013. Tương tự, tại Philippines, các ca bệnh đầu tiên được ghi nhận vào năm 2015 tại các vùng Luzon, Visayas và Mindanao, với tỷ lệ lưu hành lần lượt là 33%, 21% và 5% [16].

Đáng chú ý, cũng đã được ghi nhận tại các quốc gia có trình độ công nghệ nuôi cao như Hàn Quốc và Nhật Bản. Tại Hàn Quốc, các đợt bùng phát xảy ra vào tháng 9–10 năm 2019 tại khu vực bán đảo Taean (tỉnh Chungnam) [17]. Tại Nhật Bản, một đợt bùng phát AHPND được ghi nhận tại tỉnh Okinawa

vào tháng 10 năm 2020, với tỷ lệ tử vong lên đến 98% [18], cho thấy mức độ nguy hiểm của bệnh ngay cả trong các hệ thống nuôi được kiểm soát tốt.

Theo các báo cáo kinh tế, bệnh AHPND gây tổn thất trực tiếp vượt mức 7 tỷ USD mỗi năm cho ngành nuôi tôm thế giới, với tổng thiệt hại lũy kế ước tính lên tới hàng chục tỷ USD [12]. Chính vì mức độ tàn phá nghiêm trọng và tốc độ lan truyền nhanh chóng giữa các vùng nuôi, Tổ chức Thú y Thế giới (OIE) đã chính thức xếp AHPND vào nhóm các dịch bệnh nguy hiểm bắt buộc phải khai báo [19].

*** *Thực trạng tại Việt Nam***

Tại Việt Nam, AHPND được ghi nhận lần đầu vào giai đoạn 2010–2011 tại bốn tỉnh ven biển thuộc Đồng bằng sông Cửu Long gồm Trà Vinh, Sóc Trăng, Cà Mau và Bạc Liêu, sau đó nhanh chóng lan rộng sang Tiền Giang, Bến Tre và Kiên Giang. Trong giai đoạn đầu bùng phát, bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng với khoảng 68,5% diện tích nuôi tôm tại Sóc Trăng bị ảnh hưởng, đồng thời có khoảng 30.000 hộ nuôi tại Bạc Liêu và Cà Mau chịu tác động [20].

Trong giai đoạn vừa qua, AHPND vẫn duy trì là mối đe dọa hàng đầu đối với ngành tôm tại Việt Nam. Theo các báo cáo giám sát từ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II (Trung tâm Quan trắc môi trường và Bệnh thủy sản Nam Bộ), tần suất xuất hiện của *V. parahaemolyticus* ghi nhận sự tăng trưởng đều đặn: từ mức 13,3% vào năm 2022, con số này đã tăng lên 15,0% trong năm 2023 và chạm mốc 19,2% khi bước sang năm 2024 (Hình 1) [21]. Sự gia tăng này cảnh báo rủi ro bùng phát dịch vẫn rất lớn khi các mô hình nuôi thâm canh ngày càng phổ biến.

Nhìn chung, AHPND tiếp tục là vấn đề nan giải trong nuôi tôm tại Việt Nam, nhất là khi tác nhân gây bệnh có khả năng lưu tồn dai dẳng và đang gia tăng mức độ lây lan. Điều này đòi hỏi sự chuyển đổi mạnh mẽ trong công tác quản lý dịch bệnh, nhằm thiết lập các biện pháp kiểm soát hiệu quả, vừa đảm bảo an toàn sinh học vừa duy trì tính bền vững của môi trường nuôi.



Hình 1: Tỷ lệ nhiễm bệnh trên tôm giống và tôm thương phẩm từ năm 2022-2024 [3]

Dù đã có những cải thiện trong công tác kiểm soát dịch bệnh, sự phụ thuộc vào kháng sinh trong nuôi tôm thâm canh vẫn là thực trạng đáng lo ngại. Việc lạm dụng kéo dài đã dẫn đến sự hình thành các dòng *Vibrio* đa kháng thuốc, đặc biệt là *V. parahaemolyticus*, khiến nhiều phác đồ điều trị mất hiệu lực và làm gia tăng nguy cơ dịch bệnh phức tạp. Ngoài ra, tồn dư kháng sinh trong sản phẩm không chỉ đe dọa an toàn thực phẩm mà còn góp phần vào hiện tượng kháng thuốc ở người. Đồng thời, hóa chất diệt khuẩn còn làm suy giảm quần thể vi sinh vật có lợi, gây mất cân bằng sinh thái ao nuôi và tạo điều kiện cho các tác nhân gây bệnh cơ hội phát triển.

Sự siết chặt các quy định về an toàn thực phẩm toàn cầu đang đặt ngành thủy sản trước yêu cầu phải thay đổi triệt để phương thức kiểm soát mầm bệnh. Việc loại bỏ dần sự phụ thuộc vào hóa chất và kháng sinh để chuyển sang các tác nhân sinh học an toàn hơn không còn là lựa chọn mà đã trở thành xu thế tất yếu. Trong bối cảnh đó, khai thác tiềm năng của hệ vi sinh vật có lợi và các hoạt chất sinh học nhằm đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* là hướng đi đầy triển vọng, giúp đảm bảo tiêu chuẩn xuất khẩu và tính bền vững cho hệ thống nuôi tôm thẻ.

1.2. Vi khuẩn và hoạt chất từ vi khuẩn có khả năng kiểm soát *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm

1.2.1. Vai trò của vi sinh vật có lợi trong kiểm soát *V. parahaemolyticus* trong nuôi tôm

Thay vì phụ thuộc vào kháng sinh, xu hướng hiện nay trong nuôi trồng thủy sản đang chuyển dịch sang việc ứng dụng các chế phẩm sinh học (probiotics) như một hướng đi bền vững. Đặc biệt, việc sử dụng các dòng vi

khuẩn bản địa – được chiết tách từ chính hệ sinh thái hoặc trên cơ thể đối tượng nuôi – đang cho thấy những lợi thế đáng kể so với các chủng vi khuẩn ngoại nhập. Sự vượt trội này đến từ khả năng tương thích cao với điều kiện môi trường địa phương, giúp nâng cao hiệu quả ức chế tác nhân gây bệnh và đảm bảo tính ổn định trong quá trình vận hành sản xuất.

Ưu thế hàng đầu của các dòng vi khuẩn nội tại chính là sự tương thích hoàn hảo với các điều kiện sinh thái đặc trưng trong hệ thống canh tác. Nhờ quá trình tiến hóa và chọn lọc tự nhiên ngay tại các vực nước nuôi, các chủng vi sinh này đã hình thành khả năng chịu đựng tốt trước những biến động khắc nghiệt của môi trường như độ kiềm (pH), nồng độ muối, nhiệt độ cũng như nồng độ chất hữu cơ cao. Nhờ đó, chúng có khả năng sinh trưởng và duy trì hoạt tính sinh học ổn định hơn so với các chủng ngoại lai khi được đưa vào môi trường nuôi [22]. Trong các hệ thống canh tác mật độ cao như thâm canh và siêu thâm canh, sự biến động liên tục của các chỉ số môi trường tạo điều kiện thuận lợi cho các tác nhân gây bệnh phát triển. Chính vì vậy, việc khai thác các vi khuẩn bản địa là hướng đi hiệu quả, bởi chúng đã được chứng minh [23, 24] là có khả năng sản sinh các phân tử ức chế sinh học có phổ kháng khuẩn phù hợp nhất với những mầm bệnh đang hiện hữu tại chính vùng nuôi đó. Các hoạt chất này có khả năng kháng được *V. parahaemolyticus* gây AHPND ở tôm. Điều này giúp nâng cao hiệu quả kiểm soát bệnh so với các chế phẩm probiotics thương mại có nguồn gốc ngoại lai.

Sử dụng vi khuẩn bản địa là giải pháp tối ưu để ngăn ngừa các biến động sinh thái tiêu cực do các chủng vi sinh ngoại lai gây ra. Sự hiện diện của các dòng vi khuẩn lạ đôi khi phá vỡ trật tự của quần xã vi sinh vật tự nhiên, gây ảnh hưởng xấu đến sự vận hành của hệ sinh thái ao nuôi. Do có sự tương thích sinh học cao, các chủng bản địa giúp củng cố hàng rào vi sinh vật tự nhiên, đảm bảo sự phát triển bền vững và thân thiện với môi trường nuôi trồng thủy sản [25].

Bên cạnh đó, các nhóm vi sinh vật bản địa còn ghi dấu ấn bởi năng lực tạo ra các phân tử kháng khuẩn tự nhiên có hiệu năng ức chế vi sinh vật đáng kể. Nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng những đại diện thuộc chi *Bacillus*, *Lactobacillus* cũng như một số nhóm vi khuẩn đặc hữu ở biển có thể tiết ra bacteriocin, các peptide kháng khuẩn và nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Sự

hiện diện của các hoạt chất này đóng đóng góp trực tiếp vào quá trình ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh [26]. Điều này khẳng định giá trị thực tiễn của việc sử dụng các chủng vi sinh vật bản địa làm nguyên liệu cốt lõi để chế biến các sản phẩm sinh học, nhằm kiểm soát và hạn chế rủi ro từ bệnh AHPND trong các hệ thống nuôi trồng thủy sản.

Các phân tích trên cho thấy vi khuẩn bản địa không chỉ có ưu thế về khả năng thích nghi và ổn định sinh thái mà còn thể hiện hiệu quả rõ rệt trong kiểm soát *Vibrio parahaemolyticus* và cải thiện môi trường nuôi. Đặc biệt, khả năng ức chế mầm bệnh của những dòng vi khuẩn này phần lớn bắt nguồn từ năng lực tổng hợp các phân tử sinh học có tính kháng khuẩn cao. Do đó, việc làm sáng tỏ bản chất hóa học cũng như phương thức tác động của các hợp chất này đối với *Vibrio parahaemolyticus* sẽ cung cấp những căn cứ khoa học thiết yếu. Đây chính là nền tảng để triển khai các quy trình chiết tách và ứng dụng các hoạt chất này vào thực tế nuôi trồng.

1.2.2. Hoạt chất sinh học từ vi khuẩn và cơ chế tác động lên V. parahaemolyticus

Các chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật sở hữu sự phong phú vượt trội về mặt cấu trúc hóa học lẫn phương thức ức chế, đóng vai trò then chốt trong năng lực kháng khuẩn của chúng. Căn cứ vào bản chất hóa học và các lộ trình chuyển hóa sinh tổng hợp đặc thù, những hợp chất này được phân chia thành các nhóm chức năng riêng biệt. Việc phân loại này giúp làm rõ mối liên hệ giữa cấu trúc, cơ chế tác động và tiềm năng ứng dụng của từng nhóm hoạt chất.

Về phương diện hóa học, các hoạt chất sinh học có nguồn gốc từ vi khuẩn được phân loại thành các nhóm chính như bacteriocin, peptide kháng vi sinh vật (antimicrobial peptides), lipopeptide, biosurfactant và các hợp chất chuyển hóa thứ cấp khác (bao gồm polyketide, phenazine, alkaloid...). Tuy nhiên, xét theo cơ chế sinh tổng hợp, các hợp chất này có thể được chia thành hai hệ chủ yếu gồm nhóm được tổng hợp qua ribosome (ribosomally synthesized peptides – RiPPs) và nhóm được tổng hợp không phụ thuộc vào ribosome thông qua các hệ enzyme đa chức năng như non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) và polyketide synthase (PKS). Sự kết hợp giữa hai phương diện phân loại nêu trên giúp thiết lập một cái nhìn toàn diện về sợi dây liên kết giữa cấu trúc hóa học,

lộ trình hình thành và cơ chế vận hành của các hoạt chất sinh học. Nhiều chủng vi khuẩn được ghi nhận có khả năng tiết đa dạng các nhóm hợp chất kháng khuẩn cùng lúc. Chính sự phối hợp nhịp nhàng giữa các cơ chế ức chế khác nhau đã tạo nên sức mạnh hiệp đồng, giúp nâng cao đáng kể hoạt lực và mở rộng phổ tác dụng chống lại mầm bệnh [26].

* **Bacteriocin**

Bacteriocin được biết đến là những peptide kháng khuẩn do vi khuẩn sản sinh thông qua quá trình dịch mã tại ribosome. Sau khi tổng hợp, chúng thường được biến đổi hậu dịch mã để hình thành các dạng cấu trúc phức tạp như peptide vòng hoặc lantibiotic. Về mặt chức năng, các hợp chất này tiêu diệt vi khuẩn mục tiêu bằng nhiều phương thức, trong đó nổi bật nhất là việc gây thủng màng tế bào dẫn đến thất thoát các thành phần nội bào, hoặc liên kết trực tiếp với Lipid II để ngăn chặn sự hình thành thành tế bào [26]. Nhờ các cơ chế tác động này, bacteriocin có khả năng ức chế hiệu quả nhiều vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt là vi khuẩn Gram dương.

Trong số các bacteriocin đã được nghiên cứu, nisin do *Lactococcus lactis* sinh ra là một trong những hợp chất tiêu biểu và được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm nhờ phổ kháng khuẩn mạnh và tính an toàn cao [27]. Tương tự, pediocin PA-1 từ *Pediococcus acidilactici* đã được chứng minh có khả năng tạo lỗ trên màng tế bào vi khuẩn, dẫn đến mất cân bằng ion và chết tế bào [28]. Ngoài ra, nhiều bacteriocin khác như plantaricin từ *Lactobacillus plantarum* và enterocin từ *Enterococcus spp.* cũng đã được ghi nhận với phổ tác động đa dạng và tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát vi sinh vật gây bệnh [29].

Trong quần thể vi sinh vật được nghiên cứu, các dòng thuộc chi *Bacillus* đang thu hút sự chú ý đặc biệt nhờ năng lực sản sinh phong phú các loại bacteriocin và lantibiotic có hoạt lực kháng khuẩn cao. Một ví dụ điển hình là lichenicidin, một lantibiotic hai thành phần được chiết tách từ *Bacillus licheniformis*. Hợp chất này thể hiện năng lực tiêu diệt diện rộng đối với vi khuẩn Gram dương bằng cách tấn công đồng thời vào tính toàn vẹn của màng sinh chất và quy trình sinh tổng hợp vách tế bào [30]. Bên cạnh đó, subtilin từ *Bacillus subtilis* cũng là một lantibiotic đã được nghiên cứu rộng rãi với cơ chế tương tự như nisin, bao gồm gắn với Lipid II và hình thành lỗ trên màng [31].

Các công bố vừa qua còn cho thấy nhiều chủng *Bacillus* có khả năng đồng thời sinh tổng hợp nhiều bacteriocin khác nhau, góp phần tạo nên hiệu ứng hiệp đồng trong hoạt tính kháng khuẩn. Dữ liệu về sự đa dạng cấu trúc và hoạt tính của bacteriocin, đặc biệt ở các chi như *Lactobacillus*, *Enterococcus* và *Bacillus*, cho thấy đây là nguồn hợp chất tiềm năng trong kiểm soát các vi khuẩn gây bệnh, bao gồm cả các loài thuộc chi *Vibrio* trong hệ thống nuôi trồng thủy sản.

* **Peptide kháng khuẩn**

Đây là nhóm peptide có kích thước nhỏ, thường mang điện tích dương và có cấu trúc lưỡng cực, cho phép chúng tương tác mạnh với màng tế bào vi sinh vật. Cấu trúc đặc trưng của AMP là nền tảng cho khả năng tương tác với nhiều vị trí đích khác nhau trên vi sinh vật. Các cơ chế này bao gồm sự phá vỡ rào cản màng tế bào, làm rối loạn chức năng enzyme nội bào và gây ức chế các giai đoạn trong quá trình tổng hợp axit nucleic cũng như protein. Đây chính là yếu tố then chốt tạo nên hoạt lực kháng khuẩn mạnh mẽ của nhóm hợp chất này [32]. Cơ chế tác động đa dạng giúp AMPs có phổ kháng khuẩn rộng và làm giảm nguy cơ hình thành tính kháng thuốc của vi khuẩn.

Trong số các peptide kháng khuẩn đã được định danh từ nhiều nguồn vi sinh vật, subtilisin A của *Bacillus subtilis* nổi bật với cấu trúc dạng vòng đặc trưng. Hợp chất này tiêu diệt vi khuẩn mục tiêu bằng cách thiết lập các kênh ion trên màng tế bào, gây ra sự mất kiểm soát tính thấm và làm thất thoát các dưỡng chất nội bào quan trọng, dẫn đến cái chết của tế bào. Cấu trúc 'lasso' đặc thù là nền tảng giúp các peptide này hình thành các liên kết bền vững với ribosome và RNA polymerase. Sự tương tác này dẫn đến việc vô hiệu hóa quá trình dịch mã cũng như phiên mã, khẳng định vai trò của lasso peptide như một nhóm tác nhân kháng khuẩn tiềm năng với cơ chế tác động nội bào chuyên biệt. Bên cạnh đó, các dòng vi khuẩn Gram âm như *Escherichia coli* còn sản sinh ra microcin – một nhóm AMPs đóng vai trò then chốt với khả năng thâm nhập trực tiếp và đình trệ các tiến trình sinh tổng hợp quan trọng bên trong tế bào đích. Những công bố khoa học mới đây đã xác nhận năng lực của nhiều chi vi khuẩn như *Bacillus spp.* và *Paenibacillus spp.* trong việc tổng hợp các peptide kháng khuẩn đa dạng. Nhờ con đường ribosome phối hợp cùng các bước chỉnh sửa sau dịch mã (RiPPs), nhóm hợp chất này sở hữu sự phong phú về cả hình thái cấu trúc lẫn phương thức đối kháng mầm bệnh. Đặc biệt, *Bacillus*

licheniformis đã được ghi nhận là nguồn tiềm năng của nhiều peptide kháng khuẩn mới với hoạt tính mạnh và cơ chế tác động đa dạng, mở rộng phạm vi ứng dụng trong việc ngăn chặn và tiêu diệt các tác nhân gây bệnh phổ biến hiện nay [33].

*** Lipopeptide**

Trong hệ thống các hoạt chất sinh học, lipopeptide được đánh giá là một trong những nhóm hợp chất giữ vị trí then chốt hơn cả, đặc biệt ở các loài thuộc chi *Bacillus*. Đây là các hợp chất được tổng hợp theo con đường tổng hợp peptide không ribosom (NRPS). Lipopeptide có cấu trúc gồm phần peptide liên kết với chuỗi axit béo, cho phép chúng tương tác mạnh với màng tế bào vi sinh vật. Ba họ lipopeptide phổ biến nhất là surfactin, iturin và fengycin, đã được ghi nhận sở hữu năng lực ức chế vi khuẩn, vi nấm và chống biofilm hiệu quả [34]. Đối với *Bacillus licheniformis*, hợp chất đặc trưng là lichenysin, một lipopeptide có cấu trúc tương tự surfactin nhưng có hoạt tính bề mặt mạnh hơn [35]. Ngoài ra, một số chủng *B. licheniformis* cũng được ghi nhận có khả năng sinh surfactin và iturin A, góp phần vào hoạt tính đối kháng sinh học [36].

*** Biosurfactant và các hợp chất chuyển hóa thứ cấp khác (polyketide, phenazine, alkaloid...)**

Sở hữu cấu trúc lưỡng cực đặc trưng, các biosurfactant (chủ yếu là glycolipid hoặc lipopeptide) giữ chức năng then chốt trong việc giảm thiểu sức căng bề mặt và định hình lại các thông số vật lý và hóa học của màng sinh chất. Cơ chế này cho phép chúng can thiệp trực tiếp vào cấu trúc của màng sinh học (biofilm), làm gia tăng độ thấm của màng và tạo ra rào cản ngăn ngừa sự cư trú và thiết lập liên kết bề mặt của các nhóm vi sinh vật có hại. Các ví dụ điển hình bao gồm rhamnolipid sản sinh từ *Pseudomonas aeruginosa* và surfactin từ các chủng *Bacillus* spp., vốn đã được khẳng định về năng lực kháng khuẩn cũng như ức chế biofilm mạnh mẽ [37, 38].

Ngoài biosurfactant, nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp khác với cấu trúc và cơ chế sinh tổng hợp đa dạng cũng góp phần quan trọng vào hoạt tính kháng khuẩn. Nhóm polyketide, được tổng hợp thông qua hệ enzyme polyketide synthase (PKS), bao gồm các hợp chất như difficidin và bacillaene từ *Bacillus* spp. hoặc erythromycin và tetracycline từ *Streptomyces* spp., sở hữu năng lực can thiệp trực tiếp và làm đình trệ các lộ trình sinh tổng hợp protein

cũng như sao chép DNA của vi khuẩn gây hại (Hertweck, 2009). Tương tự, các peptide không ribosome (non-ribosomal peptides – NRPs) như bacitracin, gramicidin và polymyxin được tổng hợp thông qua hệ enzyme NRPS, có khả năng gây tổn thương nghiêm trọng đến tính toàn vẹn của lớp màng sinh chất hoặc đình chỉ hoạt động của các hệ enzyme then chốt [39].

Ngoài ra, sự hiện diện của các hợp chất dị vòng chứa nitơ như phenazine (ví dụ pyocyanin, phenazine-1-carboxylic acid) do *Pseudomonas spp.* và *Streptomyces spp.* sinh ra có khả năng gây stress oxy hóa nội bào thông qua việc tạo các dạng oxy phản ứng, dẫn đến tổn thương DNA, protein và màng tế bào [40]. Một cơ chế kháng khuẩn gián tiếp khác được ghi nhận là sự cạnh tranh dinh dưỡng thông qua siderophore – các hợp chất có khả năng tạo phức mạnh với sắt (Fe^{3+}) như bacillibactin, pyoverdine và enterobactin. Việc thu nhận sắt hiệu quả giúp vi khuẩn sản sinh siderophore chiếm ưu thế trong sinh trường, đồng thời hạn chế tối đa quá trình nhân thực và lan rộng của hệ vi sinh vật có hại trong môi trường ao nuôi cạnh tranh [41].

Ngoài ra, một số enzyme kháng khuẩn như chitinase, protease và lysozyme do *Bacillus spp.* và *Streptomyces spp.* tiết ra cũng góp phần phá hủy cấu trúc thành tế bào hoặc màng sinh học của vi khuẩn và vi nấm, qua đó tăng cường hiệu quả đối kháng [38]. Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp phân tử nhỏ khác như bacilysin, chlorotetaine và amicoumacin A, được sinh tổng hợp thông qua con đường ribosome kết hợp với biến đổi hậu dịch mã hoặc các hệ NRPS/PKS, cũng đã được chứng minh có khả năng ức chế enzyme thiết yếu và quá trình tổng hợp thành tế bào [31, 42].

Các kết quả nghiên cứu tổng hợp đã khẳng định rằng hoạt chất sinh học có nguồn gốc từ vi khuẩn, bao gồm bacteriocin, peptide kháng vi sinh vật, lipopeptide, biosurfactant và các hợp chất chuyển hóa thứ cấp khác, không tồn tại và tác động một cách độc lập mà thường phối hợp theo cơ chế hiệp đồng. Trong đó, các hợp chất như lipopeptide và biosurfactant đóng vai trò phá vỡ cấu trúc màng và biofilm, tạo điều kiện cho các peptide kháng khuẩn và polyketide xâm nhập và ức chế các quá trình nội bào như tổng hợp protein, DNA hoặc enzyme. Đồng thời, thông qua việc tiết siderophore, các vi sinh vật có lợi có thể cô lập nguồn sắt hóa trị ba trong môi trường ao nuôi. Sự thiếu hụt dưỡng chất quan trọng này khiến vi khuẩn gây bệnh rơi vào trạng thái suy yếu

sinh lý và mất khả năng phát triển mật số một cách hiệu quả, trong khi các hợp chất tạo stress oxy hóa và enzyme kháng khuẩn tiếp tục gia tăng mức độ tổn thương tế bào. Sự kết hợp đa cơ chế này tạo nên hiệu quả kháng khuẩn mạnh và phổ tác động rộng, đồng thời làm giảm nguy cơ hình thành tính kháng thuốc, qua đó những kết quả này đã xác lập nền tảng vững chắc về triển vọng ứng dụng của các dòng vi khuẩn tiết hoạt chất sinh học trong việc quản lý mầm bệnh, hướng tới mục tiêu phát triển các giải pháp an toàn sinh học chuyên biệt cho ngành nuôi trồng thủy sản.

1.3. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng các hoạt chất sinh học từ vi khuẩn bản địa trong kiểm soát bệnh do *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng

1.3.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Hiện nay, báo cáo quốc tế đang chuyển dịch trọng tâm sang việc tìm kiếm và sàng lọc các dòng vi sinh vật nội tại từ những hệ sinh thái thủy sản đa dạng như môi trường nước, bùn đáy ao cũng như hệ microbiome đường ruột của đối tượng nuôi. Những chủng bản địa này không chỉ là nguồn nguyên liệu sinh học quý giá mà còn thể hiện độ thích nghi vượt trội đối với các yếu tố môi trường địa phương, góp phần duy trì trạng thái cân bằng động và củng cố tính bền vững của quần xã vi sinh vật trong hệ thống ao nuôi. Trong tình hình việc lạm dụng kháng sinh đã gây xáo trộn nghiêm trọng đến những hệ lụy về kháng thuốc và ô nhiễm, việc khai thác hoạt chất kháng khuẩn tự nhiên từ vi khuẩn bản địa đang trở thành một xu thế tất yếu và bền vững [43, 44].

Quá trình tuyển chọn các dòng vi khuẩn mới tập trung vào khả năng kìm hãm sự phát triển của *Vibrio spp.* – nhóm vi khuẩn cơ hội gây ra những biến chứng nguy hiểm cho ngành tôm, với trọng tâm là việc kiểm soát hội chứng AHPND hiện nay. Những nghiên cứu thực nghiệm đã làm sáng tỏ rằng vi khuẩn bản địa có thể vô hiệu hóa *Vibrio* thông qua nhiều con đường khác nhau. Các cơ chế này bao gồm việc tiết các phân tử kháng sinh và bacteriocin, giải phóng các enzyme ngoại bào có khả năng phân giải như protease hay chitinase, hoặc gây nhiễu loạn hệ thống quorum sensing – 'ngôn ngữ' giao tiếp điều khiển độc lực của mầm bệnh [45, 46]. Hướng đi này thể hiện ưu thế kép: vừa đảm bảo khả năng ức chế vi khuẩn mục tiêu, vừa hỗ trợ ngăn chặn sự lan truyền của các

gen kháng kháng sinh thông qua việc giảm áp lực chọn lọc sinh học tại thực địa.

Thay vì chỉ tập trung vào một loại hoạt chất cố định, xu hướng nghiên cứu hiện nay đang ưu tiên sàng lọc các dòng vi khuẩn nội tại có năng lực tổng hợp đồng thời nhiều nhóm hợp chất sinh học khác nhau. Điển hình cho hướng tiếp cận đa mục tiêu này là công trình của Jiang và các cộng sự (2023). Nhóm tác giả đã thành công trong việc phân lập hai chủng *B. subtilis* HLJ1 và *B. pumilus* C1 từ nguồn nước ao nuôi, cả hai đều cho thấy khả năng ức chế mạnh mẽ đối với tác nhân gây bệnh *V. parahaemolyticus*. Cả hai chủng đều không mang gen độc lực, có khả năng hình thành bào tử, tiết enzyme ngoại bào, đồng thời thể hiện khả năng tự kết tụ và đồng kết tụ với *Vibrio* [47]. Hợp chất đối kháng chính được xác định là AI-77-F; đáng chú ý, ở mật độ ban đầu đủ cao, chủng C1 có thể ức chế hoàn toàn *V. parahaemolyticus* trong mô hình nước thải mô phỏng sau 48 giờ.

Nhìn chung, các nghiên cứu quốc tế cho thấy tiềm năng ứng dụng của các hoạt chất sinh học từ vi khuẩn bản địa trong kiểm soát *Vibrio* được triển khai theo hai hướng chính. Thứ nhất là sử dụng trực tiếp các chủng vi khuẩn bản địa như các chế phẩm probiotic hoặc tác nhân kiểm soát sinh học. Thứ hai là khai thác dịch nuôi cấy hoặc các hợp chất tinh sạch do vi khuẩn sinh tổng hợp, điển hình như amicoumacin A, surfactin hoặc các enzyme quorum-quenching. Trong đó, hướng tiếp cận thứ hai được đánh giá có tiềm năng lớn, do cho phép làm rõ cơ chế tác động ở mức phân tử, đồng thời tạo điều kiện cho việc chuẩn hóa liều lượng và mở đường cho phát triển chế phẩm sinh học có hoạt tính ổn định hơn trong nuôi tôm.

1.3.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về ứng dụng vi khuẩn bản địa trong kiểm soát *Vibrio* trên tôm đã được triển khai tương đối mạnh, đặc biệt tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Tuy nhiên, phần lớn các công bố hiện nay chủ yếu dừng lại ở các bước phân lập, sàng lọc và đánh giá hoạt tính đối kháng ở quy mô phòng thí nghiệm nhằm tuyển chọn các chủng tiềm năng, trong khi các nghiên cứu đi sâu vào tách chiết và định danh các hợp chất kháng khuẩn vẫn còn khá hạn chế. Mặc dù còn những hạn chế nhất định, các kết quả này đã mở ra hướng đi triển vọng trong việc khai thác nguồn tài nguyên vi sinh vật tại chỗ.

Việc tận dụng năng lực kháng khuẩn của các chủng bản địa không chỉ giúp khống chế hiệu quả nhóm vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh mà còn là chìa khóa để hiện thực hóa mục tiêu nuôi trồng thủy sản bền vững tại Việt Nam.

