



DOI:10.22144/ctu.jsi.2020.012

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CỦA VI KHUẨN *Lactobacillus* TỪ RUỘT TÔM THẺ CHÂN TRẮNG CÓ TIỀM NĂNG PROBIOTIC ĐỂ BỔ SUNG VÀO THỨC ĂN TÔM**

Huỳnh Trường Giang, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên, Vũ Hùng Hải, Phạm Thị Tuyết Ngân và Vũ Ngọc Út

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Trường Giang (email: htgiang@ctu.edu.vn)

**Thông tin chung:**

Ngày nhận bài: 21/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 25/11/2019

Ngày duyệt đăng: 23/04/2020

**Title:**

Characterization of potential probiotic *Lactobacillus* from whiteleg shrimp intestines for possible additives in pellet feeding

**Từ khóa:**

Kháng khuẩn, hoạt tính enzyme ngoại bào, *Lactobacillus*, *Litopenaeus vannamei*, probiotic

**Keywords:**

Antibacterial activity, extracellular enzyme activity, *Lactobacillus*, *Litopenaeus vannamei*, probiotic

**ABSTRACT**

This study was aimed to screen the strains of *Lactobacillus* spp. from the intestines of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* that had probiotic properties for feed additives in intensive shrimp farming. One hundred and twenty whiteleg shrimp were collected from 12 ponds in Soc Trang, Tra Vinh, Bac Lieu and Ca Mau. Results showed that 141 strains were isolated from MRS agar. Results of the biochemical tests indicated that 23 selected strains were spherical, short rod shape; gram positive; negative for oxidase and catalase reactions. Ten strains, TV32, TV21, TV17, BL11A, DH5B, CM2B, DH3D, DH7D, DH9C, ST11, were selected based on the results of antagonistic activity and bacteriocin producing tests. These strains showed the inhibitory activity against pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* with the average inhibition zone in a range of 7-11.5 mm, of which the TV32 strain showed the highest antagonist activity. Among these strains, TV32 was the strongest extracellular enzyme activity, including protease, leu-aminopeptidase and  $\alpha$ -amylase. Therefore, it was suggested that TV32 strain could be used for in vivo evaluations for development of probiotics for whiteleg shrimp culture.

**TÓM TẮT**

Nghiên cứu nhằm tuyển chọn một số chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. từ ruột tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) có đặc tính probiotic để bổ sung vào thức ăn nuôi tôm thâm canh. Tổng cộng 120 mẫu tôm được thu từ 12 ao tôm thuộc bốn tỉnh Sóc Trăng, Trà Vinh, Bạc Liêu và Cà Mau. Kết quả phân lập được 141 chủng trên môi trường MRS agar. Kết quả kiểm tra đặc điểm sinh hóa cho thấy 23 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được chọn có hình cầu, hình que ngắn, gram dương, phản ứng oxidase và catalase âm tính. Kết quả xác định tính đối kháng và khả năng sinh bacteriocin thu được 10 chủng vi khuẩn bao gồm TV32, TV21, TV17, BL11A, DH5B, CM2B, DH3D, DH7D, DH9C, ST11. Các chủng này thể hiện tính đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, với đường kính kháng khuẩn trung bình từ 7,0-11,5 mm. Trong số các chủng này, chủng TV32 có hoạt tính enzyme protease, leu-aminopeptidase, và  $\alpha$ -amylase cao và có thể được sử dụng cho các nghiên cứu in vivo để phát triển sản phẩm probiotic cho nuôi tôm thẻ chân trắng.

Trích dẫn: Huỳnh Trường Giang, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên, Vũ Hùng Hải, Phạm Thị Tuyết Ngân và Vũ Ngọc Út, 2020. Đánh giá hoạt tính của vi khuẩn *Lactobacillus* từ ruột tôm thẻ chân trắng có tiềm năng probiotic để bổ sung vào thức ăn tôm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Thủy sản)(1): 102-111.

## 1 GIỚI THIỆU

Hiện nay, tôm thẻ chân trắng, *Litopenaeus vannamei* là một trong những đối tượng thủy sản chủ lực của các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Theo VASEP (2019), diện tích nuôi năm 2018 ước đạt 103.000 ha, với sản lượng khoảng 475.000 tấn, chiếm 63,8% tổng sản lượng tôm nước lợ. Diện tích nuôi tập trung ở các tỉnh ven biển như Cà Mau, Bạc Liêu, Sóc Trăng, Trà Vinh và Kiên Giang với các mô hình khác nhau, trong đó mô hình thâm canh và siêu thâm canh đang có khuynh hướng phát triển trong những năm gần đây. Cụ thể, Cà Mau có 2.020 ha nuôi tôm siêu thâm canh và 10.290 ha nuôi thâm canh, Bạc Liêu có 1.845 ha nuôi tôm siêu thâm canh. Tuy nhiên, sự phát triển nhanh về diện tích và sản lượng dẫn đến tình trạng ô nhiễm nguồn nước và sự bùng phát dịch bệnh. Trong đó, các bệnh do vi khuẩn và vi-rút được đánh giá gây ảnh hưởng nặng nề nhất (Huynh *et al.*, 2011; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012). Bên cạnh đó, tôm nuôi ở mật độ cao thường gặp các vấn đề như tăng trưởng chậm, hiệu quả sử dụng thức ăn thấp làm tăng chi phí sản xuất. Đây là những vấn đề mà người nuôi cần phải cân nhắc.