Một trong những báo cáo tiêu biểu theo báo cáo của Nguyễn Thị Kim Cúc và cộng sự (2015). Từ các mẫu thu thập tại các ao nuôi tôm ở Quảng Trị, nhóm tác giả đã phân lập được ba chủng *B. subtilis* QTA12, *Bacillus megaterium* QTP1 và *B. subtilis* DK1 có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*, đồng thời thể hiện hoạt tính sinh tổng hợp mạnh mẽ đối với các dòng enzyme ngoại bào như protease và amylase [48]. Dù các phân tử kháng khuẩn cụ thể vẫn chưa được định danh rõ ràng, những dữ liệu thực nghiệm đã bước đầu thiết lập mối liên kết chặt chẽ giữa năng lực ức chế mầm bệnh và hệ thống enzyme chức năng của các dòng vi khuẩn nội tại trong môi trường ao nuôi. Kết quả này mở ra hướng mở rộng phạm vi nghiên cứu để đánh giá toàn diện vai trò điều tiết của các enzyme ngoại bào trong cơ chế đối kháng sinh học tại chỗ.

Ở quy mô khu vực, Phạm Thị Tuyết Ngân và cộng sự (2021) khảo sát các ao nuôi quảng canh tại Trà Vinh, Bạc Liêu và Cà Mau, thu được 83 chủng *Bacillus* từ bùn ao, trong đó có 13 chủng có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus*. Một số chủng điển hình như CM3.1 và TV1.3 không chỉ thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh mà còn có khả năng tiết enzyme ngoại bào cao như α -amylase, protease và cellulase, cho thấy sự kết hợp giữa chức năng kiểm soát vi khuẩn gây bệnh và tham gia phân hủy các chất hữu cơ trong ao nuôi [49].

Tiếp tục theo hướng này, Phạm Quốc Trường và cộng sự (2021) đã tuyển chọn chủng *Bacillus subtilis* CM3.1 từ bùn ao nuôi tại các tỉnh Trà Vinh, Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau. Chủng này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với *V. parahaemolyticus* gây AHPND, với đường kính vòng vô khuẩn đạt 13,05 mm. Khi được bổ sung vào hệ thống nuôi tôm thẻ chân trắng, CM3.1 góp phần làm giảm nồng độ TAN và NO_2^- -N, đồng thời cải thiện tốc độ sinh trưởng của tôm. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng kép của các chủng vi khuẩn bản địa, vừa kiểm soát tác nhân gây bệnh vừa tham gia phân hủy chất hữu cơ, góp phần cải thiện chất lượng môi trường ao nuôi [50].

Trong nghiên cứu công bố vào năm 2024, nhóm của Hồ Mộng Huyền đã thực hiện sàng lọc 23 dòng *Bacillus* từ các mẫu tôm và môi trường ao nuôi thâm canh tại tỉnh Kiên Giang (khu vực Hòn Đất và Kiên Lương). Kết quả cho thấy 11 chủng sở hữu năng lực đối kháng với vi khuẩn gây bệnh AHPND, với vòng kháng khuẩn ghi nhận được trong khoảng 1,33 – 17,33 mm. Đáng chú ý nhất là dòng *Bacillus* TCN3, khi ở nồng độ 10^7 CFU/mL, nó có khả năng tiêu diệt hoàn toàn 10^4 CFU/mL *V. parahaemolyticus*. Thêm vào đó, đặc tính kháng khuẩn của TCN3 còn cho thấy sự bền vững trước các biến động về độ mặn, nhiệt độ và pH môi trường [51].

Bên cạnh nhóm *Bacillus*, các vi khuẩn lactic bản địa cũng được quan tâm nghiên cứu. Phan Thị Cẩm Tú và cộng sự (2024) đã phân lập được chủng *L. plantarum* CMT1 từ ruột tôm khỏe có hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* cao, đồng thời có khả năng sinh enzyme ngoại bào tốt [52]. Khi bổ sung vào khẩu phần ăn trong 56 ngày, chủng này giúp cải thiện rõ rệt khả năng tăng trưởng của tôm, đặc biệt ở mật độ bổ sung cao, qua đó cho thấy vai trò của hệ vi sinh đường ruột như một nguồn vi khuẩn bản địa tiềm năng.

Các kết quả này cho thấy Việt Nam đã xây dựng được nền tảng tương đối rõ về nguồn vi khuẩn bản địa có khả năng kháng *Vibrio*, đặc biệt là các chủng *Bacillus* phân lập từ bùn, nước ao và cơ thể tôm. Tuy nhiên, khoảng trống nghiên cứu hiện nay nằm ở việc thiếu các công trình đi sâu vào tách chiết, định danh và đánh giá trực tiếp các hợp chất sinh học cụ thể như lipopeptide, bacteriocin, amicoumacin, ... từ các chủng bản địa. Do đó, việc chuyển hướng từ tiếp cận “tuyển chọn chủng đối kháng” sang “khai thác và đặc trưng hóa các hoạt chất sinh học từ vi khuẩn bản địa” được xem là hướng nghiên cứu có giá trị khoa học và ứng dụng cao, góp phần nâng cao hiệu quả kiểm soát bệnh do *Vibrio* trên tôm thẻ chân trắng tại Việt Nam.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu

- Chủng vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* NT09 gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND)
- Các mẫu tôm bệnh phẩm, mẫu tôm khỏe, mẫu nước và bùn tại các ao nuôi tôm thẻ chân trắng ở Quảng Ninh, Hải Phòng, Thanh Hóa và Khánh Hòa

2.1.2. Máy móc và thiết bị chính

Máy móc và thiết bị được sử dụng tại Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.3. Hoá chất

Các hoá chất sử dụng được cung cấp bởi các hãng sản xuất có uy tín trong nước và trên thế giới như: Biological, Sigma, Invitrogen, Bio-Rad, Merck, Prolad, Quiagen...

2.1.4. Môi trường nuôi cấy

- Môi trường Hiếu khí tổng số (g/l) để phân lập, hoạt hoá và nghiên cứu, phân loại của các chủng vi khuẩn có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* NT09

NH ₄ NO ₃	2	Glucose	1
KH ₂ PO ₄	1	Pepton	5
NaCl	5	Cao men	0,2
KCl	0,25	Cao thịt	3
MgCl ₂	1,2	Agar	20

pH = 7-7,2

- Môi trường Nutrient Agar (NA) (g/l) để nuôi cấy *V. parahaemolyticus* NT09 dùng đánh giá khả năng kháng khuẩn của chủng vi khuẩn

Pepton	5	Cao nấm	1.5
Mangan (II) clorua	1	Cao thịt	1.5
NaCl	5	pH	7.2-7.4
Agar	20		

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu

Để nghiên cứu những thay đổi lý hóa học của chất lượng đất và nước trong quá trình nuôi và ảnh hưởng của chúng đến sự tăng trưởng của tôm, các mẫu đất và nước được thu thập hai tuần một lần từ các ao nuôi tôm theo các TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013) có cải tiến và Mohankumar và cộng sự (2024)

Các mẫu sẽ được giữ ở 4 °C để phục vụ cho các bước thí nghiệm tiếp theo

2.2.2. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn có khả năng sinh các chất kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng

- **Phân lập vi khuẩn**

Mẫu nước và bùn được lấy từ các đầm, ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại bốn khu vực trọng điểm gồm: Quảng Ninh, Hải Phòng, Thanh Hóa và Khánh Hòa, bảo quản ở 4°C, được phân tích trong 24 giờ kể từ thời điểm lấy mẫu được xử lý và phân tích nghiêm ngặt dựa trên quy trình do Lương Đức Phẩm và cộng sự (2004) [53].

Với mẫu ruột tôm: ruột tôm đựng trong ống nghiệm được nghiền nát bằng đĩa thủy tinh vô trùng để tạo thành dịch huyền phù đồng nhất, sau đó để lắng trong 5 phút [54]. Lấy 1 mL dịch trong ở phía trên, sau đó trộn với môi trường nuôi cấy HKTS dịch có bổ sung 1,5% NaCl và tiến hành phân lập theo phương pháp của Lương Đức Phẩm và cộng sự (2004) [53].

- **Xác định khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Noordiana và cộng sự, 2013).**

- *Hoạt hóa chủng*

+ Chủng vi khuẩn kiểm định: Hoạt hóa chủng *Vibrio parahaemolyticus* NT09 gây AHPND bằng cách cấy vào môi trường Nutrient broth. Nuôi cấy ở điều kiện 28 °C, 180 vòng/phút trong 24 giờ.

+ Chủng đối kháng: Hoạt hóa các chủng vi khuẩn đối kháng được nuôi cấy trong môi trường HKTS có điều chỉnh nồng độ NaCl lên mức 1,5%. Nuôi cấy ở 28 °C, 180 vòng/phút trong 48 giờ.

- *Chuẩn bị đĩa thạch thí nghiệm*

+ Sau khi hoạt hóa chủng *Vibrio parahaemolyticus* NT09 trên môi trường NA, hút 100 μ L dịch vi khuẩn đã hoạt hóa và trải đều lên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường NA có bổ sung 1,5% NaCl.

+ Dùng dụng cụ đục giếng vô trùng để tạo bốn giếng trên mỗi đĩa thạch
- *Chiết xuất chất đối kháng từ vi khuẩn*

+ Ly tâm dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn ở 10.000 vòng/phút trong 20 phút để thu dịch nổi.

- *Bố trí thí nghiệm*

+ Hút 50 μ L dịch nổi từ dịch ly tâm của từng chủng vi khuẩn và nhỏ vào 3 giếng trên mỗi đĩa thạch.

+ Giếng thứ tư được nhỏ 50 μ L nước cất vô trùng để làm đối chứng

+ Kháng sinh Doxycycline 30 μ g/mL được sử dụng làm đối chứng dương và môi trường nuôi cấy là đối chứng âm trong thí nghiệm

- *Ủ và đọc kết quả*

+ Ủ các đĩa thạch ở 28 °C trong 24 giờ.

+ Sau khi ủ, đo đường kính của vùng ức chế (vòng trong suốt không có vi khuẩn mọc) xung quanh mỗi giếng theo như nghiên cứu của Ngô Thị Phương Dung và cộng sự [55]. Đường kính vùng ức chế được tính theo công thức sau:

Đường kính vùng ức chế (mm) = D – d

Trong đó: D là đường kính vòng ức chế ngoài (mm)

d là đường kính giếng chứa dịch nổi (mm)

+ Khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* NT09 được định lượng dựa trên thông số vòng vô khuẩn quanh giếng thạch. Sự khác biệt về hiệu quả ức chế giữa các chủng và các nghiệm thức nồng độ dịch nuôi là tiêu chí cốt lõi để sàng lọc các dòng khuẩn có giá trị ứng dụng cao trong việc chế tạo các chế phẩm phòng bệnh cho tôm thẻ chân trắng.

Nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào và đặc điểm sinh lý sinh hóa [56]

- Quan sát hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn: Hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn được theo dõi dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc trên môi trường HKTS thạch (màu sắc, hình dạng, kích thước, bề mặt, ...).

Chủng vi khuẩn nghiên cứu được nuôi cấy trên môi trường HKTS. Sau 24 giờ, tiến hành nhuộm Gram để xác định vi khuẩn thuộc nhóm Gram (-) hay

Gram (+).

- Hình thái và kích thước tế bào của các chủng vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SEM ở mức độ phóng đại khác nhau.

- Đối với nhóm vi khuẩn lactic: Các khuẩn lạc được chọn sẽ được kiểm tra các đặc điểm sinh lý (nhuộm Gram, khả năng hình thành bào tử) và sinh hóa (phản ứng oxidase và catalase) Những khuẩn lạc có kết quả Gram dương, không hình thành bào tử, oxidase âm tính và catalase âm tính được xác định thuộc nhóm vi khuẩn lactic (LAB).

2.2.3. Phương pháp phân loại vi khuẩn bằng phân tích trình tự 16S rRNA

- *Tách chiết DNA tổng số: Theo hướng dẫn của kit tách chiết DNA tổng số của Promega và theo mô tả chi tiết bởi Cung Thị Ngọc Mai (2017) [57]*

- *Nhân bản đoạn 16S rRNA bằng kỹ thuật [58]*

- *Đọc trình tự nucleotide: Thực hiện phản ứng khuếch đại mẫu để đọc trình tự với các thành phần: 12,5 µL Master Mix 2X, 1,0 µL mỗi xuôi 27F (10 pmol/µL), 1,0 µL mỗi ngược 1492R (10 pmol/µL), 1,0 µL DNA khuôn, 9,5 µL nước khử ion vô trùng (nuclease-free water). Primer* sử dụng: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). (cặp mồi dùng để nhân bản 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR), 780F (5'-GAATTGATACCCTGGTAG - 3', 350R (5' – CTGCTGCCTCCCGTAG – 3') và 1100F (5' – GCAACGAGCGCAACCC – 3'). Chu trình nhiệt: (1) 96 °C – 1 phút, (2) 96 °C – 10 giây, (3) 50 °C – 5 giây, (4) 60 °C – 4 phút. Bước (2) đến bước 4 được lặp lại 25 lần. Sản phẩm sau phản ứng khuếch đại được tinh sạch theo các bước sau: Chuyển mẫu sang ống eppendorf thể tích 1,5 ml. Bổ sung 5 µl EDTA 1,25mM và 60 µl ethanol 100%, trộn nhẹ nhàng. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, ly tâm 15.000 vòng/phút trong 10 phút, thu cặn. Làm khô sản phẩm bằng máy cô quay chân không trong 3 phút. Hoà tan cặn trong 10 µl hidi-formanide. Biến tính ở 95 °C trong 3 phút. Sản phẩm sau tinh sạch được xác định trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI 3100 Avant.*

- *So sánh trình tự trên GenBank: Sử dụng giao diện tìm kiếm BLAST của NCBI để so sánh trình tự nucleotide chủng nghiên cứu với các trình tự có sẵn trên GenBank. Các kết quả so sánh có độ tương đồng cao nhất và trên 96% được sử dụng làm kết quả tham chiếu. Kết hợp với các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh*

hoá để xác định tên chủng đến chi/loài.

- *Xây dựng cây phát sinh chủng loại*: Sử dụng phần mềm Clustal IX để so sánh và xử lý các dữ liệu nhận được. Dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm Mega XI.

2.2.4. Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào và tạo màng sinh học của các chủng lựa chọn

Phương pháp nghiên cứu khả năng sinh một số enzyme ngoại bào được thực hiện dựa trên nguyên tắc của Williams [59]. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi khuẩn được đánh giá theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có bổ sung cơ chất đặc hiệu. Phương pháp này nhằm xác định định tính khả năng tiết enzyme của vi khuẩn thông qua sự hình thành vòng phân giải cơ chất xung quanh giếng thạch. Các chủng vi khuẩn được nuôi lắc trong môi trường HKTS lỏng ở 30°C, tốc độ 180 vòng/phút trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút để thu dịch nổi. Sau đó, 100 µL dịch nổi được bổ sung vào các giếng thạch chứa môi trường có cơ chất tương ứng và ủ ở 30°C trong 24 giờ.

- **Đánh giá khả năng sinh amylase**: sử dụng môi trường chứa 1% tinh bột hòa tan và 2% agar. Sau thời gian ủ, đĩa thạch được nhuộm bằng dung dịch Lugol. Sự xuất hiện vòng sáng xung quanh giếng thạch trên nền màu xanh tím của tinh bột được ghi nhận là dấu hiệu có hoạt tính amylase.

- **Đánh giá khả năng sinh cellulase**: sử dụng môi trường chứa 1% carboxymethyl cellulose (CMC) và 2% agar. Sau khi ủ, đĩa thạch được nhuộm bằng dung dịch Lugol. Vùng sáng xuất hiện quanh giếng thạch thể hiện sự phân giải cellulose và được ghi nhận là dấu hiệu có hoạt tính cellulase.

- **Đánh giá khả năng sinh protease**: sử dụng môi trường chứa 1% casein và 2% agar. Sau thời gian ủ, sự xuất hiện vòng phân giải trong suốt xung quanh giếng thạch được ghi nhận là dấu hiệu có hoạt tính protease, không cần nhuộm bằng Lugol.

- **Đánh giá khả năng sinh lipase**: sử dụng môi trường chứa 1% Tween 80 và 2% agar. Sau khi ủ, sự xuất hiện vòng kết tủa hoặc vòng đục xung quanh giếng thạch được ghi nhận. Sau thời gian ủ, đĩa thạch được xử lý bằng dung dịch Lugol (I₂ 0,33% và KI 0,67%) đối với môi trường chứa tinh bột hoặc CMC để quan sát vùng phân giải cơ chất. Sự xuất hiện vòng phân giải hoặc vòng sáng quanh

giếng thạch được ghi nhận là dấu hiệu chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme tương ứng.

Dung dịch Lugol được sử dụng trong nghiên cứu gồm 0,33% (w/v) I₂ và 0,67% (w/v) KI hòa tan trong nước cất vô trùng.

Kết quả được ghi nhận theo sự có mặt (+) hoặc không có mặt (-) của vùng phân giải cơ chất, phản ánh khả năng sinh enzyme ngoại bào tương ứng của các chủng vi khuẩn khảo sát.

Đánh giá khả năng tạo màng: Chủng vi khuẩn được đánh giá khả năng tạo màng sinh học theo phương pháp mô tả bởi theo O'toole và cộng sự, (2000) [60].

2.2.5. Tách chiết các hoạt chất sinh học từ vi khuẩn có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus*

- Tách chiết các hoạt chất sinh học từ vi khuẩn có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* theo Tan và cộng sự, (2021) [61].

+ Tách chiết enzyme ngoại bào thô

Các chủng vi khuẩn lựa chọn được nuôi cấy trong 100 mL môi trường HKTS dịch, sử dụng bình tam giác dung tích 500 mL, ở điều kiện: 28±2 °C và tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 16–18 giờ.

Kết thúc quá trình nuôi cấy, dịch nuôi được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 20 phút nhằm tách hoàn toàn sinh khối khỏi dịch nuôi. Phần dịch nổi sau đó được lọc qua màng lọc kích thước 0,2 µm để loại bỏ triệt để tế bào và các mảnh vụn còn sót lại. Dịch lọc thu được là nguồn chứa các hoạt chất sinh học thô do vi khuẩn sinh tổng hợp.

+ Tách chiết các hoạt chất do vi khuẩn sinh tổng hợp bằng dung môi

Dịch nuôi cấy vi khuẩn sau khi ly tâm để loại bỏ sinh khối được bổ sung các dung môi hữu cơ như: *n*-hexane, ethyl acetate, chloroform theo tỷ lệ 1:1 (v/v). Hỗn hợp được khuấy đều trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng để các hợp chất kháng khuẩn chuyển từ pha nước (CFS) sang pha dung môi hữu cơ. Sau quá trình phân tách pha, pha dung môi hữu cơ và pha nước được tách riêng. Mẫu sau đó được cô đặc mẫu bằng máy ly tâm lạnh, sau đó cô quay chân không (rotary evaporator) ở nhiệt độ thấp (<40°C) để loại bỏ dung môi, thu được dịch chiết thô dạng rắn hoặc sệt chứa các hoạt chất sinh học từ vi khuẩn kháng *V. parahaemolyticus*.

Phần dịch chiết thu được từ pha dung môi hữu cơ được hòa tan lại trong các dung môi tương ứng, còn chất rắn thu được từ pha nước được hòa tan lại trong nước cất đã khử trùng. Các dung dịch này tiếp tục được lọc qua màng polyethersulfone 0,22 μm nhằm loại bỏ hoàn toàn các tạp chất rắn còn sót lại, thu được dịch chiết thô chứa các hoạt chất sinh học phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.6. Phân tích thành phần hóa học của dịch chiết

Dịch chiết có hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* NT09 tốt nhất đã được phân tích các thành phần hóa học theo các phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), phân tích phổ hồng ngoại (FTIR), phân tích nhiễu xạ tia X (XRD) và sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS). Các kết quả này được thực hiện tại Viện Công nghệ tiên tiến, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phân tích HPLC

Quá trình phân tích dịch chiết được thực hiện trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) của hãng Hewlett-Packard (Bad Homburg, Đức). Các thành phần được tách chiết thông qua cột LiChroCart 125-4 RP-18 loại end-capped với kích thước hạt 5- μm (Merck, Darmstadt, Đức) và được thực hiện như mô tả bởi Cung Thị Ngọc Mai (2017) [57].

Phân tích FTIR

Phổ FTIR được thu nhận trên hệ thống Bruker Alpha II tích hợp đầu dò ECO-ATR và xử lý thông qua phần mềm OPUS (Phiên bản 7.5.18), để đo FTIR dịch chiết thu được. Hệ thống bao gồm nguồn hồng ngoại làm mát bằng không khí điện áp thấp, giao thoa kế được căn chỉnh vĩnh viễn, bộ tách chùm và cửa sổ ZnSe, bộ dò, cùng module đo ECO-ATR có thể thay thế. Các phổ được ghi nhận trong khoảng 4000–600 cm^{-1} , với trung bình 16 lần quét, độ phân giải 4 cm^{-1} và thời gian đo vượt quá 20 giây. Phương pháp thực hiện được mô tả bởi Kumar và cộng sự (2026) [62]

Phân tích cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD - X-ray Diffraction)

Cấu trúc tinh thể của mẫu được phân tích trên hệ thống nhiễu xạ tia X (XRD) model D8 Advance thuộc hãng Bruker (CHLB Đức); phổ nhiễu xạ được xử lý bằng phần mềm Diffrac.eva (Bruker) để suy luận cấu trúc vật liệu [63].

Phân tích LC-MS

Nhằm định danh các hợp chất hóa học trong dịch chiết, hệ thống sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần Waters XEVO TQ-XS đã được vận hành. Quy trình thực nghiệm và các điều kiện vận hành LC-MS được kế thừa và điều chỉnh dựa trên mô tả của Alanazi (2025) [64].

2.2.6. Đánh giá hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của dịch chiết chứa hoạt chất sinh học từ vi khuẩn bằng kỹ thuật khuếch tán trên đĩa thạch (theo Oonmetta-Aree và cộng sự, 2006) [65]

Chủng vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* NT09 được hoạt hóa và điều chỉnh mật độ thích hợp, sau đó trải đều lên bề mặt đĩa thạch NA vô trùng để tạo lớp vi khuẩn đồng nhất. Các đĩa giấy vô trùng đường kính 6 mm được tẩm 10 μ L cao chiết (từ pha hữu cơ hoặc pha nước) và để khô tự nhiên trong điều kiện vô trùng.

Các đĩa giấy đã tẩm mẫu được đặt nhẹ nhàng lên bề mặt thạch đã cấy vi khuẩn, đảm bảo khoảng cách phù hợp giữa các đĩa để tránh chồng lấn vùng khuếch tán. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong tủ ẩm duy trì ở nhiệt độ 37 °C với thời gian lưu giữ là 24 giờ. Để củng cố giá trị khoa học của dữ liệu, các mẫu đối chứng âm (dung môi) và đối chứng dương đã được thiết lập song song, đảm bảo tính khách quan cho các kết quả ghi nhận.

Sau thời gian ủ, hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá thông qua việc đo đường kính vùng ức chế (mm) xung quanh đĩa giấy, bao gồm cả đường kính đĩa giấy, theo phương pháp của Ngô Thị Phương Dung và cộng sự (2011) [55]. Giá trị hiệu lực kháng khuẩn được xác định theo công thức:

$$\text{Nồng độ ức chế (mm)} = D - d$$

Trong đó: D là đường kính toàn bộ vòng ức chế và d là đường kính đĩa giấy (6 mm).

2.2.7. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các hợp chất sinh học có nguồn gốc từ vi khuẩn kháng *V. parahaemolyticus*

Thử nghiệm MIC được thực hiện bằng cách áp dụng quy trình vi pha loãng trên đĩa 96 giếng. Dịch chiết thô sau khi được đồng hóa trong dung môi phù hợp sẽ trải qua các bước pha loãng nối tiếp trong môi trường dinh dưỡng NA, tạo ra các dải nồng độ khác biệt nhằm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn một cách chính xác.

Chủng vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* NT09 được hoạt hóa trong môi trường Nutrient broth ở 28–30 °C trong 16–18 giờ. Mật độ vi khuẩn sau hoạt hóa được điều chỉnh đạt khoảng 10^6 CFU/mL. Trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng, bổ sung lần lượt môi trường NA, dung dịch dịch chiết ở các nồng độ khác nhau và huyền phù vi khuẩn kiểm định sao cho thể tích cuối cùng trong mỗi giếng là như nhau.

Thí nghiệm được bố trí gồm đối chứng âm là giếng chỉ chứa môi trường NA và vi khuẩn (nhằm kiểm tra khả năng sinh trưởng bình thường của *Vibrio*), đối chứng trắng là giếng chỉ chứa môi trường NA, và đối chứng dung môi là giếng chứa môi trường NA, vi khuẩn và lượng dung môi tương đương với mẫu thử. Sau khi bố trí đầy đủ, đĩa được ủ ở 28–30 °C trong 18–24 giờ.

Sau thời gian ủ, sự sinh trưởng của vi khuẩn được đánh giá bằng quan sát độ đục của môi trường nuôi cấy hoặc đo mật độ quang ở bước sóng thích hợp. Ngưỡng MIC được thiết lập tại nồng độ thấp nhất của dịch chiết mà tại đó không quan sát thấy sự phát triển của vi khuẩn so với đối chứng âm. Nhằm đảm bảo tính chính xác và khả năng tái lập, mọi thực nghiệm đều được lặp lại ba lần độc lập. Kết quả MIC được biểu thị bằng đơn vị mg/mL hoặc $\mu\text{g/mL}$ tùy theo nồng độ sử dụng của cao chiết.

2.2.8. Đánh giá độ bền và tính chất sinh học của các hoạt chất kháng V. parahaemolyticus

**** Ảnh hưởng của nhiệt độ***

Dịch chiết chứa hoạt chất sinh học được chia thành các phần bằng nhau và xử lý ở các mức nhiệt độ khác nhau gồm 40, 60, 80, và 100°C trong 30 phút và 121°C trong 15 phút (hấp tiệt trùng). Sau xử lý, các mẫu được làm nguội về nhiệt độ phòng.

Hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của các mẫu sau xử lý nhiệt được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên thạch thông qua đo đường kính vòng vô khuẩn (mm). Mẫu không xử lý nhiệt được sử dụng làm đối chứng. Kết quả được biểu thị dưới dạng phần trăm hoạt tính còn lại so với đối chứng.

**** Ảnh hưởng của pH***

Dịch chiết chứa hoạt chất sinh học được điều chỉnh về các giá trị pH khác nhau (pH 3, 5, 7, 9 và 11) bằng dung dịch HCl 1 N hoặc NaOH 1 N. Các mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1–2 giờ để đảm bảo sự ổn định của hệ.

Sau xử lý, pH của các mẫu được điều chỉnh trở lại giá trị trung tính (pH $\approx 7,0$) nhằm loại trừ ảnh hưởng trực tiếp của pH lên vi khuẩn chỉ thị. Hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* sau xử lý được xác định tương tự như trên. Mẫu không điều chỉnh pH được sử dụng làm đối chứng.

*** Ảnh hưởng của enzyme**

Dịch chiết chứa hoạt chất sinh học được xử lý riêng rẽ với các enzyme bao gồm proteinase K, trypsin, pepsin, amylase và lipase nhằm đánh giá sơ bộ bản chất của hoạt chất. Mỗi enzyme được bổ sung vào mẫu với nồng độ 1,0 mg/mL, sau đó ủ ở 37°C trong 1–2 giờ.

Sau thời gian xử lý, enzyme được bất hoạt bằng gia nhiệt ở 80°C trong 10–15 phút hoặc theo điều kiện thích hợp. Hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của các mẫu sau xử lý được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Mẫu không xử lý enzyme được sử dụng làm đối chứng.

2.2.9. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần và xử lý thống kê bằng phần mềm Excel. Từ đó, xác định giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và biểu diễn kết quả bằng đồ thị trên phần mềm này.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, sàng lọc và định danh các chủng vi khuẩn có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng

Để phát triển các chế phẩm sinh học hiệu quả trong việc kiểm soát hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND), việc tìm kiếm và sàng lọc các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* là một bước đi mang tính chiến lược. Nghiên cứu này tập trung khai thác nguồn vi sinh vật bản địa từ các mẫu nước, bùn đáy ao và cả trên đối tượng tôm (khỏe mạnh lẫn nhiễm bệnh). Hướng tiếp cận này nhằm tận dụng tối đa những chủng vi khuẩn đã thích nghi hoàn toàn với hệ sinh thái thủy sản địa phương, từ đó tuyển chọn ra những ứng viên tiềm năng nhất có năng lực tổng hợp các hoạt chất kháng khuẩn tự nhiên.

Các chủng vi khuẩn sau khi được tuyển chọn tiếp tục được khảo sát đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh học, khả năng sinh enzyme ngoại bào và hình thành màng sinh học, nhằm đánh giá toàn diện các đặc tính liên quan đến khả năng cạnh tranh và ức chế vi khuẩn gây bệnh trong môi trường nuôi. Đồng thời, việc định danh và phân loại các chủng vi khuẩn tiềm năng được thực hiện dựa trên đặc điểm hình thái kết hợp với phân tích trình tự gen 16S rRNA, qua đó xác định chính xác vị trí phân loại và tiềm năng ứng dụng của các chủng được lựa chọn.

Kết quả của các bước nghiên cứu này là cơ sở quan trọng để lựa chọn các chủng vi khuẩn tiềm năng phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về tách chiết và đánh giá hoạt tính của các hợp chất sinh học kháng *V. parahaemolyticus*. Các nội dung chi tiết được trình bày trong các mục sau.