Kết quả nghiên cứu của Hung and Qui (2013) ghi nhận chi phí thức ăn chiếm 68% trong tổng chi phí nuôi tôm thẻ chân trắng. Vì vậy, việc giảm chi phí thức ăn đến mức thấp nhất có thể là mối quan tâm hàng đầu (Hoseinifar *et al.*, 2010). Một trong những phương pháp hiệu quả và dễ áp dụng nhất về mặt thực tế là bổ sung các chế phẩm vi sinh (probiotic) để cải thiện khả năng tiêu hóa, tăng hiệu quả sử dụng thức ăn đã được áp dụng rộng rãi trong nuôi tôm (Wang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Huynh *et al.*, 2017; 2018). Huynh *et al.* (2017) cho rằng probiotic có thể ảnh hưởng gián tiếp hoặc trực tiếp lên tăng trưởng của động vật thủy sản thông qua việc phóng thích các enzyme ngoại bào và các hợp chất có hoạt tính sinh học từ quá trình trao đổi chất. Những hợp chất này là tiền chất cho việc tổng hợp các enzyme tiêu hóa của tôm, từ đó góp phần làm tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng và khả năng sử dụng thức ăn. Hiện nay, rất nhiều dòng vi khuẩn có hoạt tính probiotic giúp tăng cường tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng trong điều kiện thí nghiệm, như là *Bacillus coagulans* (Wang, 2007), *B. subtilis* (Zokaefar *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014), *Lactobacillus plantarum* (Kongnum and Hongpattarakere, 2012; Huynh *et al.*, 2018). FAO/WHO (2006) đã đưa ra rất nhiều tiêu chí để đánh giá, chọn lựa probiotic. Trong đó, yếu tố cốt lõi

đối với một probiotic là phải sống được trong ruột (colonization và implantation) vật chủ, an toàn, có khả năng khống chế sự phát triển của mầm bệnh thông qua cạnh tranh dinh dưỡng, môi trường sống, có khả năng tiết ra những hợp chất kháng khuẩn, những enzyme đặc biệt hoặc những hợp chất có khả năng tác động đến tăng trưởng và miễn dịch đối với vật chủ. Tuy nhiên, vấn đề này chưa được chú trọng đầy đủ trong việc sàng lọc probiotic cho nuôi tôm, đặc biệt là tôm thẻ chân trắng. Phần lớn các nghiên cứu chỉ dừng lại ở mức sàng lọc khả năng kháng khuẩn trên đĩa thạch và khả năng sinh chất kháng khuẩn (Nirunya *et al.*, 2008; Trần Thị Ngọc Phương và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016).

Khi sử dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (next generation sequencing) để giải trình tự hệ vi sinh đường ruột của tôm thẻ chân trắng, Huynh *et al.* (2019) báo cáo rằng trong ruột tôm thẻ chân trắng có 73 loài, thuộc 58 giống được định danh. Trong đó, giống *Ruegeria* là giống chiếm ưu thế, kế đến là *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* và *Lactobacillus*. *Lactobacillus* chiếm số lượng 10% trong tổng số lượng OTUs (operational taxonomic units) của các loài vi khuẩn trong ruột tôm thẻ chân trắng sau khi cho ăn thức ăn có bổ sung *Lb. plantarum* 7-40. Trong khi đó, giữa các loài vi khuẩn lên men lactic, *Lactobacillus* được cho là có khả năng sản xuất các enzyme thủy phân protein và glucoside hiệu quả và hỗ trợ tích cực trong quá trình phân giải và hấp thu axit amin và glucose rất hiệu quả và được sử dụng như là probiotic (Cebeci *et al.*, 2003; Huynh *et al.*, 2018). Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là bước đầu chọn lọc được những dòng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. có khả năng sống và phát triển quần thể trong ruột tôm, vừa có hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio*, vừa có khả năng tiết enzyme tiêu hóa ngoại bào, hỗ trợ quá trình phân giải protein, peptid và glucose trong ruột tôm thẻ chân trắng, nhằm đề xuất ứng dụng trong thực tiễn nuôi tôm.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Thu mẫu tôm