3.1.1. Kết quả phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn kháng *V. parahaemolyticus*

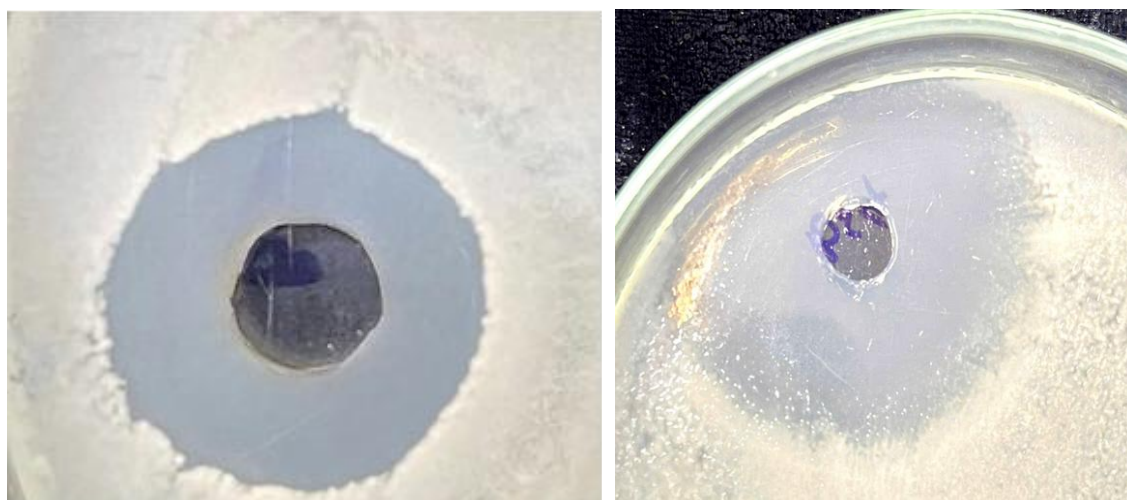
Từ các mẫu thu thập đã phân lập được 28 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái khác nhau. Kết quả này cho thấy ao nuôi tôm là nguồn chứa nhiều vi khuẩn bản địa có tiềm năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus*. Tuy nhiên, số lượng chủng phân lập được chỉ phản ánh kết quả thu nhận trong điều kiện nuôi cấy và phạm vi lấy mẫu của nghiên cứu, chưa đủ cơ sở để đánh giá mức độ đa dạng của toàn bộ quần xã vi sinh vật trong ao nuôi.

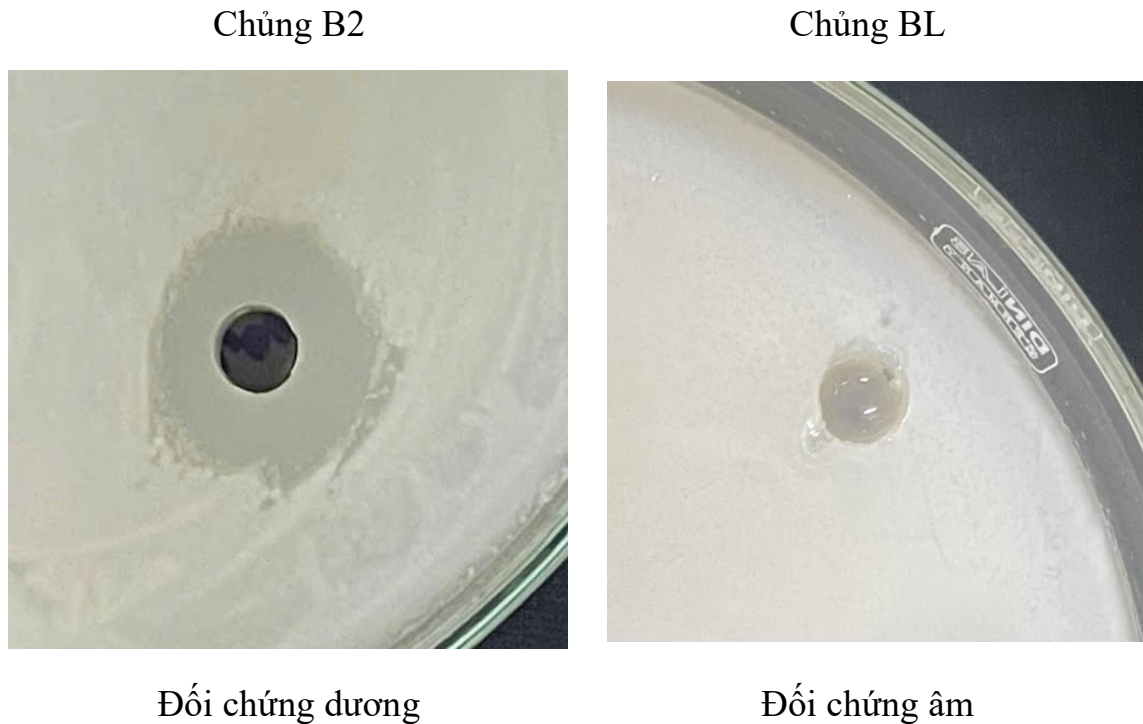
Dựa trên đường kính vòng vô khuẩn, hoạt tính kháng khuẩn của các chủng được phân thành ba mức: Nhóm hoạt tính mạnh (≥ 20 mm); Hoạt tính trung bình: từ 10 mm đến dưới 20 mm và Hoạt tính yếu: < 10 mm. Kết quả cho thấy hai chủng BL và B2 có đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là $30 \pm 0,16$ mm và $24 \pm 0,21$ mm nên được xếp vào nhóm có hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với *Vibrio parahaemolyticus* (Bảng 3.1 và Hình 3.1). Đồng thời, các giá trị này cũng nằm ở ngưỡng cao khi so sánh với các nghiên cứu quốc tế, trong đó phần lớn các chủng *Bacillus* spp. chỉ đạt 12–25 mm [66, 67]

Bảng 3.1. Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của 02 chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu nước, bùn ao, tôm khoẻ và tôm bệnh tại ao nuôi tôm thẻ chân trắng

STT	Kí hiệu chủng	Nguồn phân lập	Đường kính vòng kháng khuẩn với chủng chỉ thị (mm)
1	BL	Cam Ranh, Khánh Hoà	$30 \pm 0,16$
2	B2	Hạ Long, Quảng Ninh	$24 \pm 0,21$
3	Đối chứng dương	Doxycycline 30 $\mu\text{g/mL}$	$24 \pm 0,22$
4	Đối chứng âm	Nước muối sinh lý 0,9%	$0 \pm 0,19$

Đặc biệt, hai chủng BL và B2 tạo vòng kháng khuẩn trong khoảng 24–30 mm, cho thấy khả năng đối kháng mạnh vượt trội. So với các công bố trước đây, mức hoạt tính này cao hơn đáng kể so với các chủng probiotic thường được sử dụng trong nuôi tôm. Cụ thể, Mahdhi và cộng sự (2010) ghi nhận các chủng *Bacillus subtilis* và *B. coagulans* chỉ đạt vùng ức chế 12–20 mm đối với *V. parahaemolyticus* [68].





Hình 3.1. Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* chủng B2 và BL

So sánh với các nghiên cứu quốc tế gần đây, kết quả thu được cũng thể hiện ưu thế rõ rệt. Ran và cộng sự (2023) phân lập chủng *Bacillus* sp. JK08 từ ao nuôi tôm tại Trung Quốc, ghi nhận vòng vô khuẩn chỉ khoảng 18 mm [69]. Nghiên cứu của Bentzon-Tilia và cộng sự (2016) trên vi khuẩn biển tại Đan Mạch cho thấy vòng vô khuẩn phổ biến chỉ dao động trong khoảng 15–22 mm đối với *Vibrio* spp [70]. Như vậy, xét trên phạm vi tổng thể, hoạt tính của các chủng BL và B2 cao hơn đáng kể so với phần lớn các công bố trong và ngoài nước, cho thấy tiềm năng sinh học nổi bật của các chủng vi khuẩn bản địa trong nghiên cứu này.

Hoạt tính kháng cao của các chủng này cho thấy triển vọng lớn trong việc tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn như lipopeptide (surfactin, iturin, fengycin), bacteriocin hoặc các peptide kháng khuẩn khác, có thể tác động lên *Vibrio* thông qua nhiều cơ chế như phá vỡ màng tế bào, ức chế quorum sensing và cản trở hình thành biofilm [71, 72].

3.1.2. Đặc điểm hình thái và sinh học của các chủng vi khuẩn kháng *V. parahaemolyticus*

Các chủng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* sau quá trình sàng lọc được tiếp tục nghiên cứu về đặc điểm hình thái và sinh học nhằm phục vụ cho việc định danh và đánh giá tiềm năng ứng dụng. Việc khảo sát các đặc điểm này không chỉ giúp phân biệt và phân

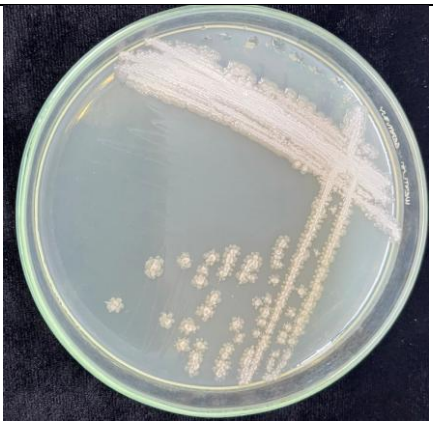

loại sơ bộ các chủng vi khuẩn mà còn đưa ra những bằng chứng khoa học thực tiễn, làm sáng tỏ năng lực sinh trưởng, thích nghi và cơ chế sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn của chúng.

*** Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào**

Dựa trên các ghi nhận về hình thái khuẩn lạc cũng như đặc điểm cấu trúc tế bào của hai dòng khuẩn BL và B2, có thể nhận thấy rằng, chúng đều mang đặc điểm điển hình của chi *Bacillus* (tế bào hình que, Gram dương, sinh bào tử), phù hợp với nhiều tài liệu khoa học đã làm sáng tỏ vai trò kếp của các dòng *Bacillus spp.*, không chỉ trong việc tổng hợp các phân tử đối kháng mà còn ở khả năng cải thiện sức khỏe vật nuôi khi được vận dụng như một loại probiotic chuyên dụng (Bảng 3.2). Điều này cũng gợi ý mối liên hệ giữa đặc điểm hình thái – sinh học và khả năng sinh hoạt chất kháng khuẩn mạnh của các chủng này.

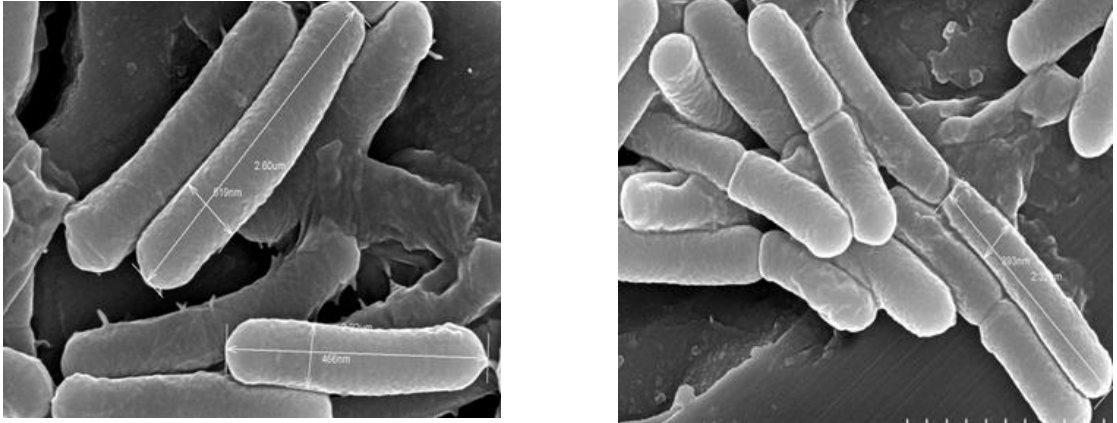
Bảng 3.2. Hình thái khuẩn lạc và tế bào các chủng vi khuẩn kháng *V.*

parhaemolyticus

ST T	KH chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Hình ảnh khuẩn lạc
1	BL	Trắng đục, tròn, bề mặt nhẵn, khô, mép gọn, d=3mm	Tế bào hình que, Gram (+), tạo bào tử	
2	B2	Trắng đục, tròn, hơi lồi, mép gọn, d=3mm	Tế bào hình que, Gram (+), tạo bào tử	

Dựa trên hoạt tính đối kháng vượt trội và đặc điểm hình thái điển hình,

hai chủng BL và B2 được lựa chọn để quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) nhằm làm rõ cấu trúc bề mặt tế bào. Đặc điểm này có liên quan chặt chẽ đến khả năng bám dính, hình thành biofilm và cơ chế tiết các hợp chất kháng khuẩn ra môi trường, từ đó góp phần vào hiệu quả ức chế *Vibrio parahaemolyticus*. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.2.



Chủng BL (độ phóng đại 30.000 lần)

Chủng B2 (độ phóng đại 25.000 lần)

Hình 3.2. Hình thái tế bào chủng vi khuẩn BL và B2 dưới kính hiển vi điện tử quét

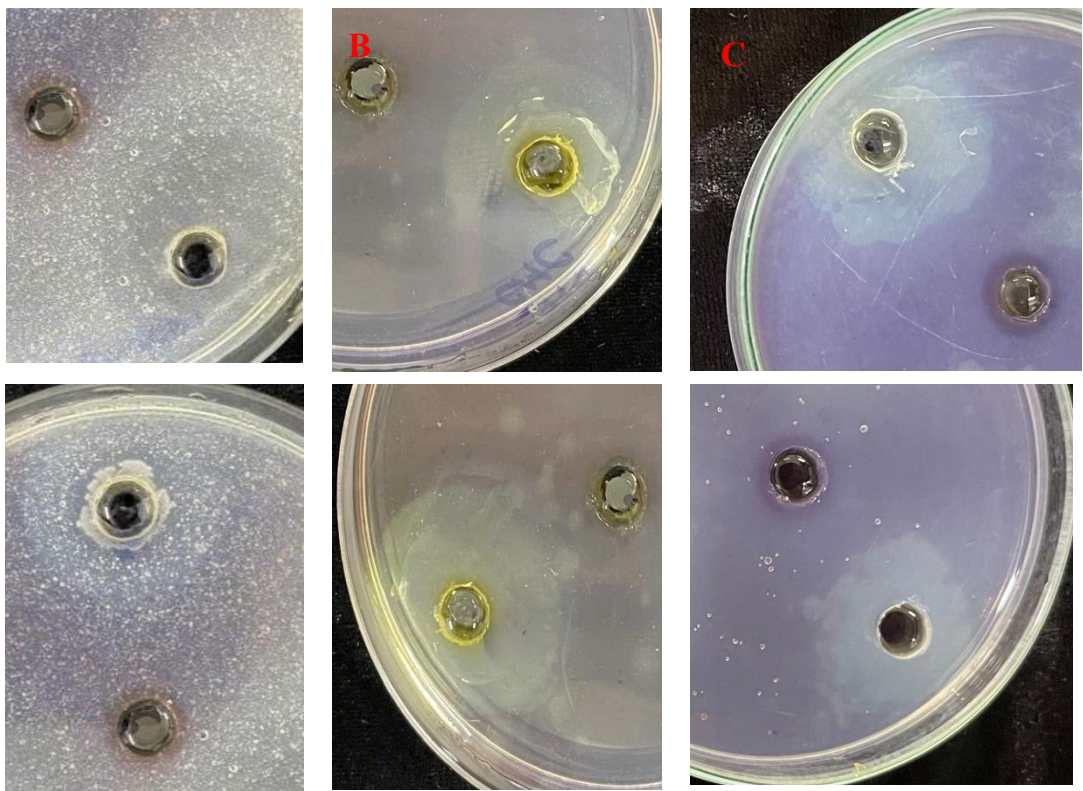
Quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy hai chủng BL và B2 đều có dạng tế bào hình que, bề mặt tương đối nhẵn và cấu trúc ổn định, phù hợp với đặc điểm của vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Các tế bào phân bố rời rạc hoặc kết tụ nhẹ, không ghi nhận biến dạng bất thường. Đặc điểm hình thái này gợi ý khả năng duy trì cấu trúc màng tế bào tốt, đồng thời liên quan đến khả năng bám dính và hình thành biofilm, góp phần vào hiệu quả đối kháng cao đối với *V. parahaemolyticus*.

Dựa trên hoạt tính đối kháng vượt trội và đặc điểm hình thái điển hình, hai chủng BL và B2 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu đặc điểm sinh học, bao gồm hoạt tính sinh tổng hợp enzyme ngoại bào và khả năng hình thành biofilm, nhằm làm sáng tỏ cơ chế đối kháng với *V. parahaemolyticus*.

* Đặc điểm tính sinh enzyme ngoại bào

Hoạt tính sinh enzyme ngoại bào của hai chủng vi khuẩn BL và B2 được kiểm tra thông qua kỹ thuật khuếch tán trên giếng thạch trên các môi trường đặc hiệu có bổ sung cơ chất tương ứng. Khả năng sinh enzyme được đánh giá dựa trên kích thước quầng phân giải bao quanh vị trí giếng (Hình 3.3).

Kết quả cho thấy cả hai chủng đều có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme ngoại bào quan trọng, bao gồm amylase, protease, cellulase và lipase. Trong đó, hoạt tính enzyme được thể hiện qua đường kính vòng phân giải dao động từ 3 đến 23 mm, tùy theo loại enzyme và chủng vi khuẩn (Bảng 3.3). Cụ thể, chủng BL thể hiện hoạt tính mạnh đối với protease ($23 \pm 0,15$ mm), cellulase ($22 \pm 0,16$ mm) và lipase ($22 \pm 0,02$ mm), trong khi chủng B2 có hoạt tính cellulase cao nhất ($23 \pm 0,13$ mm), cùng với hoạt tính lipase ($20 \pm 0,02$ mm) và protease ($14 \pm 0,06$ mm). Hoạt tính amylase của cả hai chủng ở mức thấp hơn (≈ 3 mm), cho thấy sự khác biệt về khả năng phân giải các loại cơ chất.



Hình 3.3. Kết quả đánh giá định tính khả năng sinh enzyme ngoại bào của 2 chủng vi khuẩn B2 và BL (A: Khả năng sinh protease; B: Khả năng sinh cellulase; C: Khả năng sinh lipase)

Bảng 3.3. Khả năng sinh các enzyme ngoại bào (cellulase, protease, amylase và lipase) của các 2 chủng vi khuẩn

KH chủng	Đường kính hoạt tính sinh enzyme (mm)			
	Protease	Cellulose	Lipase	amylase
BL	23 ± 0,15	22 ± 0,16	22 ± 0,02	3±0,13
B2	14 ± 0,06	23 ±0,13	20 ± 0,02	3±0,17

Những ghi nhận này tương đồng với các công bố khoa học trước đó về vai trò của các chủng *Bacillus* trong sinh tổng hợp enzyme ngoại bào. Alagarasu và cộng sự (2021) minh chứng rằng sự hiện diện của *B. subtilis* trong khẩu phần ăn đã thúc đẩy đáng kể hoạt tính protease, lipase và amylase ở tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), đồng thời nâng cao khả năng kháng lại *Vibrio alginolyticus* [73]. Tương tự, Monier và cộng sự (2023) ghi nhận các chế phẩm probiotic chứa *B. subtilis* và *B. licheniformis* vừa nâng cao các chỉ tiêu môi trường nước, gia tăng hoạt lực của hệ enzyme thủy phân, qua đó góp phần cải thiện tăng trưởng và giảm nguy cơ nhiễm bệnh ở tôm [74]. Gần đây, Monzón-Atienza và cộng sự (2024) cũng báo cáo các chủng *B. subtilis* có khả năng tiết đồng thời protease, amylase và lipase với chỉ số vòng thủy phân cao, minh chứng cho giá trị then chốt của các nhóm vi khuẩn này trong việc xử lý mùn bã hữu cơ và nâng cao đề kháng của đối tượng nuôi thủy sản [75].

Như vậy, hai chủng vi khuẩn BL và B2 không chỉ thể hiện khả năng đối kháng mạnh đối với *Vibrio parahaemolyticus* mà còn có hoạt tính enzyme ngoại bào đa dạng, đặc biệt là protease và lipase. Kết quả này minh chứng cho tiềm năng ứng dụng thực tế của những chủng vi khuẩn đã chọn trong việc chuyển hóa các phế phẩm hữu cơ tích tụ, tối ưu hóa hệ sinh thái ao nuôi và hỗ trợ sức khỏe tôm nuôi.

* **Khả năng tạo màng sinh học**

Khả năng hình thành màng sinh học của hai chủng vi khuẩn BL và B2 được đánh giá bằng phương pháp nhuộm tím tinh thể và xác định giá trị OD ở bước sóng 570 nm. Dữ liệu thu được cho thấy cả hai chủng đều có khả năng tạo màng sinh học tốt, tương ứng với các chỉ số mật độ quang OD₅₇₀ là 1,252 ± 0,15 đối với chủng BL và 1,101 ± 0,13 đối với chủng B2.

So sánh giữa hai chủng cho thấy BL có khả năng hình thành biofilm mạnh hơn so với B2, tuy nhiên cả hai đều thuộc nhóm có khả năng tạo màng sinh học cao. Đối chiếu với những công trình khoa học trước đây, giá trị OD tạo màng của hai chủng này cao hơn so với mức phổ biến (0,6–0,9) thường thấy ở các dòng *Bacillus* phân lập từ ao nuôi tôm (Ran và cộng sự, 2023), khẳng định ưu thế đáng kể của các nhóm vi sinh vật nội tại trong việc thích nghi và thiết lập quần thể trong môi trường nuôi.

Khả năng hình thành biofilm mạnh của hai chủng BL và B2 có ý nghĩa sinh học quan trọng, đặc biệt trong việc cạnh tranh không gian sống và ức chế sự xâm nhiễm từ các vi sinh vật gây hại. Lớp màng sinh học do các chủng này tạo thành có thể vận hành như một màng chắn sinh học, thúc đẩy hiệu suất bám dính lên bề mặt niêm mạc và giá thể, đồng thời cản trở sự bám dính và phát triển của *V. parahaemolyticus*.

Từ các những dữ liệu phân tích về tính chất sinh hóa và hình thái, hai chủng BL và B2 tiếp tục được lựa chọn để tiến hành định danh và phân lập để định vị phân loại học cụ thể, tạo tiền đề cho những khảo sát chi tiết sau này.

3.1.3. Định danh và phân loại các chủng vi khuẩn lựa chọn

Nhằm làm rõ quan hệ phân loại của các chủng đích, trình tự vùng gen 16S rRNA của hai chủng BL và B2 được tiến hành đối soát với hệ thống lưu trữ GenBank bằng thuật toán BLAST từ NCBI. Dữ liệu đối soát minh chứng rằng cả hai dòng khuẩn sở hữu độ đồng nhất trình tự rất cao với các loài thuộc chi *Bacillus*. Cây phát sinh chủng loại (Hình 3.5) cho thấy chủng BL nằm trong cùng nhánh với *B. licheniformis*, trong khi chủng B2 thuộc cùng nhóm phát sinh loài với *B. subtilis* với chỉ số bootstrap đáng tin cậy, khẳng định độ tin cậy của kết quả phân loại.

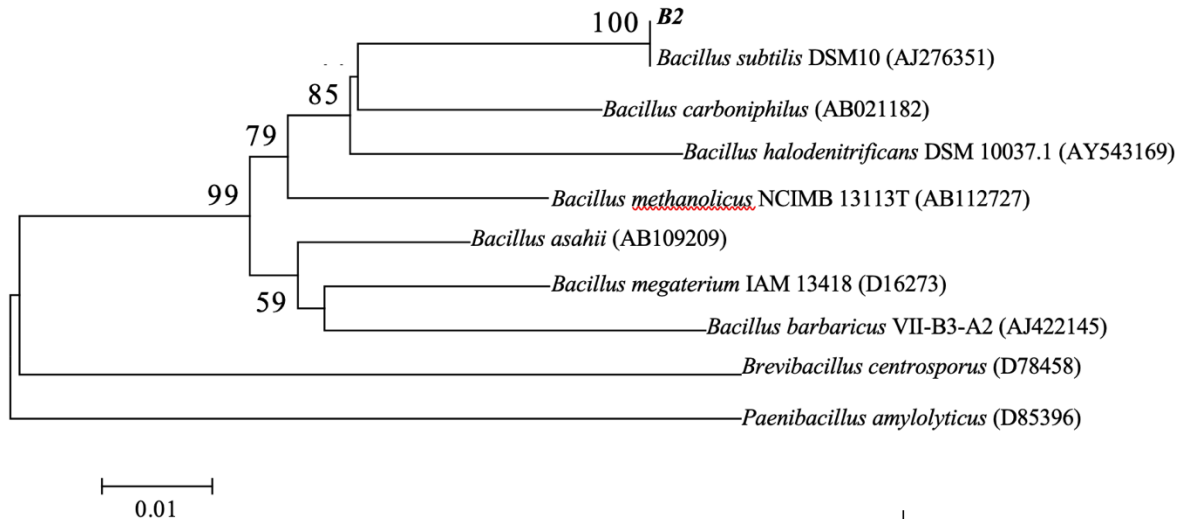
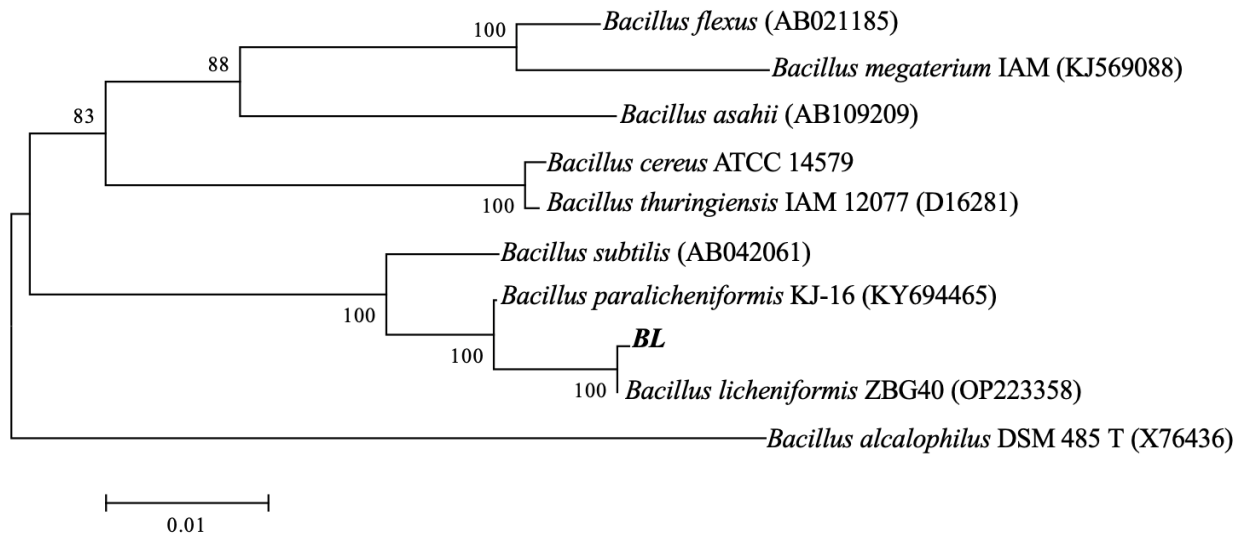
Kết hợp giữa kết quả phân tích trình tự 16S rRNA, mức độ tương đồng và đặc điểm hình thái – sinh học đã khảo sát, hai chủng vi khuẩn được định danh lần lượt là *B. licheniformis* (BL) và *B. subtilis* (B2), với tỷ lệ trùng khớp trình tự tuyệt đối (100%) khi đối chiếu với mẫu *B. licheniformis* ZBG40 và *B. subtilis* DSM10 (Hình 3.5). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các đặc điểm hình thái quan sát được trước đó, bao gồm tế bào hình que, Gram dương và khả năng sinh bào tử – những đặc trưng điển hình của chi *Bacillus*.

So sánh với các nghiên cứu trong nước, phát hiện này có sự nhất quán với hàng loạt báo cáo liên quan đến phân lập vi khuẩn có khả năng kháng *Vibrio* từ ao nuôi tôm, trong đó các chủng thuộc chi *Bacillus*, đặc biệt là *B. subtilis* và *B. licheniformis*, thường chiếm ưu thế và thể hiện hoạt tính sinh học nổi bật. Nguyễn Thị Thu Hằng và cộng sự (2025) đã thu nhận các dòng thuộc chi *Bacillus sp.* từ hệ sinh thái nuôi tôm nội địa với khả năng kháng *Vibrio* và sinh enzyme ngoại bào hiệu quả [76].

Ở quy mô quốc tế, các nghiên cứu gần đây cũng ghi nhận vai trò quan trọng của *Bacillus spp.* trong kiểm soát vi khuẩn gây bệnh thủy sản. Trong nghiên cứu của Ran và cộng sự (2023), các chủng *Bacillus sp.* được phân lập trực tiếp từ hệ thống nuôi tại Trung Quốc với khả năng ức chế *Vibrio*, trong khi Monzón-Atienza và cộng sự (2024) báo cáo các chủng *B. subtilis* có khả năng sinh đồng thời nhiều enzyme ngoại bào và hỗ trợ cải thiện môi trường nuôi [69, 75]. Điều này minh chứng cho sự trùng khớp về định hướng tuyển chọn các dòng *Bacillus* mang giá trị sử dụng lớn đối với ngành thủy sản ở quy mô quốc tế.

Đáng chú ý, cả hai loài *B. subtilis* và *B. licheniformis* được khảo sát và triển khai phổ biến trong vai trò các tác nhân probiotic trong nuôi tôm nhờ khả năng sinh bào tử bền vững, chịu được điều kiện môi trường khắc nghiệt (các yếu tố nhiệt hay nồng độ muối), cũng như khả năng sinh enzyme ngoại bào mạnh và sản xuất các hợp chất kháng khuẩn. Các đặc điểm này giúp nâng cao chỉ số môi trường, chuyển hóa mùn bã hữu cơ lắng đọng đồng thời tăng cường sức đề kháng cho vật nuôi.

Như vậy, kết quả định danh không chỉ xác định rõ vị trí phân loại của hai chủng BL và B2 mà còn chứng minh giá trị triển khai thực tiễn trong việc sản xuất các dòng sản phẩm probiotic hỗ trợ khống chế sự bùng phát của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.



Hình 3.5. Vị trí phân loại của các chủng vi khuẩn lựa chọn và các loài có quan hệ họ hàng gần

Bảng 3.4. Kết quả phân loại của 2 chủng vi khuẩn được lựa chọn

TT	Kí hiệu chủng	Tên phân loại	Độ tương đồng (%)
1	BL	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
2	B2	<i>Bacillus subtilis</i>	100

Từ các kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, sinh học và định danh phân tử, hai chủng vi khuẩn BL và B2 được xác định là các chủng tiềm năng với khả năng đối kháng mạnh đối với *V. parahaemolyticus*. Những đặc điểm này gợi ý rằng hoạt tính kháng khuẩn của các chủng không chỉ phụ thuộc vào

khả năng cạnh tranh sinh học mà còn gắn liền với quá trình tiết các hoạt chất thứ cấp có hoạt tính sinh học.

Trong số các nhóm vi khuẩn được nghiên cứu, các chủng vi khuẩn bản địa thuộc chi *Bacillus* được đánh giá là những đối tượng triển vọng nhờ những đặc tính ưu việt như an toàn sinh học cao, khả năng hình thành bào tử giúp tăng độ ổn định và năng lực chống chịu trước các yếu tố bất lợi từ ngoại cảnh. Đặc biệt, hàng loạt báo cáo thực nghiệm xác nhận *Bacillus* sở hữu năng lực tổng hợp đa dạng những thành phần có tính kháng sinh như lipopeptide (surfactin, iturin, fengycin), amicoumacin và các enzyme ngoại bào có hoạt tính sinh học cao [77, 78, 79]. Ngoài ra, một số dòng *Bacillus* còn sở hữu cơ chế can thiệp vào hệ thống quorum sensing ở *Vibrio*, qua đó suy giảm độc tố và năng lực phát sinh bệnh lý [79]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, việc ứng dụng *Bacillus* bản địa và các hoạt chất sinh học do chúng tạo ra là một hướng đi đầy triển vọng, góp phần thay thế kháng sinh trong kiểm soát bệnh do *Vibrio* trong nuôi tôm [80].

Một ví dụ tiêu biểu phải kể đến báo cáo từ Wang và đồng nghiệp (2020) khi khảo sát dòng *Bacillus subtilis* BSXE-1601. Nhóm tác giả đã chứng minh được rằng chủng này có khả năng sinh tổng hợp amicoumacin A, một hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với những vi sinh vật gây hại ở tôm, điển hình là *Vibrio parahaemolyticus* gây AHPND [81]. Nghiên cứu không chỉ dừng lại ở việc xác định hoạt chất chính mà còn tiến hành giải đoán các cluster gen quy định con đường tổng hợp hoạt chất, qua đó cung cấp bằng chứng thuyết phục rằng các chủng *Bacillus* bản địa có thể đóng vai trò nguồn dẫn xuất tiềm năng cho những phân tử đối kháng *Vibrio* mang ý nghĩa thực tiễn lớn trong thực tiễn nuôi trồng thủy sản.

Chen và cộng sự (2024) đã phân lập từ môi trường nuôi thủy sản chủng *Bacillus subtilis* O-741 có phổ đối kháng mạnh với *V. parahaemolyticus* và nhiều loài *Vibrio* khác [82]. Đáng chú ý, dịch nuôi cấy không tế bào của chủng này vẫn duy trì hoạt tính kháng khuẩn ổn định sau khi xử lý nhiệt, acid, UV, enzyme và dung môi hữu cơ. Khi phân tích UPLC-MS/MS, hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn được xác định là amicoumacin A. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, hợp chất này có tác dụng diệt khuẩn thông qua việc phá vỡ cấu trúc màng tế bào và hình thành các khoang rỗng trên tế bào *V. parahaemolyticus*.

Bên cạnh đó, trong mô hình thử nghiệm trên *Artemia*, chủng O-741 đã cho thấy hiệu quả nâng cao rõ rệt tỷ lệ sống sót của quần thể ấu trùng trước sự xâm nhiễm từ *V. parahaemolyticus*, qua đó minh chứng cho giá trị triển khai thực tế của chúng trong việc khống chế dịch bệnh do *Vibrio* gây ra ở ngành thủy sản.

Do đó, để làm rõ bản chất của hoạt tính kháng khuẩn và đánh giá tiềm năng ứng dụng, các nghiên cứu tiếp theo được tiến hành nhằm tách chiết, đánh giá hoạt tính và xác định đặc tính sinh học của các hợp chất kháng *Vibrio parahaemolyticus* có nguồn gốc từ các chủng vi khuẩn lựa chọn.

3.2. Tách chiết, đánh giá hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* và xác định thành phần hóa học của hoạt chất sinh học từ vi khuẩn lựa chọn

3.2.1. Tách chiết và đánh giá hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của dịch chiết chứa hoạt chất sinh học từ vi khuẩn

Sau khi tách chiết các hoạt chất sinh học từ hai chủng vi khuẩn tiềm năng *Bacillus licheniformis* BL và *Bacillus subtilis* B2 bằng các dung môi khác nhau (mục 3.2.1), việc đánh giá hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* của các cao chiết được thực hiện nhằm xác định hiệu lực sinh học và lựa chọn dung môi tách chiết phù hợp. Sự khác biệt về độ phân cực, độ tan cùng trạng thái bền vững của các phân tử trong hệ dung môi khác nhau có tác động trực tiếp tới hàm lượng hoạt chất cũng như hoạt lực của cao chiết thu được.

Các dịch chiết từ hai chủng BL và B2, được thu nhận thông qua hệ thống dung môi có dải phân cực đa dạng, được sử dụng để đánh giá năng lực đối kháng *V. parahaemolyticus* bằng các phép thử nghiệm trong điều kiện phòng thí nghiệm (in vitro). Năng lực diệt khuẩn được đánh giá thông qua mức độ kìm hãm sự phát triển của chủng chỉ thị, giúp đối chiếu sức mạnh của từng mẫu chiết và xem xét tầm quan trọng của dung môi trong quá trình tách chiết.

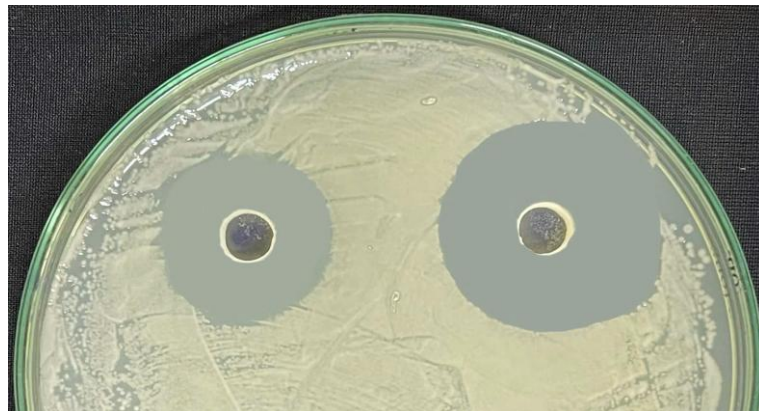
Cụ thể, các mẫu dịch chiết sau khi cô quay được tái hòa tan vào dung môi phù hợp trước khi thực hiện thử nghiệm bằng kỹ thuật khuếch tán đĩa thạch. Chủng kiểm định *V. parahaemolyticus* NT09 được hoạt hóa, nuôi cấy tới nồng độ tế bào đạt chuẩn và được dàn đều trên lớp thạch môi trường nuôi cấy. Các đĩa giấy vô trùng (đường kính 6 mm) được bổ sung một thể tích xác định của từng mẫu cao chiết, làm khô trong điều kiện vô trùng và đặt lên bề mặt thạch đã được cấy vi khuẩn. Đồng thời, các đối chứng được bố trí song song, bao gồm đối chứng âm (dung môi không chứa cao chiết) và đối chứng trắng (đĩa

giấy không bổ sung mẫu), nhằm loại trừ ảnh hưởng của dung môi và vật liệu mang.

Quá trình nuôi cấy trên đĩa thạch được duy trì tại 30 °C trong thời gian 24 tiếng, kế đến, kích thước vòng kháng khuẩn bao quanh đĩa giấy lọc được ghi nhận. Mỗi công thức được lặp lại ít nhất ba lần, kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình. Dựa trên số liệu thu được, hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết từ hai chủng BL và B2 trong các hệ dung môi khác nhau được so sánh, qua đó xác định dung môi tách chiết hiệu quả nhất. Kết quả được tổng hợp và trình bày trong Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Hoạt tính kháng *Vibrio parahaemoliticus* NT09 của các cao chiết từ hai chủng BL và B2 thu nhận bằng các dung môi khác nhau

STT	Chủng vi khuẩn	Dung môi chiết	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
1	<i>Bacillus licheniformis</i> BL	<i>n</i> -hexane	21±2
		Ethyl acetate	32±0,4
		Chloroform	16±0,6
2	<i>Bacillus subtilis</i> B2	<i>n</i> -hexane	15,4±0,8
		Ethyl acetate	25±0,3
		Chloroform	13,5±1,2
3	Đối chứng	<i>n</i> -hexane	0
		Ethyl acetate	0
		Chloroform	0



Hình 3.6. Hoạt tính kháng *Vibrio parahaemoliticus* của các cao chiết từ hai chủng BL và B2 thu nhận bằng dung môi ethyl acetate

Kết quả trình bày trong Bảng 3.5 và Hình 3.6 cho thấy các dịch chiết thu nhận từ hai chủng *Bacillus licheniformis* BL và *Bacillus subtilis* B2 đều có khả năng ức chế sự sinh trưởng của *Vibrio parahaemolyticus* NT09, tuy nhiên hiệu lực kháng khuẩn khác nhau rõ rệt giữa các dung môi tách chiết. Các dung môi sử dụng làm đối chứng âm không tạo vòng vô khuẩn đối với chủng kiểm định *V. parahaemolyticus* NT09, cho thấy hoạt tính kháng khuẩn ghi nhận được là do các hợp chất sinh học trong dịch chiết chứ không phải do tác động của dung môi. Trong đó, dịch chiết thu được bằng dung môi ethyl acetate thể hiện hoạt tính mạnh nhất ở cả hai chủng, với đường kính vòng vô khuẩn đạt $32 \pm 0,4$ mm (chủng BL) và $25 \pm 0,3$ mm (chủng B2). Kết quả này khẳng định ethyl acetate là dung môi thích hợp nhất trong việc chiết tách các phân tử mang đặc tính đối kháng của *V. parahaemolyticus* từ hai chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Hiệu quả vượt trội của ethyl acetate có thể được lý giải bởi tính chất bán phân cực của dung môi này, cho phép hòa tan hiệu quả nhiều nhóm hợp chất sinh học quan trọng như lipopeptide (surfactin, iturin, fengycin), polyketide và các hợp chất phenolic – những chất được xác nhận sở hữu khả năng diệt khuẩn hữu hiệu trên các đối tượng Gram âm, bao gồm *Vibrio* spp. [34, 83]. Hàng loạt báo cáo thực nghiệm nhận định rằng những hoạt chất kháng sinh từ *Bacillus* spp. có xu hướng tập trung chủ yếu trong phân đoạn ethyl acetate do đặc tính hòa tan của chúng trong pha hữu cơ trung gian.

Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với nhiều công bố quốc tế. Cụ thể, nghiên cứu của Zhang và cộng sự (2021) minh chứng rằng cao chiết ethyl acetate thu nhận từ *Bacillus licheniformis* thể hiện hoạt lực kháng *V. parahaemolyticus* cao với chỉ số vòng kháng khuẩn đạt mức 20–30 mm [84]. Tương tự, Chen và cộng sự (2024) đã phân lập hợp chất amicoumacin A từ dịch chiết ethyl acetate của *Bacillus subtilis* và chứng minh khả năng tiêu diệt *V. parahaemolyticus* thông qua cơ chế phá hủy màng tế bào [82]. Ngoài ra, Gao và cộng sự (2018) cũng ghi nhận rằng các hợp chất lipopeptide thu nhận bằng ethyl acetate từ *Bacillus* spp [85] có phổ kháng khuẩn rộng, trong đó có hiệu quả cao đối với các loài *Vibrio* gây bệnh đối với ngành thủy sản.

Tại Việt Nam, những khảo sát trên các dòng vi sinh vật bản xứ thuộc quần thể nuôi tôm cũng cho thấy xu hướng tương tự. Một số công bố tại Việt Nam [86] đã ghi nhận rằng các cao chiết từ vi khuẩn *Bacillus* thu nhận bằng

dung môi ethyl acetate thường thể hiện khả năng đối kháng *Vibrio* ưu việt hơn hẳn khi đối soát với các dung môi phân khác. Điều này cho thấy các hợp chất kháng khuẩn có nguồn gốc vi khuẩn bản địa chủ yếu thuộc nhóm chất có độ phân cực trung bình và dễ được thu nhận trong pha hữu cơ.

Như vậy, dung môi ethyl acetate là lựa chọn thích hợp nhất để tách chiết các hợp chất kháng *V. parahaemolyticus* từ hai chủng vi khuẩn BL và B2. Kết quả này không chỉ phù hợp với xu hướng chung của các nghiên cứu trong và ngoài nước mà còn tạo tiền đề lý luận then chốt cho các giai đoạn triển khai kế tiếp, bao gồm xác định MIC, độ bền và tính chất sinh học của các hoạt chất kháng khuẩn, cũng như sản xuất các dòng probiotic hỗ trợ không chế dịch bệnh do *Vibrio* gây ra ở vật nuôi thủy sản.

3.2.2. Xác định thành phần hóa học của dịch chiết ethyl acetate

Do dịch chiết bằng dung môi ethyl acetate của chủng *B. licheniformis* BL có hoạt tính cao hơn các dịch chiết bằng các dung môi khác cũng như dịch chiết của chủng *B. subtilis* B2, nên dịch chiết này đã được phân tích đánh giá thành phần hóa học cũng như dự đoán cấu trúc của hợp chất chính có trong cao chiết đó. Các phương pháp phân tích hóa học như HPLC, FTIR, XRD và LCMS đã được sử dụng.

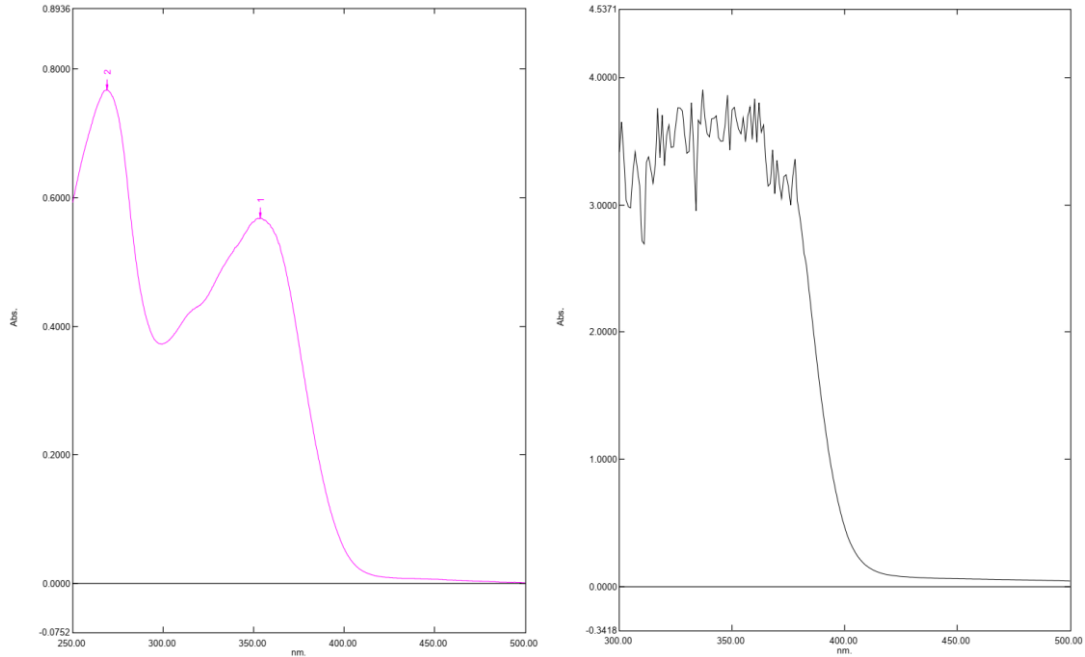
Bên cạnh đó, trong bối cảnh sự bùng phát của hiện tượng kháng kháng sinh cùng các rào cản trong việc dùng hóa chất ở ngành thủy sản, tận dụng những phân tử sinh học từ vi sinh vật đang trở thành một định hướng thay thế khả thi và lâu dài nhằm không chế *V. parahaemolyticus*. Tuy nhiên, đa số những báo cáo chuyên ngành mới chỉ tập trung vào giai đoạn đánh giá năng lực ức chế trong ống nghiệm (in vitro), rong khi đó, các thông tin liên quan đến quy trình thu nhận, chuẩn hóa nồng độ cũng như bản chất sinh hóa của các hoạt chất kháng sinh vẫn chưa được làm rõ, nhất là trên đối tượng các dòng vi sinh vật có nguồn gốc nội địa.

Kết quả phân tích HPLC

Kết quả kiểm tra phổ UV của hợp chất tách chiết từ các chủng BL và B2 được trình bày ở Hình 3.7. Hình 3.7a. biểu diễn phổ biến thiên của một đại lượng theo bước sóng trong khoảng 300–500 nm (trục hoành), với giá trị đại lượng tương ứng trên trục tung. Có thể nhận thấy rằng tín hiệu tăng dần từ vùng tử ngoại gần (~300 nm) và đạt cực đại cục bộ vào khoảng 340–350 nm, với giá

trị xấp xỉ 0,05. Đỉnh này gợi ý sự hiện diện của một dải hấp thụ/hoặc phát xạ đặc trưng, có thể liên quan đến chuyển mức điện tử của hệ vật chất khảo sát. Sau điểm cực đại, cường độ giảm rất nhanh khi bước sóng tăng, cho thấy quá trình suy giảm mạnh của cơ chế tương tác chính chi phối tín hiệu trong vùng này.

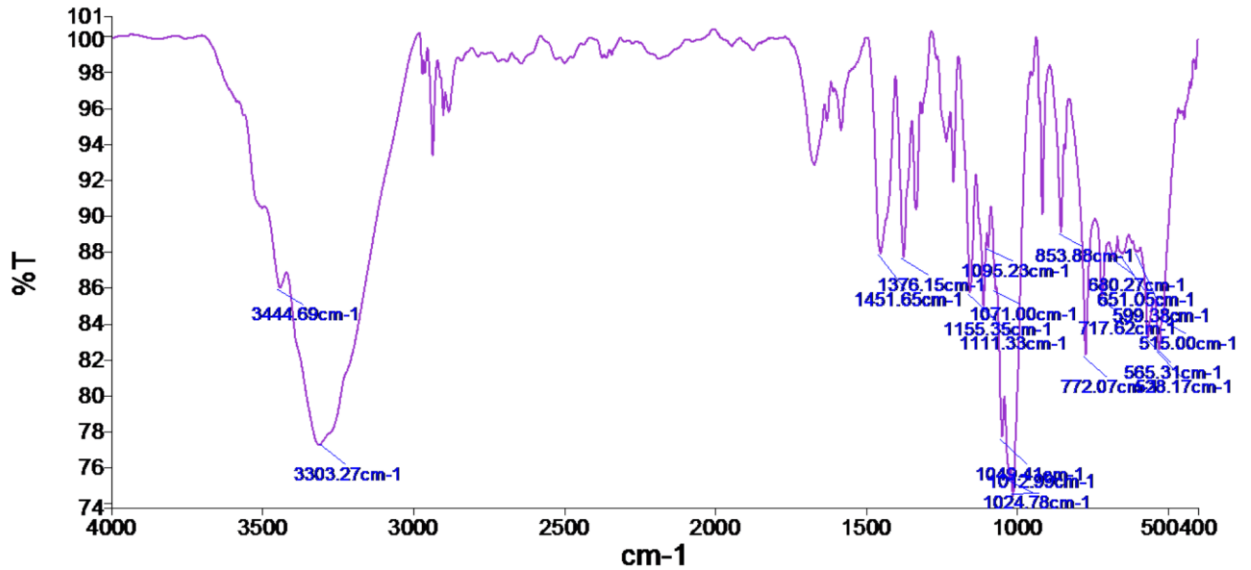
Hình 3.7b. thể hiện phổ hấp thụ (Abs.) của mẫu trong khoảng bước sóng 300–500 nm. Có thể quan sát thấy tín hiệu hấp thụ duy trì ở mức cao trong vùng tử ngoại gần (300–360 nm), với giá trị dao động quanh 3,0–4,0. Sự dao động tương đối mạnh của đường cong trong vùng này cho thấy có thể tồn tại nhiều đo hoặc các dải hấp thụ chồng lấp từ nhiều chuyển mức điện tử khác nhau trong hệ. Từ khoảng 360–370 nm trở đi, phổ bắt đầu suy giảm rõ rệt và giảm rất nhanh trong khoảng 370–410 nm, hình thành một “mép hấp thụ” (absorption edge) đặc trưng. Hiện tượng này thường liên quan đến ngưỡng năng lượng cần thiết để kích thích chuyển mức điện tử, và do đó có thể được sử dụng để ước lượng năng lượng vùng cấm (band gap) của vật liệu (nếu mẫu là chất bán dẫn hoặc vật liệu có cấu trúc vùng năng lượng). Sau khoảng 410 nm, giá trị hấp thụ giảm về gần 0 và duy trì ở mức rất thấp trong toàn bộ vùng khả kiến còn lại (410–500 nm). Điều này cho thấy vật liệu hầu như không hấp thụ ánh sáng trong vùng bước sóng dài hơn, hàm ý tính trong suốt tương đối trong vùng khả kiến. Tổng thể, phổ cho thấy đặc trưng của một hệ có khả năng hấp thụ mạnh trong vùng tử ngoại và suy giảm nhanh sang vùng khả kiến, phù hợp với các vật liệu có vùng cấm rộng



Hình 3.7. Phổ UV của hoạt chất thu được; a) Bức song hấp thụ cực đại; b) Tạp chất hấp thụ ánh sáng

Kết quả phân tích FTIR

Kết quả phân tích phổ hồng ngoại FTIR được thể hiện ở Hình 3.8. Kết quả cho thấy, phổ hồng ngoại (IR) thu được cho thấy các đặc trưng hấp thụ điển hình của hợp chất hữu cơ chứa các nhóm chức năng chính. Đỉnh rộng mạnh tại khoảng 3446 cm^{-1} chỉ ra sự rung vĩ độ O-H của liên kết hydro, thường gặp ở rượu hoặc phenol. Các đỉnh đôi sắc nét tại 3032 cm^{-1} và 2953 cm^{-1} tương ứng với rung vĩ độ C-H của liên kết C-H sp^2 (aromatic) và sp^3 (alkane), chứng tỏ sự hiện diện của vòng thơm và chuỗi alkyl. Vùng $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ hiển thị các đỉnh tại 1601 , 1585 , 1509 cm^{-1} , đặc trưng cho rung khung C=C của vòng benzen. Đỉnh mạnh tại 1471 cm^{-1} gợi ý rung biến dạng C-H của nhóm $\text{-CH}_2\text{-}$, trong khi các đỉnh yếu hơn ở vùng thấp hơn ($<1000\text{ cm}^{-1}$) có thể liên quan đến rung C-O hoặc biến dạng khung. Kết quả phổ khẳng định hợp chất chứa phenol hoặc rượu thơm với thay thế alkyl trên vòng benzen.



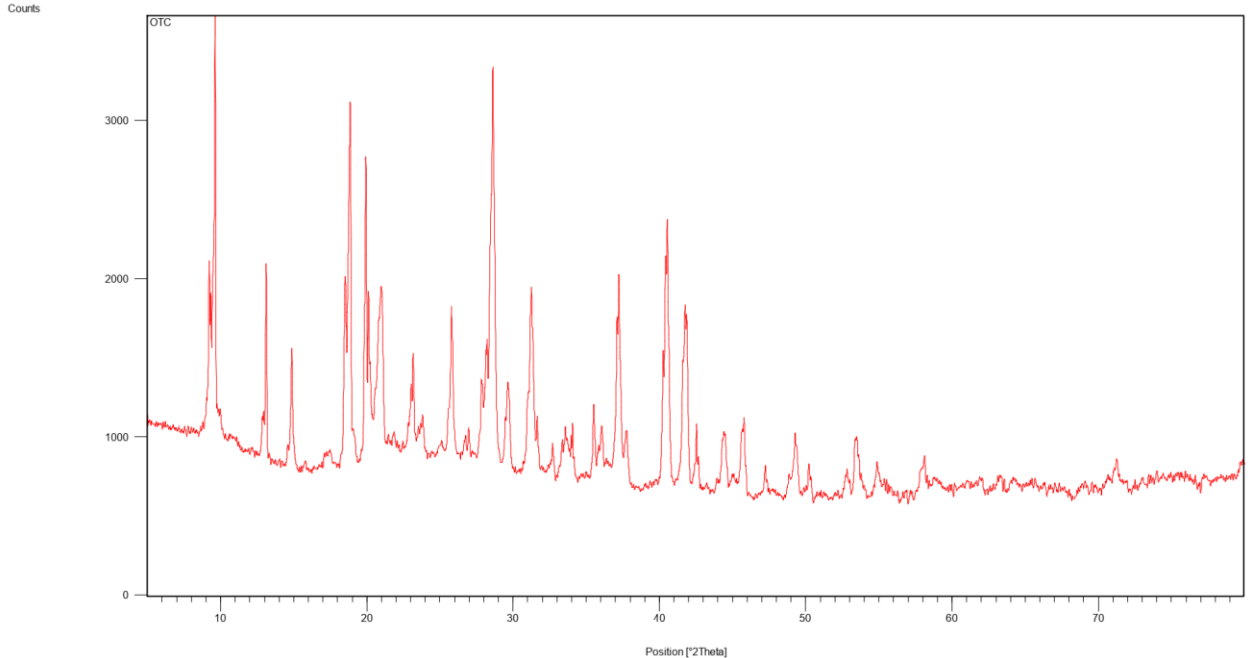
Hình 3.8. Phổ FTIR của hoạt chất thu được

Kết quả phân tích XRD

Tiếp tục phân tích nhiễu xạ tia X (XRD) của hoạt chất thu được, kết quả được thể hiện ở Hình 3.9. Kết quả cho thấy, Hình biểu diễn giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) của mẫu trong khoảng góc 2θ từ $\sim 5^\circ$ đến 80° , với cường độ nhiễu xạ (Counts) trên trục tung.

Có thể nhận thấy phổ nhiễu xạ xuất hiện nhiều đỉnh sắc nét với cường độ cao, đặc biệt tập trung trong vùng góc thấp đến trung bình (khoảng $10\text{--}45^\circ$). Sự hiện diện của các đỉnh hẹp và có độ phân giải tốt là chỉ dấu đặc trưng của cấu trúc tinh thể có độ trật tự cao, cho thấy mẫu có mức độ kết tinh đáng kể. Một số đỉnh nổi bật với cường độ vượt trội (ví dụ quanh $\sim 10^\circ$, $\sim 20\text{--}22^\circ$, $\sim 28\text{--}30^\circ$ và $\sim 40^\circ$) gợi ý các mặt tinh thể ưu tiên định hướng hoặc các pha tinh thể chiếm ưu thế trong vật liệu. Ngoài ra, nền nhiễu xạ giảm dần theo góc 2θ và tương đối ổn định ở vùng góc lớn ($>50^\circ$), cho thấy đóng góp của pha vô định hình (nếu có) là không đáng kể hoặc chỉ tồn tại ở mức thấp. Tuy nhiên, sự xuất hiện của rất nhiều đỉnh nhiễu xạ phân bố dày đặc trên toàn dải góc cũng có thể hàm ý rằng mẫu không phải là đơn pha, mà có khả năng là hệ đa pha hoặc chứa nhiều cấu trúc tinh thể khác nhau chồng lấp. Độ rộng nửa cực đại (FWHM) của các đỉnh nhìn chung khá nhỏ, hàm ý kích thước miền tinh thể tương đối lớn và/hoặc ứng suất vi mô trong mạng tinh thể thấp. Tuy nhiên, để định danh chính xác các pha tinh thể hiện diện, cần tiến hành so sánh vị trí và cường độ các đỉnh với cơ sở dữ liệu chuẩn (ví dụ JCPDS/ICDD), cũng như có thể áp dụng các phương pháp

ting chỉnh cấu trúc như Rietveld. Tổng thể, giản đồ XRD cho thấy mẫu có tính kết tinh cao với nhiều đỉnh đặc trưng rõ ràng, đồng thời gợi ý khả năng tồn tại đa pha, đòi hỏi các phân tích định lượng sâu hơn để làm sáng tỏ bản chất cấu trúc của vật liệu.



Hình 3.9. Giản đồ XRD của hoạt chất thu được

Kết quả phân tích LCMS

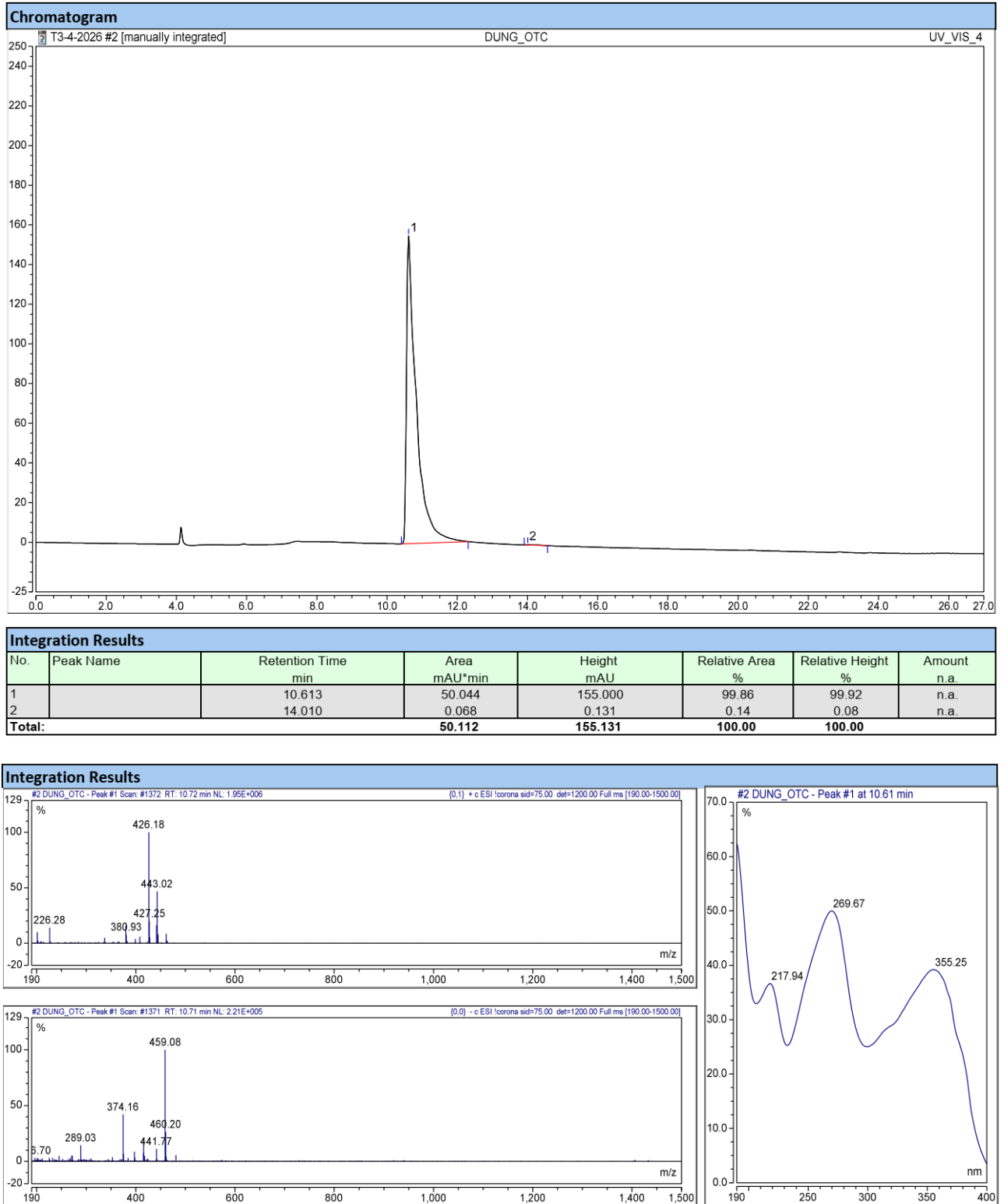
Hoạt chất thu được tiếp tục được phân tích bằng phương pháp LC-MS (Hình 3.10), kết quả cho thấy có 2 chất chính trong hình ở thời gian lưu 10,613 và 14,010 phút. **Pic 1 (chính)**: thời gian lưu là 10,613 phút; diện tích: 50,044 mAU·min; chiều cao: 155,000 mAU; diện tích tương đối: 99,86% và chiều cao tương đối: 99,92%. **Pic 2 (phụ)**: thời gian lưu là 14,010 phút; diện tích: 0,068 mAU·min; chiều cao: 0,131 mAU; diện tích tương đối: 0,14% và chiều cao tương đối: 0,08%. Pic chính có dạng đối xứng tương đối tốt, tuy nhiên có hiện tượng kéo đuôi nhẹ (tailing), thể hiện qua phần đuôi kéo dài sau đỉnh pic. Điều này có thể liên quan đến tương tác thứ cấp giữa chất phân tích và pha tĩnh hoặc điều kiện sắc ký chưa tối ưu hoàn toàn. Pic phụ xuất hiện với diện tích rất nhỏ (~0,14%), cho thấy mẫu gần như tinh khiết, với hàm lượng tạp chất không đáng kể. Mức độ này thường nằm trong giới hạn chấp nhận được đối với nhiều phép phân tích định tính và định lượng thông thường. Như vậy, có thể thấy rằng mẫu phân tích có độ tinh khiết cao, thành phần chính chiếm gần như toàn bộ (~99,86%).

Dựa trên hình ảnh kết quả phân tích LC-MS và phổ UV-Vis cho thấy kết quả phân tích của dịch chiết tại thời gian lưu khoảng 10.61 phút. Phổ hấp thụ UV-Vis này có các đặc điểm cấu trúc đặc trưng như các cực đại hấp thụ xuất hiện ba dải hấp thụ chính tại 217.94 nm, 269.67 nm (mạnh nhất) và 355.25 nm. Kết quả này về sự hiện diện của dải hấp thụ trong vùng 355 nm cho thấy hợp chất có hệ thống nối đôi liên hợp kéo dài (chromophore), thường gặp ở các dẫn xuất flavonoid, kháng sinh nhóm tetracycline hoặc các hợp chất đa vòng thơm.

Bên cạnh đó, dữ liệu MS bao gồm cả hai chế độ ion hóa (ESI+ và ESI-), trong đó chế độ ion dương (ESI+) giúp xác định chính xác khối lượng phân tử với Pic cơ sở (Base peak) tại m/z 426,18. Đây có khả năng là ion $[M+H]^+$ hoặc một mảnh đặc trưng. Sự xuất hiện của cụm pic tại m/z 443,02 có thể tương ứng với cấu trúc $[M+NH_4]^+$ hoặc $[M+Na-H]^+$ tùy vào bản chất chất đệm. Còn với chế độ Ion âm (ESI-) cho thấy Pic chính tại m/z 459,08. Nếu so sánh với kết quả ESI+, sự chênh lệch khối lượng giữa 459,08 (âm) và 426,18 (dương) cho thấy có sự tạo liên kết với anion (có thể là $[M+Cl]^-$ nếu mẫu có muối clorua hoặc $[M+Formate]^-$). Các pic mảnh khác như 374,16 phản ánh sự mất đi các nhóm chức trung hòa (ví dụ: $-H_2O$, $-CO_2$) từ khung phân tử chính.

Kết quả cho thấy: Tại thời gian lưu 10,61 phút, cả tín hiệu MS và UV đều hội tụ, chứng minh pic phân tách là của một hợp chất đơn lẻ. Dựa trên các peak m/z đặc trưng (quanh vùng 440-460) cùng phổ UV ba cực đại, Kết quả này cho thấy hoạt chất thu được có nhiều đặc điểm tương đồng với nhóm tetracycline, đặc biệt là oxytetracycline (một loại kháng sinh phổ rộng có trọng lượng phân tử là 460,4 g/mol). Đường nền trong phổ MS rất sạch, ít nhiễu tạp, cho thấy quá trình xử lý mẫu tốt và điều kiện ion hóa tối ưu.

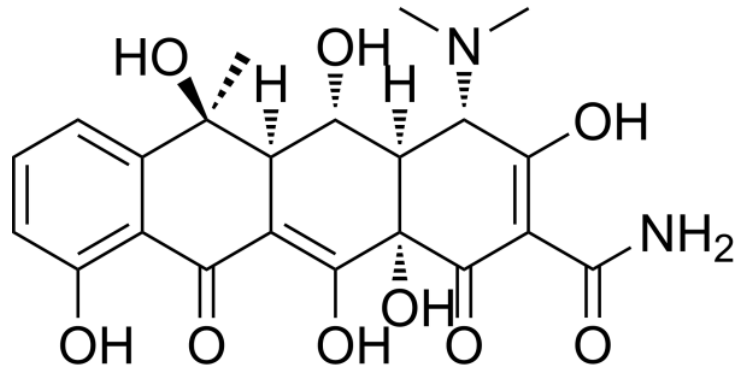
Như vậy, các dữ liệu hiện có cho phép nhận định sơ bộ mẫu có độ tinh khiết quang học và khối phổ cao. Hợp chất mục tiêu đã được tách thành công và có đặc điểm lý hóa nhất quán với các hợp chất hữu cơ đa vòng có hoạt tính sinh học và được dự đoán thuộc nhóm tetracycline.



Hình 3.10. Kết quả LC-MS của hoạt chất thu được

Dựa trên các kết quả phân tích UV, FTIR, XRD và LC-MS, hoạt chất thu được có nhiều đặc điểm tương đồng với oxytetracycline. Tuy nhiên, do chưa thực hiện các phân tích cấu trúc chuyên sâu như NMR hoặc so sánh với chất chuẩn thương mại, chưa đủ cơ sở để khẳng định chắc chắn hoạt chất là

oxytetracycline. Vì vậy, trong phạm vi nghiên cứu này, hoạt chất được xác định là hợp chất có đặc điểm hóa học tương đồng với oxytetracycline.



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của oxytetracycline

Cho tới nay hợp chất oxytetracycline được xem là một loại kháng sinh do *Streptomyces* sp. sinh ra, sở hữu năng lực kháng đa dạng các chủng vi khuẩn gây hại [87, 88]. Bên cạnh đó, chi *Bacillus* được xem là có khả năng sinh ra nhiều hợp chất lipopeptide và nhóm lipopeptide cũng minh chứng được tiềm năng triển khai thực tế lớn trong ngành thủy sản. Nghiên cứu gần đây của Zhou và cộng sự (2025) cho thấy surfactin do *B. subtilis* tạo ra thể hiện hoạt lực đối kháng mạnh mẽ với tác nhân *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND, đạt giá trị MIC ở mức 0,125 mg/ml. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng surfactin không chỉ gây tổn thương cấu trúc màng tế bào mà còn tác động lên nhiều cơ chế phân tử khác nhau của vi khuẩn gây bệnh, góp phần làm suy giảm khả năng sống và độc lực của *Vibrio* [89]. Những phát hiện này nhấn mạnh tiềm năng của nhóm lipopeptide như một nguồn hoạt chất sinh học đầy triển vọng, có thể ứng dụng trong phòng và kiểm soát bệnh do *Vibrio* trong nuôi tôm theo hướng thay thế kháng sinh. Trong một công bố gần đây, Xiang và đồng sự (2024) đã thu nhận dòng *B. subtilis* JSHY-K3 từ bùn ao nuôi tôm và ghi nhận chủng này có khả năng giúp tiết giảm rõ rệt tỷ lệ tử vong ở quần thể tôm khi bị xâm nhiễm bởi *V. parahaemolyticus* gây AHPND [90]. Phân tích hệ gen cho thấy chủng này sở hữu 12 cụm gen liên quan đến tổng hợp sinh học những dòng chuyển hóa thứ cấp, đồng thời khi phân tích metabolomics gợi ý sự hiện diện của ít nhất 4 hợp chất có tiềm năng ức chế *Vibrio*, trong đó có surfactin. Mặc dù vậy, các dữ liệu khoa học về năng lực sản sinh oxytetracycline từ chi *Bacillus* vẫn còn khá hạn chế. Do đó, kết quả này tiếp tục củng cố vai trò của các chủng *Bacillus* bản địa

như một nguồn sinh học đa chức năng, có thể đồng thời tạo ra nhiều hoạt chất góp phần kiểm soát hiệu quả vi khuẩn gây bệnh đối với lĩnh vực nuôi trồng thủy sản.

Trên cơ sở các chủng vi khuẩn đã được tuyển chọn có hoạt tính đối kháng mạnh (mục 3.1), trong phần này tập trung tách chiết và đánh giá các hoạt chất sinh học do các chủng này sinh tổng hợp. Các hợp chất thứ cấp như bacteriocin, lipopeptide và enzyme ngoại bào đã được chứng minh đóng vai trò quan trọng trong cơ chế ức chế *Vibrio* [91, 92], song hiệu lực và tính ổn định của chúng phụ thuộc lớn vào nguồn gốc phân lập và điều kiện nuôi cấy.

Trong phần này, các hoạt chất sinh học được thu nhận từ dịch nuôi cấy thông qua các phương pháp tách chiết phù hợp, sau đó đánh giá hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* bằng các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm. Hiệu lực kháng khuẩn của các dịch chiết được định lượng thông qua việc xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), từ đó cho phép so sánh một cách chính xác mức độ ức chế giữa các cao chiết [93]. Đồng thời, các đặc tính quan trọng như độ bền nhiệt, pH và khả năng chịu tác động enzyme được khảo sát nhằm làm rõ tiềm năng ứng dụng của các hợp chất trong điều kiện môi trường nuôi tôm. Cách tiếp cận này không chỉ góp phần lấp đầy khoảng trống về dữ liệu liên quan đến hoạt chất sinh học từ vi khuẩn bản địa, mà còn cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các chế phẩm sinh học kiểm soát bệnh do *Vibrio* trong nuôi trồng thủy sản.

3.3. Đánh giá hiệu quả ức chế và xác định nồng độ ức chế của các dịch chiết đã tách chiết được

Sau khi xác định được dung môi thích hợp nhất để tách chiết các hợp chất kháng *Vibrio* từ chủng BL và B2 (mục 3.2.2), nghiên cứu tiếp tục đánh giá đặc tính sinh học của các hoạt chất thu nhận được. Giá trị MIC được xác định nhằm định lượng chính xác hiệu lực kháng khuẩn của cao chiết. Đồng thời, độ bền nhiệt và độ ổn định theo pH được khảo sát để đánh giá khả năng duy trì hoạt tính trong các điều kiện môi trường khác nhau. Bên cạnh đó, các cao chiết được xử lý với các enzyme đặc hiệu nhằm đánh giá sơ bộ bản chất hóa sinh của các hoạt chất kháng khuẩn [77, 78, 92].

3.3.1. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) của các cao chiết được xác định bằng phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng trên đĩa 96 giếng, theo nguyên tắc pha loãng bậc hai liên tiếp. Các cao chiết sau khi được hòa tan trong dung môi thích hợp được pha loãng dần trong môi trường nuôi cấy để tạo dãy nồng độ khảo sát.

Chủng kiểm định *Vibrio parahaemolyticus* NT09 được hoạt hóa và điều chỉnh về mật độ khoảng 10^6 CFU/mL, sau đó bổ sung vào các giếng chứa dãy nồng độ cao chiết. Thí nghiệm được bố trí với các đối chứng bao gồm: đối chứng âm (môi trường + vi khuẩn, không bổ sung cao chiết), đối chứng dung môi (môi trường + vi khuẩn + dung môi tương ứng) và đối chứng trắng (môi trường không chứa vi khuẩn) nhằm đảm bảo độ chính xác của kết quả. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 30 °C trong 18–24 giờ. Sau thời gian ủ, khả năng tăng trưởng của chủng vi khuẩn mục tiêu được xác định bằng quan sát độ đục hoặc đo mật độ quang (OD-600 nm).

Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các cao chiết đối với *Vibrio parahaemolyticus* NT09 cho thấy khả năng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn kiểm định phụ thuộc rõ rệt vào nồng độ cao chiết. Khi nồng độ giảm dần, mức độ sinh trưởng của vi khuẩn kiểm định tăng lên tương ứng, thể hiện qua sự xuất hiện độ đục trong môi trường nuôi cấy.

Giá trị MIC được xác định là nồng độ thấp nhất của cao chiết tại đó không quan sát thấy sự sinh trưởng của vi khuẩn kiểm định. Giá trị MIC thu được được trình bày trong Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Giá trị MIC của các cao chiết từ hai chủng BL và B2 đối với *Vibrio parahaemolyticus* NT09

STT	Chủng vi khuẩn	Dịch chiết	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
1	<i>Bacillus licheniformis</i> BL	Dịch chiết ethyl acetate	$32 \pm 2,5$
2	<i>Bacillus subtilis</i> B2	Dịch chiết ethyl acetate	$64 \pm 3,1$

Kết quả trong Bảng 3.6 minh chứng rằng những mẫu chiết thu được qua hệ thống dung môi ethyl acetate từ hai chủng *Bacillus licheniformis* BL và *Bacillus subtilis* B2 đều có khả năng ức chế hiệu quả *Vibrio parahaemolyticus* NT09. Trong đó, cao chiết từ chủng BL ghi nhận hiệu lực đối kháng ưu việt hơn với ngưỡng MIC tương ứng là $32 \pm 2,5$ $\mu\text{g/mL}$, thấp hơn so với chủng B2

($64 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$). Sự khác biệt này phản ánh tiềm năng sản sinh các phân tử kháng sinh có sự khác biệt về mặt di truyền giữa hai dòng vi sinh vật.

Hoạt tính kháng khuẩn cao của chủng BL có thể liên quan đến khả năng sinh tổng hợp các lipopeptide đặc trưng như lichenysin, surfactin và iturin, vốn có cơ chế tác động lên màng tế bào vi khuẩn Gram âm [77, 78, 83]. Trong khi đó, *Bacillus subtilis* cũng tạo ra đa dạng các phân tử mang hoạt tính sinh học tiêu biểu là amicoumacin, subtilin và fengycin, tuy nhiên hiệu lực kháng khuẩn có xu hướng biến thiên dựa trên đặc tính riêng biệt của từng chủng cũng như các yếu tố môi trường nuôi cấy.

So sánh với các nghiên cứu trên thế giới cho thấy chỉ số MIC ghi nhận được hoàn toàn tương ứng với dải giá trị đặc trưng của những phân tử kháng sinh chiết xuất từ *Bacillus*. Cụ thể, MIC của dịch chiết từ *Bacillus licheniformis* đối với *V. parahaemolyticus* được báo cáo dao động trong khoảng 16–64 $\mu\text{g/mL}$ (Zhang và cộng sự, 2016), trong khi các dịch chiết từ *Bacillus subtilis* thường dao động từ 32–128 $\mu\text{g/mL}$ đối với các loài *Vibrio* [82]. Như vậy, kết quả thu được đối với hai chủng BL và B2 là tương đồng với xu hướng chung đã được công bố.

Ngoài ra, nhiều hàng loạt báo cáo thực nghiệm mới đây xác nhận rằng những dịch chiết sơ cấp từ *Bacillus* spp., điển hình như các mẫu chiết sử dụng dung môi ethyl acetate, có thể duy trì hoạt tính kháng khuẩn đáng kể mà không cần tinh sạch hoàn toàn. Gao và cộng sự (2018) cùng với Li và cộng sự (2022) đã ghi nhận giá trị MIC dao động trong khoảng 32–256 $\mu\text{g/mL}$ đối với các loài *Vibrio*, phụ thuộc vào nguồn gốc chủng và mức độ tinh sạch của mẫu [85, 94]. So với các công bố này, hoạt tính của các cao chiết trong nghiên cứu hiện tại được đánh giá là tương đối mạnh, đặc biệt trong bối cảnh mẫu chưa qua phân lập hợp chất riêng lẻ.

Ngoài ra, hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết có thể là kết quả của sự tương tác hiệp đồng giữa nhiều hợp chất sinh học khác nhau, thay vì một thành phần đơn lẻ. Hiện tượng này đã từng được đề cập trong những khảo sát về các dòng vi sinh vật tổng hợp kháng sinh [92], qua đó làm sáng tỏ nguyên nhân dẫn đến hoạt lực mạnh mẽ của dịch chiết trong khảo sát hiện tại.

Các nghiên cứu trong nước về vi khuẩn bản địa trong hệ sinh thái nuôi tôm cũng ghi nhận khả năng ức chế *Vibrio* với giá trị MIC dao động trong

khoảng 32–128 $\mu\text{g/mL}$, tương đồng với kết quả thu được. Điều này cho thấy các chủng vi khuẩn bản địa là nguồn tài nguyên tiềm năng cho việc phát triển các tác nhân sinh học thay thế kháng sinh.

Nhìn chung, các cao chiết từ hai chủng vi khuẩn nghiên cứu, đặc biệt là chủng BL, thể hiện hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* ở mức cao và ổn định. Việc chiết tách, giám định thành phần hoạt chất và thương mại hóa các dòng sản phẩm sinh học nhằm ngăn ngừa dịch bệnh do *Vibrio* trong ngành thủy sản sẽ tìm thấy nền tảng tri thức then chốt từ những dữ liệu thực nghiệm này.

3.3.2. Độ bền nhiệt và độ ổn định pH

Độ bền nhiệt của các cao chiết từ hai chủng *Bacillus licheniformis* BL và *Bacillus subtilis* B2 được đánh giá thông qua xử lý mẫu ở các mức nhiệt độ khác nhau (40, 60, 80, 100 và 121°C), sau đó xác định lại hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả được thể hiện trên Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* của các cao chiết từ hai chủng BL và B2

Nhiệt độ (°C)	Chủng BL (mm)	Chủng B2 (mm)
Đối chứng (không xử lý)	32 ± 0,4	25 ± 0,3
40	31 ± 0,5	24 ± 0,4
60	30 ± 0,6	23 ± 0,5
80	28 ± 0,7	21 ± 0,6
100	24 ± 0,8	18 ± 0,7
121	20 ± 0,9	15 ± 0,8

Kết quả Bảng 3.7 cho thấy các cao chiết từ hai chủng *Bacillus licheniformis* BL và *Bacillus subtilis* B2 có khả năng duy trì hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* trong điều kiện nhiệt độ biến đổi. Cụ thể, hoạt tính kháng khuẩn được bảo toàn tốt trong khoảng nhiệt độ từ 40–80°C. Khi xử lý ở nhiệt độ cao hơn (100 và 121°C), hoạt tính có xu hướng giảm, tuy nhiên vẫn còn duy trì ở mức nhất định. Điều này cho thấy các hợp chất kháng khuẩn có trong cao chiết có độ bền nhiệt tương đối cao.

Xu hướng này phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới về các hợp chất sinh học có nguồn gốc từ *Bacillus*, đặc biệt là nhóm lipopeptide, vốn được ghi

nhận có khả năng ổn định trong dải nhiệt độ rộng và chỉ bị suy giảm hoạt tính khi tiếp xúc với nhiệt độ cao trong thời gian dài [77, 78, 83]. Một số nghiên cứu cũng cho thấy các biosurfactant từ *Bacillus subtilis* vẫn duy trì hoạt tính sau xử lý ở 100°C và thậm chí sau tiệt trùng ở 121°C, mặc dù có sự suy giảm nhất định về cường độ hoạt tính. Điều này tương đồng với kết quả nghiên cứu của đề tài, cho thấy các hợp chất thu nhận có khả năng chịu nhiệt tốt và phù hợp với các điều kiện xử lý trong thực tế.

Tương tự, độ ổn định của các cao chiết theo pH được khảo sát trong khoảng pH từ 3 đến 11. Sau khi điều chỉnh pH và xử lý trong điều kiện thích hợp, các mẫu được trung hòa và tiến hành đánh giá lại hoạt tính kháng khuẩn. Kết quả Bảng 3.8 cho thấy, các dịch chiết duy trì hoạt tính tốt trong khoảng pH trung tính đến kiềm nhẹ (pH 5–9). Ở các giá trị pH cực đoan (pH 3 và pH 11), hoạt tính kháng khuẩn có xu hướng giảm, tuy nhiên vẫn còn khả năng ức chế vi khuẩn kiềm định. Kết quả này phù hợp với nhiều công bố trước đây, trong đó các lipopeptide từ *Bacillus* thường ổn định trong môi trường trung tính đến kiềm nhẹ, nhưng giảm hoạt tính trong điều kiện acid mạnh hoặc kiềm mạnh. Cơ chế của hiện tượng này có thể liên quan đến sự thay đổi trạng thái ion hóa và cấu trúc phân tử của hợp chất kháng khuẩn, dẫn đến giảm khả năng tương tác với màng tế bào vi khuẩn [92].

Ngoài ra, sự ổn định tương đối cao của các cao chiết trong điều kiện nhiệt độ và pH rộng cũng là đặc điểm điển hình của các hợp chất dạng lipopeptide, với cấu trúc vòng bền vững giúp hạn chế sự biến tính dưới tác động của các yếu tố môi trường. Điều này góp phần giải thích vì sao các cao chiết trong nghiên cứu vẫn duy trì được hoạt tính ở các điều kiện xử lý khắc nghiệt.

So sánh giữa hai chủng cho thấy cao chiết từ chủng BL có độ ổn định cao hơn so với B2, thể hiện qua mức độ suy giảm hoạt tính thấp hơn dưới các điều kiện xử lý khắc nghiệt. Điều này có thể liên quan đến sự khác biệt về thành phần và cấu trúc các hợp chất sinh học được sinh tổng hợp, trong đó *Bacillus licheniformis* thường được ghi nhận có khả năng tạo ra các lipopeptide bền vững hơn về mặt cấu trúc và hoạt tính sinh học.

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của các cao chiết từ hai chủng BL và B2

pH	Chủng BL (mm)	Chủng B2 (mm)
Đối chứng (pH 7)	32 ± 0,4	25 ± 0,3
3	22 ± 0,7	17 ± 0,6
5	29 ± 0,5	23 ± 0,4
7	32 ± 0,4	25 ± 0,3
9	30 ± 0,6	23 ± 0,5
11	21 ± 0,8	16 ± 0,7

3.3.3. Ảnh hưởng của enzyme

Để đánh giá ảnh hưởng của enzyme đến hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus*, các cao chiết được xử lý riêng rẽ với một số enzyme đặc hiệu trong điều kiện thích hợp, sau đó tiến hành xác định lại hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Sự thay đổi hoạt tính của các mẫu sau xử lý được so sánh với mẫu đối chứng không xử lý nhằm làm cơ sở đánh giá ảnh hưởng của từng loại enzyme. Kết quả được thể hiện trên Bảng 3.9.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của enzyme đến hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của các dịch chiết từ hai chủng BL và B2

Enzyme xử lý	Chủng BL (mm)	Chủng B2 (mm)
Đối chứng (không xử lý)	32 ± 0,4	25 ± 0,3
Proteinase K	12 ± 0,6	10 ± 0,5
Trypsin	14 ± 0,5	11 ± 0,6
Pepsin	13 ± 0,7	10 ± 0,6
Amylase	31 ± 0,5	24 ± 0,4
Lipase	30 ± 0,6	24 ± 0,5

Kết quả cho thấy hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* của các dịch chiết giảm mạnh sau khi xử lý với các enzyme protease (proteinase K, trypsin và pepsin), trong khi hầu như không thay đổi khi xử lý với amylase và lipase. Điều này cho thấy thành phần chính chịu trách nhiệm cho hoạt tính kháng khuẩn có bản chất protein hoặc peptide. Xu hướng này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây, trong đó các bacteriocin và peptide kháng khuẩn có

nguồn gốc từ *Bacillus* thường nhạy cảm với protease nhưng ổn định trước các enzyme phân giải polysaccharide và lipid [91, 92].

Khi kết hợp với các kết quả về độ bền nhiệt và độ ổn định pH, có thể nhận thấy các cao chiết trong nghiên cứu này duy trì hoạt tính tốt trong khoảng nhiệt độ 40–80°C và pH 5–9, đồng thời vẫn còn hoạt tính nhất định ở các điều kiện khắc nghiệt hơn. Đặc điểm này là điển hình của các hợp chất dạng peptide vòng hoặc lipopeptide có nguồn gốc từ *Bacillus*, vốn có cấu trúc bền vững giúp hạn chế sự biến tính dưới tác động của nhiệt độ và pH [77, 78, 95].

Bên cạnh đó, giá trị MIC tương đối thấp (32 µg/mL đối với BL và 64 µg/mL đối với B2) cho thấy các cao chiết có hiệu lực kháng khuẩn mạnh, tương đương với nhiều báo cáo về các peptide kháng khuẩn và lipopeptide từ *Bacillus* spp. [82, 84]. Sự tương quan giữa MIC thấp, vòng vô khuẩn lớn và khả năng duy trì hoạt tính trong các điều kiện xử lý khác nhau càng củng cố giả thiết rằng các hợp chất kháng khuẩn trong cao chiết có bản chất sinh học đặc trưng và hoạt tính ổn định.

Tổng hợp các kết quả nghiên cứu về: sự nhạy cảm với protease, độ bền nhiệt và pH tương đối cao, và hiệu lực kháng khuẩn mạnh (thể hiện qua giá trị MIC), có thể suy luận rằng các hợp chất kháng khuẩn trong cao chiết từ hai chủng vi khuẩn nghiên cứu nhiều khả năng thuộc nhóm peptide kháng khuẩn hoặc lipopeptide. Tuy nhiên, để xác định chính xác cấu trúc và bản chất hóa học của các hợp chất này, cần có các nghiên cứu tiếp theo như phân lập, tinh sạch và phân tích cấu trúc bằng các phương pháp hiện đại.

Kết quả này không chỉ góp phần làm rõ bản chất của các hoạt chất sinh học mà còn cung cấp cơ sở khoa học quan trọng cho việc định hướng phát triển các chế phẩm sinh học có nguồn gốc vi khuẩn trong kiểm soát bệnh do *Vibrio* trong nuôi trồng thủy sản.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

- Đã phân lập được 28 chủng vi khuẩn từ các mẫu nước, bùn và tôm tại các ao nuôi tôm thẻ chân trắng. Hai chủng BL và B2 thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh nhất đối với *Vibrio parahaemolyticus* với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt đạt $30 \pm 0,16$ mm và $24 \pm 0,21$ mm. Kết quả định danh cho thấy hai chủng được xác định là *Bacillus licheniformis* BL và *Bacillus subtilis* B2
- Dịch chiết bằng ethyl acetate cho hoạt tính kháng khuẩn cao nhất với giá trị vòng vô khuẩn lần lượt đạt $32 \pm 0,4$ mm và $25 \pm 0,3$ mm.
- Hoạt chất thu được có nhiều đặc điểm tương đồng với nhóm tetracycline, đặc biệt là oxytetracycline, tuy nhiên cần có các nghiên cứu chuyên sâu hơn để xác định chính xác cấu trúc hóa học.
- Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng *Bacillus* bản địa có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm thẻ chân trắng.

Kiến nghị:

- Tiếp tục xác định thành phần hóa học có trong dịch chiết bằng ethyl acetate của chủng *B. subtilis* B2. Đồng thời xác định hàm lượng của các hoạt chất có trong 1 L dịch nuôi cấy.
- Nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy và lên men để tăng hiệu suất của các dịch chiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Kim D. Y., Shinde S. K., Kadam A. A., Saratale R. G., Saratale G. D., Kumar M., et al. , “Advantage of species diversification to facilitate sustainable development of aquaculture sector,” *Retracted article*, pp. *Biology* 11, 368, 2022.
- [2] Boyd, C. E., McNevin, A. A., Racine, P., Tinh, H. Q., Minh, H. N., Viriyatum, R., ... & Engle, C., “Resource use assessment of shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon*, production in Thailand and Vietnam,” *Journal of the World Aquaculture Society*, pp. 48(2), 201-226., 2017.
- [3] Boyd, Claude E., Robert P. Davis, and Aaron A. McNevin, ““Comparison of resource use for farmed shrimp in Ecuador, India, Indonesia, Thailand, and Vietnam.”,” *Aquaculture, Fish and Fisheries* , pp. 1.1 (2021): 3-15, 2021.
- [4] (FAO)., Food and Agriculture Organization of the United Nations, *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*, Rome, 2022.
- [5] (VATEP), Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam, Báo cáo xuất khẩu thủy sản Việt Nam năm 2024 và Triển vọng 2025, 2024.
- [6] Cục Thủy sản, Báo cáo tổng kết công tác năm 2024 và triển khai kế hoạch năm 2025, 2025.
- [7] Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. , “*Vibrio* spp. infections,” *Nature reviews Disease primers*, pp. 4(1), 1-19, 2018.
- [8] Letchumanan, V., Chan, K. G., & Lee, L. H., “*Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques,” *Frontiers in microbiology*, pp. 5, 705, 2014.
- [9] Su, Y. C., & Liu, C., “*Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety,” *Food microbiology*, pp. 24(6), 549-558., 2007.
- [10] De Schryver, P., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. , “Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming?,” *PLoS pathogens*, pp. 10(4), e1003919., 2014.

- [11] Lai, H.C., Ng, T.H., Ando, M., Lee, C.T., Chen, I.T., Chuang, J.C., Mavichak, R., Chang, S.H., Yeh, M.D., Chiang, Y.A., Takeyama, H., Hamaguchi, H., Lo, C.F., Aoki, T. & Wang, H.C. , “Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp,” *Fish Shellfish Immunol*, p. 47: 1006–1014, 2015.
- [12] Shinn, A. P., Pratoomyot, J., Griffiths, D., Trong, T. Q., Vu, N. T., Jiravanichpaisal, P., & Briggs, M. , “Asian shrimp production and the economic costs of disease,” *Asian Fish*, pp. 31, 29-58, 2018.
- [13] A. Nimlamai, Association mapping of early mortality syndrome (EMS)-acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) tolerance in Pacific white shrimp, Thammasat : Nimlamai, A., 2025.
- [14] N. Chucherd, “The case study of EMS in Thailand,” *Asian Aquaculture*, pp. 14-19, 2013.
- [15] Kumar, R., Chang, C. C., Ng, T. H., Ding, J. Y., Tseng, T. C., Lo, C. F., & Wang, H. C., “Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M1-1, which causes acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in Vietnam,” *Genome Announcements*, pp. 6(3), 10-1128, 2018.
- [16] Dabu, I. M., Lim, J. J., Arabit, P. M. T., Orense, S. J. A. B., Tabardillo Jr, J. A., Corre Jr, V. L., & Maningas, M. B. B., “The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines,” *Aquaculture research*, pp. 48(3), 792-799, 2017.
- [17] Han, J. E., Lee, S. C., Park, S. C., Jeon, H. J., Kim, K. Y., Lee, Y. S., ... & Choi, S. K. , “Molecular detection of Enterocytozoon hepatopenaei and *Vibrio parahaemolyticus*-associated acute hepatopancreatic necrosis disease in Southeast Asian *Penaeus vannamei* shrimp imported into Korea,” *Aquaculture*, pp. 517, 734812, 2020.
- [18] OIE, “Immediate notifications, Acute hepatopancreatic necrosis disease,” OIE, Paris, 2020.
- [19] Dong, X., Chen, J., Song, J., Wang, H., Wang, W., Ren, Y., ... & Huang, J. , “Evidence of the horizontal transfer of pVA1-type plasmid from AHPND-

- causing *V. campbellii* to non-AHPND *V. owensii*,” *Aquaculture*, pp. 503, 396-402, 2019.
- [20] Dang, T. L., A. T. Pham, and T. V. Phan, “Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Vietnam,” *The Journal of Asian Fisheries Society*, pp. 274-82, 2018.
- [21] Bộ Nông nghiệp và Môi trường; Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II, “Sự hiện diện của bệnh đốm trắng, hoại tử gan tụy cấp và vi bào tử trùng trên tôm giống và tôm nuôi thương phẩm tại một số tỉnh khu vực ĐBSCL từ năm 2022-2024.,” Bộ Nông nghiệp và Môi trường, 2025.
- [22] Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L., “Performance of single and multi-strain probiotics during hatchery production of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*,” *Aquaculture*, pp. 354, 56-63, 2012.
- [23] Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W., “Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture,” *Microbiology and molecular biology reviews*, pp. 64(4), 655-671, 2000.
- [24] Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T. Ø., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M., “Prebiotics in aquaculture: a review,” *Aquaculture nutrition*, pp. 16(2), 117-136, 2010.
- [25] De Schryver, P., & Vadstein, O., “Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture,” *The ISME journal*, pp. 8(12), 2360-2368, 2014.
- [26] Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., & Gálvez, A. , “Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*,” *FEMS microbiology reviews*, pp. 35(1), 201-232., 2011.
- [27] Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P., “Bacteriocins: developing innate immunity for food,” *Nature Reviews Microbiology*, pp. 3(10), 777-788, 2005.
- [28] Chikindas, M. L., García-Garcerá, M. J., Driessen, A. J., Ledebøer, A. M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., ... & Venema, G., “Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1. 0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic

- membrane of target cells,” *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 59(11), 3577-3584, 1993.
- [29] Franz, C. M., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Gálvez, A., “Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme,” *FEMS microbiology reviews*, pp. 31(3), 293-310, 2007.
- [30] Hussein, Z., Landt, O., Wirths, B., & Wellinghausen, N. , “Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods,” *International Journal of Medical Microbiology*, pp. 299(4), 281-290, 2009.
- [31] T. Stein, “Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions,” *Molecular microbiology*, pp. 56(4), 845-857, 2005.
- [32] Hancock, R. E., & Sahl, H. G., “Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies,” *Nature biotechnology*, pp. 24(12), 1551-1557, 2006.
- [33] Li, X., Ren, Q., Sun, Z., Wu, Y., & Pan, H, “Resuscitation promotion factor: a pronounced bacterial cytokine in propelling bacterial resuscitation,” *Microorganisms*, pp. 12(8), 1528., 2024.
- [34] Ongena, M., & Jacques, P. , “Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol,” *Trends in microbiology*, pp. 16(3), 115-125, 2008.
- [35] Grangemard, I., Bonmatin, J. M., Bernillon, J., Das, B. C., & PEYPOUX, F., “Lichenysins G, a novel family of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus licheniformis* IM 1307: production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry,” *The Journal of antibiotics*, pp. 52(4), 363-373, 1999.
- [36] Kong, H. G., Kim, J. C., Choi, G. J., Lee, K. Y., Kim, H. J., Hwang, E. C., ... & Lee, S. W., “Production of surfactin and iturin by *Bacillus licheniformis* N1 responsible for plant disease control activity,” *The Plant Pathology Journal*, pp. 26(2), 170-177, 2010.
- [37] Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E., “Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles,” *Applied microbiology and biotechnology*, pp. 86(5), 1323-1336, 2010.

- [38] Sekhon Randhawa, K. K., & Rahman, P. K., “Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market,” *Frontiers in microbiology*, pp. 5, 106124, 2014.
- [39] Süssmuth, R. D., & Mainz, A., “Nonribosomal peptide synthesis—principles and prospects,” *Angewandte Chemie International Edition*, pp. 56(14), 3770-3821, 2017.
- [40] Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F., “The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection,” *Trends in molecular medicine*, pp. 10(12), 599-606, 2004.
- [41] Miethke, M., & Marahiel, M. A. , “Siderophore-based iron acquisition and pathogen control,” *Microbiology and molecular biology reviews*, pp. 71(3), 413-451, 2007.
- [42] Mast, Y., & Stegmann, E, “Actinomycetes: The antibiotics producers,” *Antibiotics*, pp. 8(3), 105, 2019.
- [43] Defoirdt, T., Sorgeloos, P., & Bossier, P, “Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture,” *Current opinion in microbiology*, pp. 14(3), 251-258, 2011.
- [44] Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H, “Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health,” *Environmental microbiology*, pp. 15(7), 1917-1942, 2013.
- [45] Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P, “Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work,” *The ISME journal*, pp. 2(1), 19-26, 2008.
- [46] Natrah, F. M. I., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., & Bossier, P, “Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture,” *Marine Biotechnology*, pp. 13(2), 109-126, 2011.
- [47] Jiang, N., Hong, B., Luo, K., Li, Y., Fu, H., & Wang, J, “Isolation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* with anti-*Vibrio parahaemolyticus* Activity and

- Identification of the anti-*Vibrio parahaemolyticus* Substance,” *Microorganisms*, pp. 11(7), 1667, 2023.
- [48] Nguyen Thi Kim Cuc, Pham Viet Cuong , “Screening, identification and bioactive properties of *Bacillus spp.* isolated from shrimp ponds of Quang Tri province,” *Vietnam Journal of Science and Technology*, pp. 53(4), 397-406, 2015.
- [49] Pham Thi Tuyet Ngan, Vu Hung Hai, Vu Ngoc Ut, Huynh Truong Giang, “Chọn lọc vi khuẩn *Bacillus sp.* từ ao nuôi tôm quảng canh có khả năng phân hủy hữu cơ và kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ,” *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, pp. 57(3), 191-199, 2011.
- [50] Truong, Q. P., Phan, T. C., Vu, H. H., Pham, T. T., Huynh, T. G., & Vu, N. U, “Isolation of potential probiotic *Bacillus subtilis* CM3. 1 and its effects on the water quality and growth performance of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in the Mekong Delta, Vietnam,” *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, pp. 14(6), 3347-3357, 2021.
- [51] Hồng Mộng Huyền , Nguyễn Thị Phương , Nguyễn Hữu Dự , Hồng Phúc Nguơn , Nguyễn Thị Trúc Linh , Trần Thị Tuyết Hoa, “Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus sp.* Phân lập từ ao nuôi tôm quảng canh ở kiên giang,” *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, pp. 23(11), 1445-1454, 2025.
- [52] Thi Cam Tu Phan , Thi Thu Nguyen , Thi Kim Lien Nguyen , Truong Giang Huynh , Thi Thanh Hien Tran, “Isolation of *Lactobacillus plantarum* CMT1 from shrimp intestine and its effects on growth and survival of the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*,” *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, pp. 76(2), 215-222, 2024.
- [53] Lương Đức Phẩm , Công nghệ vi sinh, Nhà xuất bản Nông nghiệp, 2004.
- [54] Noordiana, N., Fatimah, A. B., & Mun, A. S., “Antibacterial agents produced by lactic acid bacteria isolated from Threadfin Salmon and Grass Shrimp,” *International Food Research Journal*, p. 20(1), 2013.

- [55] Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Thị Yến Ly, Huỳnh Xuân Phong , “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn,” *Tạp Chí Khoa Học Đại Học Cần Thơ*, pp. (19a), 176-184, 2011.
- [56] O. Kandler, “Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901,” *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 2, 1063-1065, 1986.
- [57] Cung Thị Ngọc Mai, Nghiên cứu khả năng phân hủy hợp chất vòng thơm của các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học phân lập tại một số địa điểm ô nhiễm dầu ở Việt Nam, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Viện Công nghệ sinh học, VAST, 2017.
- [58] Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H, “Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction,” *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* , pp. 51 (1): 263-273, 1986.
- [59] Williams, A. G., & Orpin, C. G. , “Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates,” *Canadian journal of microbiology*, pp. 33(5), 418-426, 1987.
- [60] O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R, “Biofilm formation as microbial development,” *Annual Reviews in Microbiology*, pp. 54(1), 49-79, 2000.
- [61] Tan, C. W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Abdul-Mutalib, N. A., Jambari, N. N., Hara, H., ... & Radu, S. , “Isolation and characterization of six *Vibrio parahaemolyticus* lytic bacteriophages from seafood samples,” *Frontiers in Microbiology*, pp. 12, 616548, 2021.
- [62] Kumar D.S., Harani A., Divya N., Bhavani B., Kumar K.A., Hansika K., ... & Sekar P, “Advancing Green Chemistry: Eco-Conscious FTIR Method for Rapid Estimation of Vildagliptin in Pharmaceuticals,” *Journal of Chemistry*, pp. 2026(1), 9942666, 2026.
- [63] Epp, J, “X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization,” *In Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods*, pp. (pp. 81-124). Woodhead Publishing, 2016.
- [64] Alanazi S, “Recent advances in liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) applications in biological and applied sciences,,” *Analytical Science Advances*, pp. 6(1), e70024., 2025.

- [65] Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., & Eumkeb, G, “Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*,” *LWT-Food Science and Technology*, pp. 39(10), 1214-1220, 2006.
- [66] Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., & Piyatiratitivorakul, S, “Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*,” *Aquaculture Research*, pp. 39(2), 134-143, 2008.
- [67] Balcázar, J. L., & Rojas-Luna, T., “ Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*),” *Current microbiology*, pp. 55(5), 409-412, 2007.
- [68] Mahdhi, A., Harbi, B., Esteban, M. Á., Chaieb, K., Kamoun, F., & Bakhrouf, A, “Using mixture design to construct consortia of potential probiotic *Bacillus* strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*,” *Biocontrol science and technology*, pp. 20(9), 983-996, 2010.
- [69] Lv, R., Li, B., Xiao, Y., Zhang, J., Mai, Y., Hu, X., & Chen, J, “Isolation and characterization of a lipopeptide-producing *Bacillus* sp. strain JK08 with antagonistic activity against *Vibrio parahaemolyticus*,” *Journal of Applied Microbiology*, pp. 134(4), lxad084, 2023.
- [70] Bentzon-Tilia, M., Sonnenschein, E. C., & Gram, L, “Monitoring and managing microbes in aquaculture—Towards a sustainable industry,” *Microbial biotechnology*, pp. 9(5), 576-584, 2016.
- [71] Chen, X., Chen, X., Zhao, Y., Zhou, H., Xiong, X., & Wu, C, “ Effects of microplastic biofilms on nutrient cycling in simulated freshwater systems,” *Science of the Total Environment*, pp. 719, 137276, 2020.
- [72] Li, Y., Dong, R., Ma, L., Qian, Y., & Liu, Z, “Combined anti-biofilm enzymes strengthen the eradicate effect of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm: Mechanism on *cpsA-J* expression and application on different carriers,” *Foods*, pp. 11(9), 1305, 2022.
- [73] Alagarasu, T., Baboonsundaram, A., Ayyaru, G., & Ramasamy, S. S. L, “Influence of oral administration of *Bacillus subtilis* on growth performance and

- physiological responses in *Litopenaeus vannamei* cultured in low saline waters,” *Probiotics and antimicrobial proteins*, pp. 13(6), 1734-1746, 2021.
- [74] Monier, M. N., Kabary, H., Elfeky, A., Saadony, S., El-Hamed, N. N. A., Eissa, M. E., & Eissa, E. S. H, “The effects of *Bacillus* species probiotics (*Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*) on the water quality, immune responses, and resistance of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Fusarium solani* infection,” *Aquaculture International*, pp. 31(6), 3437-3455, 2023.
- [75] L. Monzón-Atienza, Study of the Properties and Mechanism of Action of "Bacillus velezensis" D-18 for Establishment as a Probiotic Bacterium in Aquaculture, 2024.
- [76] Nguyễn Thị Thu Hằng, “Các liệu pháp phòng, trị bệnh mới trong nuôi trồng thủy sản,” *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, p. 61(1), 2025.
- [77] Ongena, M., Henry, G., & Thonart, P, “The roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*,” *In Recent developments in management of plant diseases*, pp. (pp. 59-69). Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.
- [78] P. Jacques, “Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp,” *In Biosurfactants: from genes to applications*, pp. (pp. 57-91). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- [79] Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., & Borriss, R, “More than anticipated—production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42,” *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, pp. 16(1-2), 14-24, 2009.
- [80] Kuebutornye, F. K., Abarike, E. D., & Lu, Y, “A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture,” *Fish & shellfish immunology*, pp. 87, 820-828, 2019.
- [81] Wang, D., Li, J., Zhu, G., Zhao, K., Jiang, W., Li, H., ... & Tian, X, “Mechanism of the Potential therapeutic candidate *Bacillus subtilis* BSXE-1601 against shrimp pathogenic vibrios and multifunctional metabolites biosynthetic capability of the strain as predicted by genome analysis,” *Frontiers in Microbiology*, pp. 11, 581802, 2020.

- [82] Chen, Y. A., Chiu, W. C., Wang, T. Y., Wong, H. C., & Tang, C. T., “Isolation and characterization of an antimicrobial *Bacillus subtilis* strain O-741 against *Vibrio parahaemolyticus*” *Plos one*, pp. 19(4), e0299015, 2024.
- [83] Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., ... & Jin, M, “Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*,” *Applied microbiology and biotechnology*, pp. 101(15), 5951-5960, 2017.
- [84] Zhang, M., Pan, L., Su, C., Liu, L., & Dou, L, “Simultaneous aerobic removal of phosphorus and nitrogen by a novel salt-tolerant phosphate-accumulating organism and the application potential in treatment of domestic sewage and aquaculture sewage,” *Science of the Total Environment*, pp. 758, 143580, 2021.
- [85] Gao, B., Shang, X., Li, L., Di, W., & Zeng, R, “Phylogenetically diverse, acetaldehyde-degrading bacterial community in the deep sea water of the West Pacific Ocean,” *Acta Oceanologica Sinica*, pp. 37(8), 54-64, 2018.
- [86] Nguyen, C. T. K., Pham, T. V., Nguyen, O. V. K., Dinh, H. T., Le, H. H., & Nguyen, H. D, “In vitro probiotic properties and anti-*Vibrio* activity of *Bacillus subtilis* B13 and its ethyl acetate extract,” *Antonie van Leeuwenhoek*, pp. 119(2), 44, 2026.
- [87] Beganovic, S., Rückert-Reed, C., Sucipto, H., Shu, W., Gläser, L., Patschkowski, T., ... & Wittmann, C, “Systems biology of industrial oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus*: the secrets of a mutagenized hyperproducer,” *Microbial cell factories*, pp. 22(1), 222, 2023.
- [88] Pšeničnik, A., Slemc, L., Avbelj, M., Tome, M., Šala, M., Herron, P., ... & Petković, H, “Oxytetracycline hyper-production through targeted genome reduction of *Streptomyces rimosus*,” *Msystems*, pp. 9(5), e00250-24, 2024.
- [89] Zhou, Z., Xiang, L., Wang, X., Jiang, G., Cheng, J., Cao, X., ... & Shen, H, “An in-depth study of the growth inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by Surfactin and its effects on cell membranes, ROS levels and gene transcription,” *Journal of Invertebrate Pathology*, pp. 211, 108298, 2025.
- [90] Xiang, L., Zhou, Z., Wen, M., Jiang, G., Cheng, J., Hu, Y., ... & Shen, H, “Study on the effects and mechanisms of the antagonistic bacterium *Bacillus subtilis*





- JSHY-K3 against *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp *Penaeus vannamei*,” *Aquaculture Reports*, pp. 37, 102254, 2024.
- [91] Cotter P. D., Hill C., Ross R. P., “Bacteriocins: Developing innate immunity for food,” *Nat. Rev. Microbiol.*, p. 777–788. 10.1038/nrmicro1273, 2005.
- [92] Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., & Gálvez, A, “Diversity and applications of Bacillus bacteriocins,” *FEMS microbiology reviews*, pp. 35(1), 201-232, 2011.
- [93] Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K, “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review,” *Journal of pharmaceutical analysis*, pp. 6(2), 71-79, 2016.


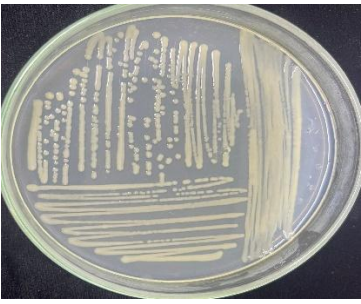


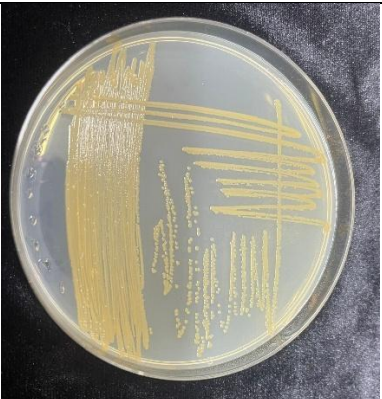
PHỤ LỤC





Bảng: Danh mục máy móc và thiết bị được sử dụng:


Tên thiết bị	Hãng/nước sản xuất	Mục đích sử dụng
Cân kỹ thuật BJ 610C	Precisa, Thụy Sĩ	Đề cân vật liệu, hóa chất
Kính hiển vi điện tử quét S-4800	Hitachi, Nhật Bản	Quan sát hình thái tế bào vi khuẩn
Lò vi sóng NN-S215WF	Panasonic, Trung Quốc	Đun nóng môi trường nuôi cấy
Máy chuẩn pH-CyberScan pH 620	Eutech, Singapore	Đo pH khi pha môi trường
Máy đo quang phổ UV-1601-220V	Shimadzu, Nhật Bản	Đo mật độ quang của sinh khối vi khuẩn
Máy ly tâm eppendorf 5417R	Eppendorf, Đức	Ly tâm dịch nuôi với các thể tích nhỏ
Máy vortex BR-2000	Biorad, Mỹ	Trộn sinh khối vi khuẩn cho đồng nhất
Nồi hấp tiệt trùng MC – 30L	Alp, Nhật Bản	Khử trùng môi trường, vật liệu, dụng cụ thí nghiệm
Tủ ấm và tủ lắc nuôi cấy NB205QF	N – Biotek, Hàn Quốc	Nuôi vi khuẩn
Tủ cấy vô trùng AVC-4A1	Esco, Singapore	Tiến hành các bước thí nghiệm về vi khuẩn để đảm bảo tính vô trùng
Tủ lạnh sâu -80°C MDF-192	Sanyo, Nhật Bản	Bảo quản giống vi khuẩn
Tủ lạnh SJ-169S-DS	Sharp, Thái Lan	Cất mẫu tạm thời
Tủ sấy dụng cụ JSOF - 100	Jsr, Hàn Quốc	Sấy và khử trùng khô dụng cụ thí nghiệm

Bảng: Hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn và nấm men phân lập từ mẫu tôm bệnh, tôm khoẻ, mẫu nước và bùn lấy mẫu tại ao nuôi tôm thẻ chân trắng

TT	Kí hiệu chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình ảnh khuẩn lạc
1	GT1	Trắng đục, tròn lồi, bề mặt bóng, mép gọn, d=2 mm	
2	GT2	Trắng đục, tròn, hơi dẹt, bề mặt bóng, mép gọn, d=2-3 mm	
3	GT3	Trắng trong, tròn lồi, bề mặt bóng ướt, mép gọn, d=2-3 mm	
4	GT5	Trắng đục, tròn, hơi dẹt, bề mặt khô, mép gọn, d=3 mm	

5	LacTo	Trắng đục, tròn, hơi lồi, bề mặt khô, mép gọn, d=2-3 mm	
6	VT216	Màu vàng chanh nhạt, bề mặt lõm, viền ngoài cao gồ lên so với phần khuẩn lạc phía trong, d=2 mm	
7	VT211	Vàng nhạt, bề mặt lồi, nhẵn, bóng có nhân màu vàng nhạt, d=2-3mm	
8	VT223	Trắng đục, bề mặt trong, tạo viền ngoài, d=2-3mm	
9	TH1	Vàng cam, tròn lồi, bóng ướt, mép gọn, d=1 mm	

10	MD1.3	Trắng ngà, tròn lồi, bề mặt nhẵn, d=1-2 mm	
11	Tubo 2	Xanh nhạt, tròn lồi, bề mặt bóng, mép gọn, d=2-3mm	
12	MD2.3	Trắng đục, tròn lồi, 2 vòng đồng tâm, mép gọn, d=2-3mm	
13	MD2.2	Trắng ngà, bề mặt nhẵn, không nhân, mép gọn, d=2-3mm	

14	MD1.1	Trắng ngà, tròn chóp lồi, khuẩn lạc khô, mép gọn, d=2-3mm	 A petri dish containing a bacterial culture. The culture is white, circular, and has a raised, convex center. It is spread across the surface of the agar in a streaked pattern. The edges are well-defined and slightly raised.
----	-------	---	---

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

EVALUATION OF RESISTANT *Vibrio parahaemolyticus* ACTIVITY AND EXTRACELLULAR ENZYME, BACTERIOCIN PRODUCTION OF A BACTERIAL STRAIN ISOLATED FROM DISEASED SHRIMP SAMPLES COLLECTED FROM SHRIMP POND IN VIETNAM

Tran Thi Mai^{1,2}, Cung Thi Ngoc Mai¹, Do Thi Lien¹, Vuong Thi Nga¹,
Quach Thi Lien¹, Le Thi Nhi Cong^{1,2,*}

¹*Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet, Nghia Do, Ha Noi*

²*Graduate University of Science and Technology, VAST,
18 Hoang Quoc Viet, Nghia Do, Ha Noi*

*E-mail: lenhicon@gmail.com or lenhicon@ib.ac.vn

Abstract. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), also known as early mortality syndrome (EMS), is one of the diseases that cause economic losses in the aquaculture industry. Therefore, the development of products to prevent and combat AHPND is necessary. This study was conducted to determine the anti-*V. parahaemolyticus* ability and biological activity of bacterial strain B2 isolated from diseased shrimp sample. The results showed that strain B2 had strong antibacterial activity with an inhibition zone diameter of 18.9 mm, exceeding the threshold of 16 mm commonly used to evaluate high antibacterial levels. In addition, B2 could produce all three types of extracellular enzymes, in which lipase (20 ± 0.03 mm) and protease (14 ± 0.06 mm) activities were higher than amylase (3 ± 0.03 mm), contributing to the decomposition of lipids and proteins in food for shrimp. Notably, strain B2 also produced bacteriocin with an average inhibition zone of 21 mm against *V. parahaemolyticus*, demonstrating an important antibacterial mechanism. These findings confirm the potential application of strain B2 in the development of biological products to prevent *Vibrio* diseases and improve sustainable shrimp farming efficiency.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus* sp., Antibacterial activity, Extracellular enzymes, Bacteriocin, Probiotic.

I. INTRODUCTION

Aquaculture is one of the most highly traded food commodities worldwide, with distribution to over 230 countries and territories. Within this category, shrimp is currently the most valuable seafood commodity in global trade. According to the Food and Agriculture Organization (FAO), farmed shrimp production has demonstrated an annual growth rate of approximately 10%, which represents one of the highest growth rates within the aquaculture sector. Despite these remarkable achievements, the shrimp aquaculture industry continues to face significant challenges and infectious diseases, particularly Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) caused by *Vibrio parahaemolyticus*, a Gram-negative, rod-shaped bacterium widely distributed in marine and estuarine environments worldwide [1]. Unlike other *Vibrio* species, *V. parahaemolyticus* exhibits a broad tolerance to temperature, salinity and pH, which enables them to adapt and persist in most environments of shrimp ponds or lagoons. Consequently, once disease outbreaks occur, they tend to spread rapidly and are difficult to control [2]. They colonize the shrimp stomach and secrete the PirABvp toxins into the

hepatopancreas (the target organ), leading to the detachment and destruction of epithelial cells, which subsequently serve as a substrate for bacterial proliferation. Ultimately, this process results in dysfunction and destruction of the hepatopancreas.

Currently, to prevent and eliminate *V. parahaemolyticus*, approaches such as the application of chemical disinfections, antibiotics, and biotechnological methods have been implemented. However, the use of chemical disinfectants and antibiotics such as oxytetracycline, tetracycline, and quinolones may also eliminate beneficial bacterial communities in the environment [3-4]. More seriously, the improper use of antibiotics can exert selective pressure, leading to the spread of antimicrobial resistance genes and resulting in chemical residues in the final products, which adversely affect export activities [5]. Therefore, the application of beneficial microorganisms, particularly antagonistic *Bacillus* species, is considered an effective alternative strategy. Numerous studies on this group of antagonistic *Bacillus* also demonstrate that they are not only widely distributed in nature, including marine environments, but are also safe for use as probiotics [6-8]. Several *Bacillus* species possess the ability to inhibit pathogenic bacteria; therefore, *Bacillus* species are considered promising biocontrol candidates for managing bacterial infections [7]. Using antagonistic *Bacillus* sp. in aquaculture not only helps control pathogenic bacterial density but also enhances food safety without causing secondary environmental pollution. This study was conducted to determine the antagonistic activity against *V. parahaemolyticus* and the production of amylase, protease, lipase, and bacteriocin by three bacterial isolates from soil, water, and diseased shrimp samples collected from aquaculture ponds in Vietnam. This study aimed to evaluate the anti-*V. parahaemolyticus* activity and the production of amylase, protease, lipase, and bacteriocin.

II. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

In this study, the pathogenic bacterium *Vibrio parahaemolyticus* VT01 was used as the test strain to evaluate antagonistic capabilities. The VT01 was provided by Research Institute for Aquaculture No. 2, Ho Chi Minh city. The bacterial strain B2 was isolated and selected from diseased shrimp sample taken from aquaculture pond in Vietnam..

2.2. Methods

*2.2.1. Evaluation of Anti-*V. parahaemolyticus* Activity*

The antagonistic activity of bacterial strain B2 against *V. parahaemolyticus* was determined using the agar well diffusion method.

The *V. parahaemolyticus* strain responsible for AHPND was cultured on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar (Merck) for selective isolation and purity verification. Subsequently, it was transferred into nutrient broth (NB, Merck) containing 1.5% NaCl and incubated at 28 °C for 24 h. The resulting bacterial suspension was uniformly spread onto nutrient agar (NA) supplemented with 1.5% NaCl and held at 4 °C for 1h. Finally, wells of 6 mm diameter were punched into the agar surface to facilitate subsequent agar well diffusion assays.

The antagonistic bacterial strain was cultured in 5 mL of MPA medium supplemented with 1.5% NaCl at 28 °C for 24 h. Subsequently, 1 mL of the culture was transferred into an Eppendorf tube and centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4 °C. Then, 50 µL of the supernatant was loaded into each agar well, and the assay was performed in triplicate. The plates were incubated at 28 °C for 24 h.

The inhibitory activity was evaluated based on the inhibition zones surrounding the wells. Antibacterial efficacy was determined following the method of Ngo Thi Phuong Dung et al. (2011), in which antibacterial activity was classified into three levels: (+) with inhibition zones < 11 mm; (++) with inhibition zones between 11 and 16 mm; and (+++) indicating strong inhibition with inhibition zones > 16 mm. The inhibition zone diameter was calculated using the formula: $D - d$ (mm), where D represents the total diameter of the inhibition zone (mm) and d represents the diameter of the agar well (mm).

2.2.2. Evaluation of Enzymatic Activity (Amylase, Protease, Lipase)

The enzymatic activities (amylase, protease, and lipase) of strain B2 were determined using the agar well diffusion method. The activity of each enzyme was assessed on specific media supplemented with the corresponding substrate.

Amylase activity was assessed on starch agar plates supplemented with 1% of soluble starch as the substrate; protease activity was evaluated on agar plates containing 1% of casein; and lipase activity was tested on agar plates supplemented with 1% of Tween 80. Wells of 6 mm in diameter were punched into the agar plates. Strain B2 was cultured in 5 mL of MPA medium supplemented with 1.5% NaCl at 28 °C for 24 h. Subsequently, 1 mL of the culture was transferred into an Eppendorf tube and centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4 °C. Then, 50 µL of the cell-free supernatant was loaded into each well, and the assay was performed in triplicate. The plates were incubated at 28 °C for 24 h. After incubation, Lugol's iodine solution was added to the starch agar plates. Amylase-producing bacteria hydrolyzed starch, resulting in a clear zone around the colony after iodine staining. Protease-producing bacteria hydrolyzed casein or gelatin, leading to the formation of a clear halo. Lipase activity was indicated by the hydrolysis of lipids, forming a transparent zone around the colony. Enzyme activity was quantified by measuring the diameter of the clear zone according to the formula: $D - d$ (mm), where D is the total diameter of the hydrolysis zone (mm), and d is the diameter of the agar well (mm).

2.2.3. Evaluation of Bacteriocin Activity

The bacteriocin-producing activity of strain B2 was determined using the agar well diffusion method.

Vibrio parahaemolyticus was cultured in nutrient broth (NB, Merck) supplemented with 1.5% NaCl at 28 °C for 24 h. The bacterial suspension was then uniformly spread onto nutrient agar (NA) plates containing 1.5% NaCl and kept at 4 °C for 1 h. Finally, wells of 6 mm in diameter were punched into the agar surface for subsequent assays.

Strain B2 was cultured in 50 ml of marine peptone agar (MPA) medium supplemented with 1.5% NaCl at 28 °C for 24 h. The culture broth was transferred into Falcon tubes and centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4 °C to remove the biomass. The resulting cell-free

supernatant (CFS) was extracted with ethanol at a ratio of 1:1 (v/v). The mixture was stirred at room temperature for 2 h to allow antibacterial compounds to be transferred from the aqueous phase to the organic phase. After phase separation, the organic layer was concentrated using a refrigerated centrifuge and further evaporated under reduced pressure with a rotary evaporator at a temperature below 40 °C to remove the solvent, yielding a viscous extract. The crude extract was re-dissolved in methanol. Subsequently, 50 µl of the extract was loaded into each agar well, and the assay was performed in triplicate. The plates were incubated at 28 °C for 24 h. Antibacterial activity was evaluated by measuring the diameter of the inhibition zone surrounding the well, calculated as $D - d$ (mm), where D is the diameter of the inhibition zone (mm) and d is the well diameter (mm).

III. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Antibacterial activity of strain B2 against *V. parahaemolyticus*

To evaluate antibacterial activity, the cell-free supernatant (CFS) of strain B2 cultured for 24 h was tested against *V. parahaemolyticus*. The results demonstrated that B2 exhibited strong inhibitory activity against the pathogen (Fig. 1). The results shown in Figure 1 indicate that strain B2 exhibits strong antagonistic activity against *V. parahaemolyticus*, with an inhibition zone of 18.9 mm, corresponding to the (+++) category, exceeding the 16 mm threshold commonly used to indicate high antibacterial activity. These findings are consistent with the study by Mahdhi et al. (2010), in which *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* strains showed inhibition zones ranging from 12 to 20 mm against *V. parahaemolyticus* [8]. In addition, Hang et al. (2015) reported that several *B. subtilis* and *Bacillus* sp. strains isolated from the microbial communities in shrimp ponds exhibited inhibition zones up to 20 mm [9].

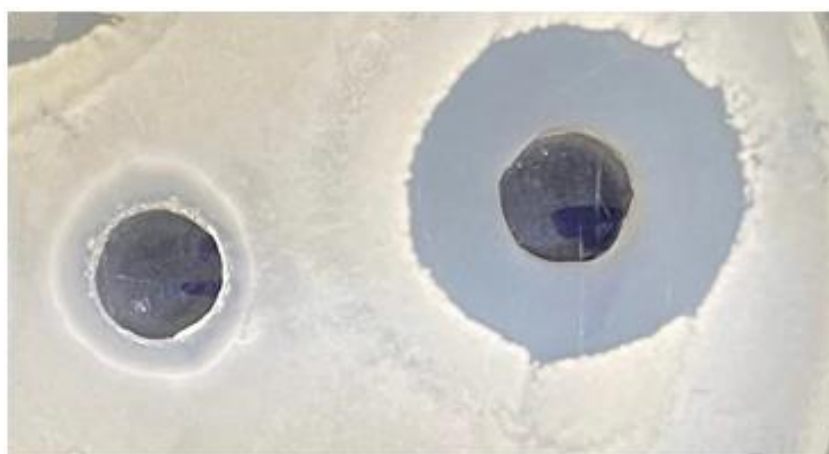


Fig. 1. Antibacterial activity of strain B2 against *Vibrio parahaemolyticus*.

Similarly, Lv, Ran, et al. (2023) isolated *Bacillus* sp. JK08 from shrimp ponds and reported an inhibition zone of 18.19 ± 0.16 mm against *Vibrio parahaemolyticus*, comparable to strain B2 in the present study [10]. In addition, the study by Thi, Quach Van Cao, et al. (2025) in the Mekong Delta also reported several *Bacillus* strains exhibiting inhibition zones ranging from 12 to 24 mm, with strain BLN7 reaching 24 mm [11]. These results suggest that strain B2 has potential for application as a probiotic for controlling *V. parahaemolyticus* in aquaculture.

3.2 Evaluation of Enzymatic Activity (Amylase, Protease, Lipase)

After evaluating antibacterial activity on agar plates, strain B2 demonstrated strong inhibition against *Vibrio parahaemolyticus*. The enzymatic activities of B2 were further assessed, showing that the strain produced all three extracellular enzymes (amylase, protease, and lipase). Among them, lipase (20 ± 0.03 mm) and protease (14 ± 0.06 mm) activities were significantly higher than that of amylase (3 ± 0.03 mm) (Table 2, Figure 2).

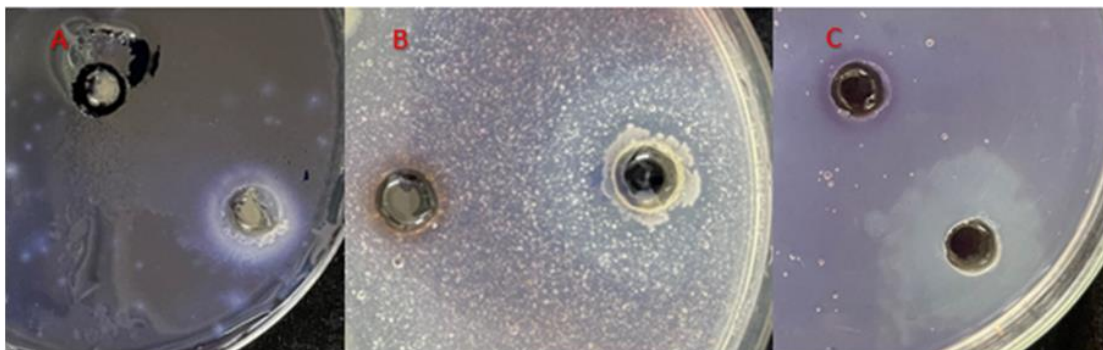


Fig. 2. Substrate hydrolysis activities of strain B2. (A: Amylase hydrolysis; B: Protease hydrolysis; C: Lipase hydrolysis).

Table 1. Extracellular enzymatic activities (amylase, protease, and lipase) of strain B2.

Strain name	Enzyme activity diameter (mm)		
	Amylase	Protease	Lipase
B2	$3 \pm 0,03$	$14 \pm 0,06$	$20 \pm 0,03$

The results of this study are consistent with those reported by Alagarasu et al. (2021), where supplementation of *Bacillus subtilis* in the diet significantly enhanced protease, lipase, and amylase activities in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), while also improving resistance against *Vibrio alginolyticus* [12]. Similarly, Monier et al. (2023) reported that probiotics containing *B. subtilis* and *B. licheniformis* not only improved water quality but also strongly stimulated digestive enzymes (protease, lipase, amylase), promoting better shrimp growth and reducing disease risk [13]. More recently, Monzón-Atienza et al. (2024) demonstrated that strains *B. subtilis* AJQ03 and AJQ05 simultaneously produced protease, amylase, and lipase with high hydrolysis indices, highlighting the important role of *Bacillus* strains in organic matter decomposition and supporting animal health [14]. These findings indicate that strain B2 has strong potential for protein and lipid degradation, which are major components of feed and residual organic matter in shrimp farming systems. Thus, strain B2 not only exhibits strong antibacterial activity against *V. parahaemolyticus* but also displays remarkable extracellular enzymatic activities, particularly protease and lipase, confirming its potential application in improving culture environment and promoting shrimp health.

3.3. Evaluation of Bacteriocin Activity

The bacteriocin activity of strain B2, assessed using the agar well diffusion method, showed that the culture extract of B2 produced a clear inhibition zone against *Vibrio parahaemolyticus*, with an average diameter of 21 mm.

These findings are consistent with those of Chen et al. (2024), who isolated *Bacillus subtilis* O-741 capable of producing amicoumacin A, which formed a substantial inhibition zone against *V. parahaemolyticus* and simultaneously improved the survival rate of *Artemia nauplii* in in vivo assays [15]. Similarly, Gao et al. (2024) reported that three *B. subtilis* strains (P8, P29, P30) isolated from shrimp culture systems exhibited strong antagonistic activity against *V. parahaemolyticus*, highlighting the potential role of *Bacillus* strains in the prevention of *Vibrio*-related diseases [16]. In addition, Pereira et al. (2022) emphasized that bacteriocins derived from *Bacillus* not only inhibit multiple *Vibrio* strains but also represent a safe alternative to antibiotics, contributing to sustainable aquaculture development [17]. Thus, with its ability to simultaneously produce extracellular enzymes and bacteriocins, strain B2 emerges as a promising candidate for probiotic development in shrimp aquaculture, contributing to the control of *V. parahaemolyticus* and enhancing sustainable farming performance.

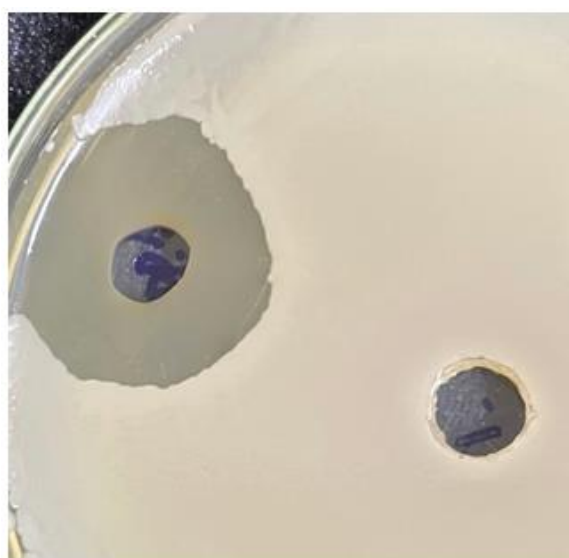


Fig. 3. Bacteriocin activity of strain B2 against *V. parahaemolyticus*.

IV. CONCLUSION

The study demonstrated that bacterial strain B2 possesses potent antagonistic activity against *V. parahaemolyticus*, while also secreting extracellular enzymes (protease, lipase, amylase) and a biologically active bacteriocin. These properties enable B2 to not only control pathogenic bacteria but also contribute to improving the culture environment and aiding host digestion. Therefore, strain B2 holds great potential for application in the development of safe and effective probiotics to prevent *Vibrio*-related diseases and promote sustainable aquaculture.

Acknowledgments. This research is funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development (now is Ministry of Agriculture and Environment) for the project “Creating nano-biological products - antibacterial substances derived from microorganisms to prevent acute hepatopancreatic necrosis and white feces caused by *Vibrio* in whiteleg shrimp” (Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học nano-chất kháng khuẩn có nguồn gốc từ vi sinh vật để phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính và phân trắng do *Vibrio* gây ra cho tôm thẻ chân trắng) and utilized equipment in the Environmental Biotechnology Lab, Institute of Biology, VAST.

REFERENCES

- [1] R. Elston, E. L. Elliot, R. R. Colwell, Conchiolin infection and surface coating *Vibrio*: shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*, *Journal of Fish Diseases*, **5**(4), 1982, pp. 265-284.
- [2] S. A. S. Rodriguez, B. G. Gil, R. L. Olvera, M. B. Lozano, M. S. M. Covarrubias, Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico, *Applied and Environmental Microbiology*, **81**(5), 2015, pp. 1689-1699.
- [3] M. C. L. Baticados, J. O. Paclibare, The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in the Philippines. In *Diseases in Asian Aquaculture I. Proceedings of the First Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 26-29 November 1990, Bali, Indonesia, 1990*, pp. 531-546. Asian Fisheries Society, Fish Health Section.
- [4] C. Kehrenberg, S. A. Salmon, J.-L. Watts, S. Schwarz, Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the tet (H) plasmid pMHT1, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48**(5), 2001, pp. 631-640.
- [5] C.-W. Bacon, D. M. Hinton, Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species, *Biological Control*, **23**(3), 2002, pp. 274-84.
- [6] X. F. Liu, Y. Li, J. R. Li, L. Y. Cai, X. X. Li, J. R. Chen, S. X. Lyu, Isolation and characterisation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31**(5), 2015, pp. 795-803.
- [7] F.-K.-A. Kuebutornye, E.-D. Abarike, Y. Lu, A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture, *Fish & Shellfish Immunology*, **87**, 2019, pp.820-828.
- [8] A. Mahdhi, F. Kamoun, A. Bakhrouf, Inhibitory activity and adhesive ability of potential probiotic *Bacillus* species to confer protection for *Artemia* gnotobiotic culture against pathogenic *Vibrio* spp., *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, **35**(4), 2011, pp. 227-233.
- [9] N. T. M. Hang, N -M. Thu, Isolation and selection of some lactic acid bacteria strains capable of producing amylase and bacteriocin, *Journal of Forestry Science and Technology*, **3**, 2013, pp. 03-10.
- [10] R. Lv, B. Li, Y. Xiao, J. Zhang, Y. Mai, X. Hu, J. Chen, Isolation and characterization of a lipopeptide-producing *Bacillus* sp. strain JK08 with antagonistic activity against *Vibrio parahaemolyticus*, *Journal of Applied Microbiology*, **134**(4), 2023, pp. 1xad084.
- [11] Q. V. C. Thi, N. Van Le, N. P. Thuy, T. Q. Tat, T. Tran, Antibacterial *Bacillus* strains from the Mekong Delta: Combating *Vibrio parahaemolyticus* in intensive white-leg shrimp aquaculture: <https://doi.org/10.12982/VIS.2025.077>, *Veterinary Integrative Sciences*, **23**(3), 2025, pp. 1-17.
- [12] T. Alagarasu, A. Baboonsundaram, G. Ayyaru, S. S. L. Ramasamy, Influence of oral administration of *Bacillus subtilis* on growth performance and physiological responses in *Litopenaeus vannamei* cultured in low saline waters, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **13**(6), 2021, pp. 1734-1746.
- [13] M. N. Monier, H. Kabary, A. Elfeky, S. Saadony, N. N. A. El-Hamed, M. E. Eissa, E. S. H. Eissa, The effects of *Bacillus* species probiotics (*Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*) on the water quality, immune responses, and resistance of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Fusarium solani* infection, *Aquaculture International*, **31**(6), 2023, pp. 3437-3455.
- [14] L. M. Atienza, J. Bravo, S. Torrecillas, D. Montero, A. F. G. D. Canales, I. G. de la Banda, F. Acosta, Isolation and characterization of a *Bacillus velezensis* D-18 strain, as a potential probiotic

The 9th Academic Conference on Natural Science for Young Scientists, Master and PhD. Students from ASEAN Countries, 28 September - 01 October 2025, Khanh Hoa, Vietnam

- in European seabass aquaculture, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **13**(5), 2021, pp. 1404-1412.
- [15] Y. A. Chen, W. C. Chiu, T. Y. Wang, H. C. Wong, C. T. Tang, Isolation and characterization of an antimicrobial *Bacillus subtilis* strain O-741 against *Vibrio parahaemolyticus*, *Plos One*, **19**(4), 2024, pp. e0299015.
- [16] Y. Gao, L. Qiang, N. Wu, R. Tan, Y. Sun, Z. Li, *et al.*, Study on the potential probiotics isolated from marine aquaculture system and evaluation for aquaculture application, *Aquaculture Research*, **1**, 2024, pp. 9555271.
- [17] W. A. Pereira, C. M. N. Mendonça, A. V. Urquiza, V. P. Marteinsson, J. G. LeBlanc, P. D. Cotter, *et al.*, Use of probiotic bacteria and bacteriocins as an alternative to antibiotics in aquaculture, *Microorganisms*, **10**(9), 2022, pp. 1705.



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

**HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP
TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
CHỨNG NHẬN**

Bài báo khoa học có tiêu đề “*Tách chiết và đánh giá hoạt tính kháng Vibrio parahaemolyticus của các hoạt chất sinh học từ chủng Bacillus licheniformis BL bản địa phân lập trong ao nuôi tôm*” (mã số #15307) của các tác giả Vương Thị Nga (Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), Trần Thị Mai (Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Học viện Khoa học và Công nghệ - VAST), Cung Thị Ngọc Mai, Đỗ Thị Liên, Quách Thị Liên (Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), Hoàng Thị Phương Hồng (Trường Cao đẳng Kinh tế, Kỹ thuật và Thủy sản), Lê Thị Nhi Công (Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Học viện Khoa học và Công nghệ - VAST) đã được Hội đồng biên tập Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên tổ chức phản biện khoa học và sẽ được đăng tải trong kế hoạch xuất bản năm 2026 (Chuyên san ***Khoa học Tự nhiên – Kỹ thuật – Công nghệ***).

Thái Nguyên, ngày 22 tháng 5 năm 2026

THƯ KÝ TÒA SOẠN

ThS. Hoàng Thị Hồng Hạnh

EXTRACTION AND EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE INDIGENOUS *BACILLUS LICHENIFORMIS* BL ISOLATED FROM SHRIMP POND

Vuong Thi Nga¹, Tran Thi Mai^{1,2}, Cung Thi Ngoc Mai¹, Do Thi Lien¹, Quach Thi Lien¹, Hoang Thi Phuong Hong³, Le Thi Nhi Cong^{1,2*}

¹Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, VAST

³College of Economics, Technology and Fisheries

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received:	This study aimed to isolate and evaluate the antibacterial potential of indigenous bacteria against <i>Vibrio parahaemolyticus</i> from white shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>) aquaculture pond in Cam Ranh (Khanh Hoa). Bacterial isolates were obtained from water and sediment samples, purified, and screened using the agar diffusion method. The selected strain was characterized for morphology and extracellular enzyme production, and its identity was confirmed by 16S rRNA gene sequencing. Bioactive compounds were extracted from cell-free supernatant using organic solvents and evaluated for antibacterial activity, minimum inhibitory concentration, and stability under different conditions. Strain BL exhibited strong inhibitory activity against <i>Vibrio parahaemolyticus</i> with an inhibition zone of 30 ± 0.2 mm. It was identified as <i>Bacillus licheniformis</i> with 100% sequence similarity, exhibiting diverse extracellular enzyme activities, including protease, cellulase, and lipase. The ethyl acetate extract demonstrated high antibacterial activity (32 ± 0.4 mm) and a low minimum inhibitory concentration (32 ± 2.5 µg/mL). The activity remained stable at 40–121 °C and pH 5–9, but decreased after protease treatment. These results highlight the potential of <i>Bacillus licheniformis</i> BL as a biocontrol agent in aquaculture.
Revised:	
Published:	
KEYWORDS	
<i>Bacillus licheniformis</i>	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
Antibacterial activity	
Ethylacetate extract	
Aquaculture	

TÁCH CHIẾT VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* CỦA CÁC HOẠT CHẤT SINH HỌC TỪ CHỦNG *BACILLUS LICHENIFORMIS* BL BẢN ĐỊA PHÂN LẬP TRONG AO NUÔI TÔM

Vương Thị Nga¹, Trần Thị Mai^{1,2}, Cung Thị Ngọc Mai¹, Đỗ Thị Liên¹, Quách Thị Liên¹, Hoàng Thị Phương Hồng³, Lê Thị Nhi Công^{1,2*}

¹Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST

³Trường Cao đẳng Kinh tế, Kỹ thuật và Thủy sản

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài:	Nghiên cứu này nhằm phân lập và đánh giá tiềm năng kháng <i>Vibrio parahaemolyticus</i> của vi khuẩn bản địa từ môi trường nuôi tôm thẻ chân trắng tại Cam Ranh (Khánh Hòa). Các mẫu nước và bùn được thu thập, tiến hành phân lập, làm thuần và sàng lọc bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Chúng vi khuẩn tiềm năng được đánh giá đặc điểm hình thái, khả năng sinh enzyme ngoại bào và định danh bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA. Các hợp chất sinh học được tách chiết từ dịch nuôi cấy không tế bào bằng dung môi hữu cơ và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, nồng độ ức chế tối thiểu cũng như độ ổn định theo nhiệt độ, pH và enzyme. Kết quả cho thấy chủng BL có khả năng ức chế mạnh <i>Vibrio parahaemolyticus</i> với đường kính vòng vô khuẩn đạt $30 \pm 0,2$ mm. Chủng được xác định là <i>Bacillus licheniformis</i> với
Ngày hoàn thiện:	
Ngày đăng:	
TỪ KHÓA	
<i>Bacillus licheniformis</i>	

^{1*} Corresponding author. Email: abc@xyz.com

²

<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	độ tương đồng trình tự đạt 100%, có khả năng sinh enzyme ngoại bào như protease, cellulase và lipase. Cao chiết thu được bằng ethyl acetate thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao ($32 \pm 0,4$ mm) và nồng độ ức chế tối thiểu thấp ($32 \pm 2,5$ $\mu\text{g/mL}$). Hoạt tính kháng khuẩn duy trì tốt trong khoảng nhiệt độ từ 40 đến 121 °C và pH từ 5 đến 9, nhưng giảm rõ rệt khi xử lý với enzyme protease. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng <i>Bacillus licheniformis</i> BL có tiềm năng ứng dụng trong phát triển chế phẩm sinh học kiểm soát vi khuẩn gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản.
Hoạt tính kháng khuẩn	
Cao chiết ethyl acetate	
Nuôi trồng thủy sản	

1. Giới thiệu

Trong bối cảnh nuôi trồng thủy sản toàn cầu phát triển nhanh, tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) đã trở thành một trong những đối tượng nuôi chủ lực có giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, hệ thống nuôi thâm canh với mật độ lớn đã làm gia tăng đáng kể nguy cơ bùng phát dịch bệnh, đặc biệt là các bệnh do vi khuẩn thuộc chi *Vibrio*. Trong số đó, *Vibrio parahaemolyticus* được xác định là tác nhân chính gây hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính, gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nuôi tôm [1], [2]. Việc phụ thuộc kéo dài vào kháng sinh để kiểm soát bệnh không chỉ dẫn đến sự xuất hiện của vi khuẩn kháng thuốc mà còn gây tồn dư trong sản phẩm và tác động tiêu cực đến môi trường nuôi, làm gia tăng áp lực tìm kiếm các giải pháp thay thế bền vững [3], [4].

Các hợp chất sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật, đặc biệt là từ các chủng *Bacillus*, đang nổi lên như một hướng tiếp cận đầy tiềm năng nhờ khả năng sinh tổng hợp đa dạng các chất kháng khuẩn như lipopeptide, bacteriocin và enzyme ngoại bào. Những hợp chất này có thể ức chế vi khuẩn gây bệnh thông qua nhiều cơ chế khác nhau như phá vỡ màng tế bào, ức chế quorum sensing và cản trở hình thành màng sinh học, đồng thời thể hiện độ bền cao trong các điều kiện môi trường khắc nghiệt [5]-[7]. Mặc dù nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh hiệu quả đối kháng của *Bacillus* đối với *Vibrio spp.*, các nghiên cứu đi sâu vào tách chiết, xác định hiệu lực kháng khuẩn (MIC) và đặc trưng hóa các tính chất sinh học của hoạt chất vẫn còn hạn chế [8], [9].

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về vi khuẩn bản địa trong ao nuôi tôm chủ yếu dừng lại ở bước phân lập và sàng lọc chủng tiềm năng, trong khi các nghiên cứu mang tính hệ thống về tách chiết, đánh giá hoạt tính và làm rõ bản chất hóa sinh của các hợp chất kháng khuẩn còn chưa được khai thác đầy đủ. Đặc biệt, các nghiên cứu kết hợp đồng thời đánh giá hiệu lực kháng khuẩn với các yếu tố như độ bền nhiệt, độ ổn định pH và ảnh hưởng của enzyme nhằm suy luận bản chất hoạt chất còn rất hạn chế [10], [11].

Do đó, nghiên cứu này nhằm tách chiết và đánh giá hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của các hợp chất sinh học từ chủng *B. licheniformis* BL bản địa phân lập từ ao nuôi tôm tại Việt Nam. Đồng thời, nghiên cứu tiến hành xác định nồng độ ức chế tối thiểu và khảo sát các đặc tính sinh học quan trọng của hoạt chất, bao gồm độ bền nhiệt, độ ổn định pH và ảnh hưởng của enzyme, nhằm bước đầu làm rõ bản chất và định hướng ứng dụng trong phát triển chế phẩm sinh học phục vụ nuôi trồng thủy sản bền vững.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

- Năm mẫu bùn và 5 mẫu nước lấy từ các ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại phường Cam Ranh, tỉnh Khánh Hoà (toạ độ 11°59'6"B 109°12'9" Đ)

- Chủng vi khuẩn kiểm định *Vibrio parahaemolyticus* NT09 được Trung tâm nghiên cứu môi trường và bệnh thủy sản Miền Nam cung cấp.

2.2. Phân lập và sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng kháng *V. parahaemolyticus*

2.2.1. Phân lập vi khuẩn từ mẫu ao nuôi tôm

Mẫu nước và bùn được thu thập từ các ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại phường Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa và phân tích trong vòng 24 giờ. Mẫu được pha loãng ban đầu với dung dịch NaCl 0,9% vô trùng (1 mL nước hoặc 1 g bùn trong 9 mL), sau đó pha loãng tuần tự đến các nồng độ 10^{-6} –

10^{-8} (mẫu bùn) và 10^{-3} – 10^{-5} (mẫu nước). Từ mỗi độ pha loãng thích hợp, lấy 100 μ L dịch huyền phù cấy trên môi trường hiếu khí tổng số (HKTS) và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Thành phần môi trường này gồm (g/L): NH_4NO_3 2; KH_2PO_4 1; NaCl 10; KCl 0,25; MgCl_2 1,2; glucose 1; pepton 5; cao men 0,2; cao thịt 3; agar 20. Các khuẩn lạc đặc trưng được chọn và làm thuần bằng phương pháp cấy rìa lặp lại trên môi trường HKTS cho đến khi thu được dòng vi khuẩn thuần khiết, biểu hiện bằng sự xuất hiện duy nhất của một dạng khuẩn lạc [12].

2.2.2. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng kháng *V. parahaemolyticus*

Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập và làm thuần được đánh giá khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [13]. Chủng kiểm định *V. parahaemolyticus* NT09 được hoạt hóa trong môi trường NB dịch, điều chỉnh mật độ khoảng 10^6 CFU/mL trước khi tiến hành thử nghiệm đối kháng. Mật độ vi khuẩn kiểm định được xác định sơ bộ bằng phương pháp đo mật độ quang học tại bước sóng 600 nm (OD_{600}) bằng máy quang phổ. Dịch nuôi cấy sau đó được pha loãng bằng dung dịch NaCl 0,85% vô trùng đến giá trị OD tương ứng với mật độ khoảng 10^6 CFU/mL theo đường chuẩn đã thiết lập trước đó giữa OD_{600} và số lượng tế bào sống. Đồng thời mật độ vi khuẩn được kiểm tra lại bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường NA nhằm đảm bảo độ chính xác và tính đồng nhất của dịch huyền phù sử dụng trong thí nghiệm. Dịch huyền phù của chủng kiểm định sau khi điều chỉnh được trải đều trên bề mặt môi trường NA. Sau đó, đục lỗ thạch để tiến hành thử nghiệm. Các chủng vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường HKTS dịch ở 30°C trong 18–24 giờ, ly tâm ở 6000 vòng/phút để thu dịch nổi. Từ mỗi mẫu, hút 100 μ L dịch nổi cho vào các giếng thạch, sau đó ủ ở 30°C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định thông qua đường kính vòng vô khuẩn (mm), tính theo công thức: $D - d$, trong đó D là đường kính vòng ức chế và d là đường kính giếng. Thí nghiệm được lặp lại tối thiểu 3 lần.

2.3. Đánh giá một số đặc điểm sinh học và phân loại chủng vi khuẩn lựa chọn

2.3.1. Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase, protease, lipase và cellulase)

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi khuẩn được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo nguyên tắc của Williams và Orphin [14]. Các chủng được nuôi cấy trong môi trường HKTS lỏng ở 30°C, 180 vòng/phút trong 24 giờ, sau đó ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút để thu dịch nổi. Dịch nổi được sử dụng để khảo sát hoạt tính enzyme bằng cách nhỏ 100 μ L vào các giếng thạch trên môi trường chứa cơ chất đặc hiệu, ủ ở 30°C trong 24 giờ. Sau ủ, các đĩa thạch được xử lý bằng dung dịch Lugol 1X (đối với môi trường chứa tinh bột hoặc CMC) để quan sát vòng phân giải. Hoạt tính enzyme được xác định thông qua sự xuất hiện vòng sáng xung quanh giếng thạch.

Các môi trường sử dụng bao gồm: môi trường chứa 1% CMC (cellulase) và 2% agar, 1% casein (protease) và 2% agar, 1% tinh bột (amylase) và 2% agar, và 1% Tween 80 (lipase) và 2% agar. Mỗi thí nghiệm được lặp lại tối thiểu 3 lần.

2.3.2. Phân loại vi khuẩn bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA

DNA tổng số của chủng vi khuẩn được tách chiết bằng bộ kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mỹ) và kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 1%. Đoạn gen 16S rRNA được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') trong phản ứng 12,5 μ L, gồm đệm PCR (2,5 μ L), DNA khuôn (0,5 μ L), dNTPs (0,5 μ L), mỗi mồi (1,0 μ L), Taq polymerase (0,2 μ L) và nước cất vô trùng (6,8 μ L). Chu trình PCR: 94°C/4 phút; 35 chu kỳ (94°C/35 giây, 50°C/35 giây, 72°C/1 phút); kéo dài cuối 72°C/5 phút.

Sản phẩm PCR (~1500 bp) được kiểm tra, tinh sạch bằng bộ kit HiPurA® (HiMedia, Ấn Độ) và giải trình tự theo phương pháp Sanger trên hệ thống ABI 3100 Avant (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự thu được được so sánh với GenBank bằng BLAST để xác định mức độ tương đồng ($\geq 96\%$), đồng thời xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA 11 theo phương pháp Neighbor-Joining với 1000 lần bootstrap. Kết quả được kết hợp với đặc điểm hình thái và sinh lý – sinh hóa để định danh chủng vi khuẩn.

2.4. Tách chiết các hoạt chất sinh học từ chủng vi khuẩn có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus*

Quy trình tách chiết hoạt chất sinh học được thực hiện theo Tan và cộng sự [15]. Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong 100 mL môi trường HKTS dịch (bình 500 mL) ở 30°C, 180 vòng/phút trong 16–18 giờ. Dịch nuôi được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 20 phút, sau đó lọc qua màng 0,2 µm để thu dịch nuôi không tế bào (CFS). Các hợp chất sinh học được tách chiết từ CFS bằng phương pháp chiết lỏng–lỏng với các dung môi *n*-hexane, ethyl acetate, chloroform và diethylether (tỷ lệ 1:1, v/v), khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau phân tách pha, pha dung môi hữu cơ được thu và cô quay chân không ở < 40°C để thu cao chiết thô. Cao chiết từ pha hữu cơ được hòa tan lại trong methanol, trong khi phần từ pha nước được hòa tan trong nước cất vô trùng. Các dung dịch sau đó được lọc qua màng 0,22 µm để thu dịch chiết thô phục vụ các thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn.

2.5. Đánh giá hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của các hoạt chất sinh học từ vi khuẩn

2.5.1. Đánh giá hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của dịch chiết chứa hoạt chất sinh học từ vi khuẩn

Hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của các dịch chiết được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [16]. Chủng kiểm định *V. parahaemolyticus* NT09 được hoạt hóa, điều chỉnh mật độ thích hợp và trải đều trên môi trường NA. Các đĩa giấy vô trùng (6 mm) được tẩm 10 µL dịch chiết, làm khô và đặt lên bề mặt thạch đã cấy vi khuẩn. Đĩa được ủ ở 30°C trong 24 giờ, kèm theo đối chứng âm (dung môi) và đối chứng dương. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định thông qua đường kính vùng ức chế (mm), tính theo công thức $D - d$, trong đó D là đường kính vòng ức chế và d là đường kính đĩa giấy (6 mm). Kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình của các lần lặp lại.

2.5.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các cao chiết được xác định bằng phương pháp vi pha loãng trên đĩa 96 giếng. Cao chiết được hòa tan tạo dung dịch gốc và pha loãng hai lần liên tiếp trong môi trường NB để tạo dãy nồng độ khảo sát. Chủng kiểm định *V. parahaemolyticus* NT09 được hoạt hóa trong môi trường NB lỏng ở 28–30°C trong 16–18 giờ, sau đó điều chỉnh mật độ đạt khoảng 10⁶ CFU/mL. Trong mỗi giếng, bổ sung môi trường NB, dịch chiết và huyền phù vi khuẩn sao cho thể tích cuối cùng đồng nhất. Thí nghiệm bao gồm đối chứng âm (NB + vi khuẩn), đối chứng trắng (NB) và đối chứng dung môi. Các đĩa được ủ ở 28–30°C trong 18–24 giờ. Sự sinh trưởng vi khuẩn được đánh giá qua độ đục hoặc mật độ quang, và giá trị MIC được xác định là nồng độ thấp nhất không ghi nhận sự phát triển của vi khuẩn. Mỗi nghiệm thức được lặp lại tối thiểu ba lần.

2.6. Đánh giá đặc tính sinh học của các hoạt chất kháng *Vibrio parahaemolyticus*

2.6.1. Độ bền nhiệt

Dịch chiết chứa hoạt chất sinh học được chia thành các phần và xử lý ở các mức nhiệt độ 40, 60, 80, và 100°C trong 30 phút và 121°C trong 15 phút, sau đó làm nguội về nhiệt độ phòng. Hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của các mẫu sau xử lý được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch thông qua đo đường kính vòng vô khuẩn (mm). Mẫu không xử lý nhiệt được sử dụng làm đối chứng, và kết quả được biểu thị dưới dạng phần trăm hoạt tính còn lại so với đối chứng.

2.6.2. Độ ổn định pH

Dịch chiết được điều chỉnh về các giá trị pH 3, 5, 7, 9 và 11 bằng HCl 1 N hoặc NaOH 1 N, sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 1–2 giờ. Sau xử lý, pH được đưa về trung tính ($\approx 7,0$) trước khi đánh giá. Hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch thông qua đo đường kính vòng vô khuẩn (mm). Mẫu không điều chỉnh pH được sử dụng làm đối chứng.

2.6.3. Ảnh hưởng của enzyme

Dịch chiết được xử lý riêng rẽ với các enzyme gồm proteinase K, trypsin, pepsin, amylase và lipase (1,0 mg/mL) ở 37°C trong 1–2 giờ, sau đó bất hoạt enzyme bằng gia nhiệt ở 80°C trong 10–15 phút. Hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của các mẫu sau xử lý được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch thông qua đo đường kính vòng vô khuẩn (mm). Mẫu không xử lý enzyme được sử dụng làm đối chứng. Sự thay đổi hoạt tính được sử dụng để định hướng sơ bộ bản chất của hoạt chất sinh học.

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được tiến hành tối thiểu ba lần độc lập. Kết quả được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD). Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel hoặc phần mềm thống kê chuyên dụng.

3. Kết quả và bàn luận

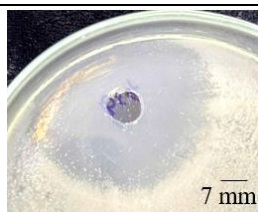
3.1. Phân lập và sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*

Từ các mẫu nước, bùn ao và tôm tại Cam Ranh (Khánh Hòa), chủng BL được phân lập và xác định có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* nổi bật, với đường kính vòng vô khuẩn đạt $30 \pm 0,16$ mm (Bảng 1 và Hình 1). Khả năng đối kháng *Vibrio* của các chủng *Bacillus* cũng đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây. LV và cộng sự [17] cho thấy chủng *Bacillus* sp. JK08 sinh lipopeptide có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* VP02r với đường kính vòng kháng khuẩn đạt $18,2 \pm 0,2$ mm. Mahdhi và cộng sự [19] cũng ghi nhận các chủng *Bacillus subtilis*, *B. cereus* và *B. coagulans* có khả năng đối kháng với các chủng *Vibrio* gây bệnh, với đường kính vòng kháng khuẩn dao động 12-18 mm. Ngoài ra, Li và cộng sự [18] đã báo cáo các hợp chất có nguồn gốc từ *Bacillus*, đặc biệt là các lipopeptide và peptide kháng khuẩn, có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát các loài *Vibrio* gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, do sự khác biệt về chủng vi khuẩn kiểm định, điều kiện nuôi cấy, thành phần môi trường cũng như nồng độ các hợp chất kháng khuẩn trong từng nghiên cứu, việc so sánh trực tiếp kích thước vòng kháng khuẩn giữa các công bố cần được xem xét một cách thận trọng. Mặc dù vậy, kết quả thu được cho thấy chủng BL là một chủng vi khuẩn bản địa có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất ngoại bào kháng *V. parahaemolyticus* với hoạt tính đáng chú ý, qua đó cho thấy tiềm năng ứng dụng trong phát triển các chế phẩm sinh học nhằm phòng ngừa và kiểm soát bệnh do *Vibrio* trong nuôi tôm thẻ chân trắng.

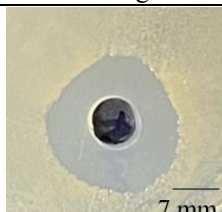
Trên cơ sở đó, chủng BL được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu các đặc điểm sinh học và định danh phân tử nhằm làm rõ cơ chế đối kháng và định hướng ứng dụng.

Bảng 1. Khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* của chủng vi khuẩn BL

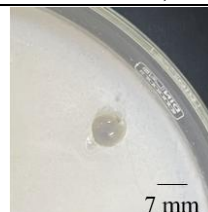
STT	Ký hiệu chủng	Nguồn phân lập	Hoạt tính kháng khuẩn (mm)
1	BL	Cam Ranh, Khánh Hòa	$30 \pm 0,2$
2	Đối chứng dương	Doxycycline 30 μ g/mL	$14 \pm 0,2$
3	Đối chứng âm	NaCl 0,9%	0



Chủng BL



Đối chứng dương



Đối chứng âm

Hình 1. Khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* NT09 của chủng BL

3.2. Đặc điểm sinh học và định danh phân tử của chủng BL

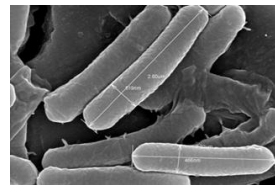
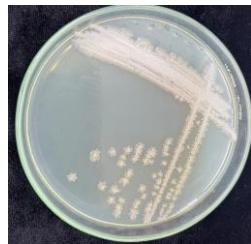
* Đặc điểm sinh học của chủng BL

Kết quả khảo sát cho thấy chủng BL hình thành khuẩn lạc màu trắng đục, dạng tròn, bề mặt khô, hơi nhẵn, mép gọn, với đường kính khoảng 3 mm. Quan sát hiển vi và ảnh SEM ($\times 30.000$) cho thấy tế bào có dạng hình que, Gram dương, có khả năng sinh bào tử, bề mặt tương đối nhẵn và cấu trúc ổn định (Hình 2). Những đặc điểm này phù hợp với vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, nhóm vi sinh vật có khả năng thích nghi tốt trong môi trường nuôi và sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Chủng BL thể hiện khả năng sinh tổng hợp đa dạng enzyme ngoại bào, bao gồm protease ($23 \pm 0,2$ mm), cellulase ($22 \pm 0,2$ mm), lipase ($22 \pm 0,1$ mm) và amylase (~ 3 mm) (Bảng 2). Phổ enzyme này cho thấy, chủng BL có khả năng phân giải hiệu quả các hợp chất hữu cơ như protein, lipid và cellulose, góp phần cải thiện chất lượng môi trường nuôi. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trên *Bacillus* spp. cho thấy khả năng tiết enzyme mạnh có liên quan đến tăng trưởng vật nuôi và kiểm soát vi khuẩn gây bệnh [20], [21]. Đồng thời, hoạt tính enzyme ngoại bào có thể góp phần tạo lợi thế cạnh tranh sinh học, hạn chế sự phát triển của *V. parahaemolyticus*.

Chủng BL sau khi giải trình tự 2 chiều, đã thu được trình tự gồm 1438 nucleotide và được đăng ký trên ngân hàng gene với mã số PZ380065. Khi so sánh trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn BL với trình tự 16S rRNA của các chủng vi khuẩn khác trên NCBI, chúng tôi nhận thấy trình tự gen của chủng BL có độ bao phủ so sánh (query cover) lên tới 100% và độ tương đồng cao với các trình tự gen của các chủng vi khuẩn thuộc loài *Bacillus licheniformis*. Cụ thể tương đồng 99,86% với trình tự gen 16S rRNA của chủng *Bacillus licheniformis* ZBG40 (OP223358) và tương đồng ít hơn (99,86%) với chủng *Bacillus haynesii* LB1 (PZ292867) nhưng độ bao phủ là 99%. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước, trong đó *B. licheniformis* thường được phân lập từ môi trường nuôi tôm và thể hiện hoạt tính kháng *Vibrio* nổi bật [8], [11], [17]. Đáng chú ý, *B. licheniformis* là loài có giá trị ứng dụng cao trong nuôi trồng thủy sản nhờ khả năng hình thành bào tử bền vững, thích nghi tốt với điều kiện môi trường khắc nghiệt, đồng thời có khả năng sinh enzyme ngoại bào và tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn. Sự kết hợp giữa các đặc điểm hình thái, khả năng sinh enzyme và năng lực hình thành biofilm mạnh của chủng BL góp phần tạo nên lợi thế sinh học rõ rệt, giải thích cho hoạt tính đối kháng cao đối với *V. parahaemolyticus*.

Trên cơ sở đó, chủng BL được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu tách chiết và đặc trưng hóa các hoạt chất kháng khuẩn, nhằm làm rõ bản chất hoạt tính và định hướng ứng dụng trong phát triển chế phẩm sinh học cho nuôi tôm bền vững.

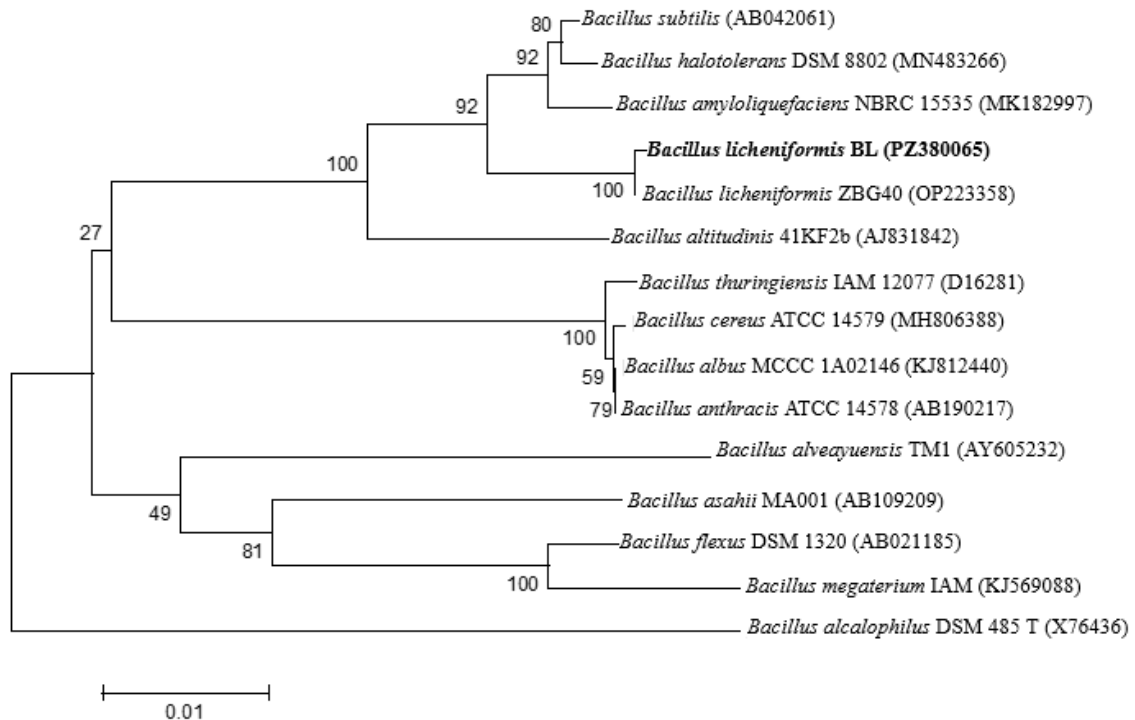


Độ phóng đại 30.000 lần

Hình 2. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng vi khuẩn BL

Bảng 2. Hoạt tính sinh enzyme ngoại bào của chủng BL

Đường kính hoạt tính sinh enzyme (mm)			
Protease	Cellulose	Lipase	Amylase
$23 \pm 0,2$	$22 \pm 0,2$	$22 \pm 0,1$	$3 \pm 0,1$

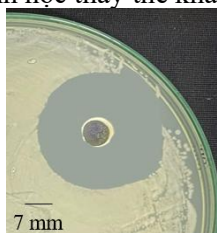


Hình 3. Vị trí phân loại của chủng BL và các loài có quan hệ họ hàng gần

3.3. Hoạt tính kháng khuẩn và nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các hợp chất sinh học

Các hợp chất sinh học từ chủng *B. licheniformis* BL được tách chiết từ dịch nuôi cấy không tế bào bằng các dung môi có độ phân cực khác nhau (*n*-hexane, chloroform, ethyl acetate và diethylether). Kết quả cho thấy hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* tập trung chủ yếu ở phân đoạn ethyl acetate. Cụ thể, cao chiết ethyl acetate của chủng BL cho đường kính vòng vô khuẩn đạt $32 \pm 0,4$ mm và giá trị MIC đạt $32 \pm 2,5$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, cho thấy khả năng ức chế mạnh ở nồng độ thấp. Hoạt tính này nhiều khả năng liên quan đến sự hiện diện của các hợp chất bán phân cực như lipopeptide và polyketide, vốn đã được chứng minh có hiệu quả cao đối với vi khuẩn Gram âm.

So sánh với các nghiên cứu quốc tế cho thấy kết quả thu được ở mức cao. MIC của *B. licheniformis* đối với *V. parahaemolyticus* thường dao động trong khoảng 16–64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [22], trong khi các cao chiết từ *Bacillus* spp. được báo cáo nằm trong khoảng 32–256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [23], [24]. Đồng thời, đường kính vòng vô khuẩn của phân đoạn ethyl acetate thường ghi nhận trong khoảng 20–30 mm [24], cho thấy giá trị 32 mm của chủng BL là cao hơn so với nhiều công bố gần đây. Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây cũng chỉ ra rằng các hợp chất từ *B. licheniformis* có khả năng tác động trực tiếp lên màng tế bào *Vibrio*, gây rò rỉ nội chất và ức chế sinh trưởng [25]–[26], phù hợp với hoạt tính mạnh quan sát được trong nghiên cứu này. Nhìn chung, cao chiết ethyl acetate từ chủng BL thể hiện hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* mạnh và ổn định, với hiệu lực tương đương hoặc vượt nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước, cho thấy tiềm năng ứng dụng cao trong phát triển chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh trong nuôi tôm.



Hình 5. Hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* NT09 của cao chiết từ chủng BL thu nhận bằng dung môi ethyl acetate

3.4. Đặc tính sinh học của các hoạt chất kháng *Vibrio parahaemolyticus* từ chủng BL

Các cao chiết từ chủng *Bacillus licheniformis* BL cho thấy độ ổn định tương đối cao dưới các điều kiện môi trường khác nhau. Hoạt tính kháng khuẩn được duy trì tốt trong khoảng 40–80°C và vẫn còn đáng kể sau xử lý ở 100–121°C (≈ 20 –24 mm), cho thấy độ bền nhiệt cao, phù hợp với đặc tính của các lipopeptide từ *Bacillus* đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu quốc tế [5], [6].

Về pH, cao chiết ổn định trong khoảng pH 5–9, trong khi giảm ở pH cực đoan (3 và 11) nhưng vẫn giữ được hoạt tính. Xu hướng này tương đồng với các báo cáo trước đây về các hợp chất dạng lipopeptide hoặc peptide vòng [7], [8].

Hoạt tính kháng khuẩn giảm mạnh sau xử lý với protease nhưng hầu như không thay đổi với amylase và lipase, cho thấy hoạt chất kháng khuẩn có thể chứa thành phần protein hoặc peptide. Kết quả này gợi ý hoạt chất có khả năng thuộc nhóm peptide hoặc lipopeptide kháng khuẩn có nguồn gốc từ *Bacillus* [4], [9]. Tuy nhiên, để xác định chính xác bản chất hoá học và cơ chế tác động của hoạt chất, cần có thêm các nghiên cứu phân tích chuyên sâu như LC-MS, NMR hoặc xác định trình tự peptide.

Kết hợp với MIC thấp (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và vòng vô khuẩn lớn (~ 32 mm), các hợp chất từ chủng BL vừa có hiệu lực cao vừa ổn định trong điều kiện rộng, tương đương với các lipopeptide như lichenysin, surfactin hoặc iturin đã được công bố [5], [8]. Nhìn chung, các đặc tính này cho thấy hoạt chất kháng khuẩn từ chủng BL nhiều khả năng thuộc nhóm peptide hoặc lipopeptide bền vững, có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát *Vibrio* trong nuôi trồng thủy sản.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và enzyme đến hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* của cao chiết BL

Yếu tố	Điều kiện	Hoạt tính (mm)
Nhiệt độ (°C)	40 / 60 / 80 / 100 / 121	31 \pm 0,5 / 30 \pm 0,6 / 28 \pm 0,7 / 24 \pm 0,8 / 20 \pm 0,9
pH	3 / 5 / 7 / 9 / 11	22 \pm 0,7 / 29 \pm 0,5 / 32 \pm 0,4 / 30 \pm 0,6 / 21 \pm 0,8
Enzyme	Prot.K / Tryp / Peps / Amy / Lip	12 \pm 0,6 / 14 \pm 0,5 / 13 \pm 0,7 / 31 \pm 0,5 / 30 \pm 0,6

Đối chứng (không xử lý): 32 \pm 0,4 mm

Prot.K: Proteinase K; Tryp: Trypsin; Peps: Pepsin; Amy: Amylase; Lip: Lipase

4. Kết luận

Đã phân lập và tuyển chọn được chủng vi khuẩn bản địa BL từ môi trường nuôi tôm tại Cam Ranh (Khánh Hòa) có khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*, với đường kính vòng vô khuẩn đạt 30 \pm 0,2 mm. Dựa trên đặc điểm sinh học và trình tự gen 16S rRNA, chủng BL được định danh là *Bacillus licheniformis* BL (độ tương đồng 100%); và có khả năng sinh enzyme ngoại bào như protease, cellulase và lipase. Các hợp chất sinh học từ chủng BL được tách chiết hiệu quả bằng ethyl acetate, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao (32 \pm 0,4 mm) và giá trị MIC thấp (32 \pm 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Hoạt chất kháng khuẩn có độ bền nhiệt tốt (40–121°C), ổn định trong khoảng pH 5–9 và nhạy cảm với protease, cho thấy bản chất có khả năng thuộc nhóm peptide hoặc lipopeptide.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài “Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học nano-chất kháng khuẩn có nguồn gốc từ vi sinh vật để phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính và phân trắng do *Vibrio* gây ra cho tôm thẻ chân trắng” do Bộ Nông nghiệp và Môi trường tài trợ và sử dụng các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Sinh học, VAST.

Tài liệu tham khảo

- [1] R. Kumar, P. Kumar, and S. Singh, "Pathogenicity and control strategies of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp aquaculture: A review," *Aquaculture Reports*, vol. 29, pp. 101517, 2023.
- [2] T. T. Tran, H. T. Nguyen, and M. T. Pham, "Prevalence and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing AHPND in shrimp farming systems in Vietnam," *Aquaculture Research*, vol. 53, no. 6, pp. 2450–2462, 2022.

-
- [3] S. Lulijwa, E. Rupia, and R. B. Alfaro, "Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: A review of the top 15 major producers," *Reviews in Aquaculture*, vol. 12, no. 2, pp. 640–663, 2020.
- [4] X. Chen, Y. Zhang, and H. Li, "Emerging antimicrobial resistance in aquaculture environments: Mechanisms and mitigation strategies," *Science of the Total Environment*, vol. 858, pp. 159820, 2023.
- [5] J. Yang, L. Wang, and Q. Liu, "Antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* spp.: Structure, function and application in aquaculture," *Marine Drugs*, vol. 21, no. 4, pp. 215, 2023.
- [6] Y. Wang, X. Chen, and Z. Li, "Bioactive compounds from *Bacillus* species: Antimicrobial mechanisms and aquaculture applications," *Aquaculture*, vol. 579, pp. 740104, 2024.
- [7] Z. Chen, H. Xu, and Y. Zhao, "Stability and antimicrobial activity of *Bacillus*-derived lipopeptides under different environmental conditions," *Food Control*, vol. 140, pp. 109120, 2022.
- [8] M. Li, J. Zhang, and Y. Sun, "Antibacterial activity and mechanism of *Bacillus*-derived compounds against *Vibrio* species," *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, pp. 1187654, 2023.
- [9] R. Kumar, A. Das, and S. Verma, "Recent advances in antimicrobial metabolites from *Bacillus* species and their applications," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 134, no. 5, pp. 3125–3140, 2022.
- [10] T. H. Le, Q. T. Nguyen, and H. T. Tran, "Isolation and screening of probiotic bacteria from shrimp ponds for *Vibrio* control," *Vietnam Journal of Biotechnology*, vol. 18, no. 4, pp. 789–798, 2020.
- [11] N. T. Nguyen, H. V. Pham, and T. D. Le, "Potential of indigenous *Bacillus* strains in shrimp aquaculture: Antibacterial activity and enzyme production," *Journal of Marine Science and Engineering*, vol. 11, no. 2, pp. 356, 2023.
- [12] L. D. Pham, N. T. Nguyen, and T. V. Nguyen, "Applied Microbiology in Aquaculture," (in Vietnamese), *Nhà xuất bản Nông nghiệp*, Hà Nội, pp. 45–78, 2004.
- [13] N. Noordiana, A. B. Fatimah, and Y. A. Faridah, "Antibacterial activity of lactic acid bacteria against pathogenic *Vibrio* species," *International Food Research Journal*, vol. 20, no. 1, pp. 239–244, 2013.
- [14] A. G. Williams and C. G. Orpin, "Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 33, no. 5, pp. 418–426, 1987.
- [15] Y. Tan, J. Ma, and H. Chen, "Extraction and characterization of antimicrobial compounds produced by *Bacillus* species isolated from marine environments," *Marine Drugs*, vol. 19, no. 6, pp. 321, 2021.
- [16] N. Oonmetta-Aree, T. Suzuki, P. Gasaluck, and G. Eumkeb, "Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 39, no. 10, pp. 1214–1220, 2006.
- [17] R. Lv, B. Li, Y. Xiao, J. Zhang, Y. Mai, X. Hu, and J. Chen, "Isolation and characterization of a lipopeptide-producing *Bacillus* sp. strain JK08 with antagonistic activity against *Vibrio parahaemolyticus*," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 134, no. 4, pp. 1xad084, 2023.
- [18] M. Li, J. Zhang, and Y. Sun, "Antibacterial activity and mechanism of *Bacillus*-derived compounds against *Vibrio* species," *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, pp. 1187654, 2023.
- [19] 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, pp. 983–996, 2010.
- [20] M. N. Monier, H. Kabary, A. Elfeky, S. Saadony, N. N. A. El-Hamed, M. E. Eissa, and E. S. H. Eissa, "The effects of *Bacillus* species probiotics on shrimp health and resistance," *Aquaculture International*, vol. 31, no. 6, pp. 3437–3455, 2023.
- [21] L. Monzón-Atienza, "Study of the properties and mechanism of action of *Bacillus* spp. as probiotic in aquaculture," (Doctoral dissertation), 2024.
- [22] Y. Zhang, H. Liu, X. Wang, and J. Zhang, "Antibacterial activity of *Bacillus licheniformis* against *Vibrio parahaemolyticus* and its application potential in aquaculture," *Aquaculture Research*, vol. 47, no. 12, pp. 3753–3762, 2016.
- [23] Y. Gao, L. Li, X. Liu, and J. Zhang, "Antibacterial activity of crude extracts from *Bacillus* spp. against *Vibrio* species isolated from aquaculture environments," *Aquaculture Reports*, vol. 11, pp. 23–29, 2018.
- [24] M. Li, J. Zhang, and Y. Sun, "Antibacterial activity and mechanism of *Bacillus*-derived compounds against *Vibrio* species," *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, pp. 987654, 2022.
- [25] Y. Zhang, X. Chen, and H. Li, "Antimicrobial activity of ethyl acetate extracts from marine *Bacillus* against *Vibrio parahaemolyticus*," *Marine Drugs*, vol. 19, no. 6, pp. 312, 2021.
-

-
- [26] Z. Chen, H. Xu, Y. Zhao, X. Wang, and L. Liu, "Mechanism of antibacterial activity of *Bacillus licheniformis*-derived compounds against *Vibrio parahaemolyticus*," *Aquaculture*, vol. 580, pp. 740512, 2024.