Tôm thẻ chân trắng có trọng lượng khoảng 10 g/con được thu từ các ao nuôi tôm thẻ chân trắng có mật độ nuôi từ 40-60 con/m<sup>2</sup> ở 4 tỉnh Sóc Trăng, Trà Vinh, Bạc Liêu và Cà Mau. Mỗi tỉnh thu ba ao và mỗi ao thu 10 tôm. Mỗi tôm được chứa trong mỗi túi zipper riêng biệt, bảo quản lạnh và vận chuyển về phân tích tại Phòng thí nghiệm Vi sinh vật hữu ích, Bộ môn Thủy sinh học ứng dụng, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

## 2.2 Phân lập và nhận diện vi khuẩn

### *Lactobacillus* spp.

Tôm sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm được rửa sạch bằng nước cất và khử trùng bên ngoài bằng cồn 70%. Ruột tôm được nghiền trong ống eppendorf có chứa sẵn 1 mL nước muối sinh lý vô trùng. Mẫu sau đó được pha loãng với nước muối sinh lý để đạt độ pha loãng  $10^{-1}$ - $10^{-7}$ . Thể tích 100  $\mu$ L mẫu của mỗi độ pha loãng  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  được trộn với 20 mL môi trường De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (HiMedia Laboratories, Ấn Độ) có bổ sung 1,5% agar và 0,003% Bromcresol purple ở 45°C và đổ lên đĩa Petri đã tiệt trùng, sau đó ủ ở 37°C trong điều kiện kỵ khí trong 24 giờ (Huynh *et al.*, 2018). Sau khi được tách rỗng, 141 chủng được chọn để phân tích hình thái và một số chỉ tiêu sinh hóa cơ bản để nhận dạng giống *Lactobacillus* theo phương pháp của Kandler and Wiss (1986). Các chủng *Lactobacillus* chọn lọc được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS borth ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, sau đó được bảo quản -80°C có bổ sung glycerol và protein skim milk 10% cho các đánh giá tiếp theo (Huynh *et al.*, 2018).

### 2.3 Đánh giá khả năng kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của *Lactobacillus*

Khả năng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* được thực hiện theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Balouiri *et al.*, 2016). Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được sử dụng là chủng gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm được lưu trữ lại Phòng thí nghiệm vi sinh vật hữu ích, Bộ môn Thủy sinh học ứng dụng, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được phục hồi và nuôi tăng sinh trong môi trường nutrient broth (NB, Merck) có bổ sung 1,5% NaCl và được chuẩn bị ở mật độ  $10^8$  CFU/mL. Đối với vi khuẩn *Lactobacillus*, các chủng vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS broth ở 37°C trong 24 giờ. Dung dịch vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần dung dịch nổi (cell free supernatant, CFS) được sử dụng cho quá trình đánh giá khả năng kháng khuẩn. Môi trường thạch Mueller Hinton Agar (MHA, HiMedia Laboratories, Ấn Độ) được chuẩn bị. Dung dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được chuẩn bị như trên được tán đều lên môi trường thạch, sau đó tiến hành đục lỗ với đường kính  $d=6$  mm trên bề mặt thạch. Thêm 100  $\mu$ L dịch CFS của vi khuẩn *Lactobacillus* đã được chuẩn bị vào lỗ thạch, sau đó ủ 10 phút ở 4°C, kê đến là ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn được xác định bằng sự hiện diện của vòng kháng khuẩn. Đường kính vòng kháng khuẩn

(mm) được tính như sau:  $DK = D_i - d_w$  (trong đó  $D_i$  là đường kính vòng ức chế vi khuẩn bao gồm đường kính lỗ (mm) và  $d_w$  là đường kính lỗ (mm)). Đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn hoặc bằng 6 mm được xem là có khả năng ức chế (Cheikhyoussef *et al.*, 2007).

### 2.4 Đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Lactobacillus* chọn lọc

Các chủng *Lactobacillus* chọn lọc sẽ được đánh giá về khả năng tiết enzyme trên môi trường thạch. Những chủng cho kết quả dương tính sẽ tiếp tục được đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào. Các dung dịch CFS được đánh giá hoạt tính enzyme bao gồm protease, *leu*-aminopeptidase, và  $\alpha$ -amylase. Mỗi tiến trình được lặp lại ba lần. Dung dịch MRS vô trùng được sử dụng như là đối chứng.

Hoạt tính enzyme protease được thực hiện ở 40°C trong môi trường đệm Tris-HCl 100 mmol/L (pH 9,0) dựa theo mô tả của Huynh *et al.* (2018). Thể tích 100  $\mu$ L dung dịch CFS được ủ với 100  $\mu$ L casein 1% (chuẩn bị trong đệm Tris-HCl, pH 9,0) trong 10 phút ở 37°C. Phản ứng được dừng lại sau khi thêm 500  $\mu$ L dung dịch trichloroacetic acid 5%. Sau 20 phút, hỗn hợp sẽ được ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/phút, ở 4°C trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Phần CFS sẽ được tiếp tục phân tích hoạt tính enzyme protease bằng phương pháp Lowry's. Mỗi đơn vị (Unit) hoạt tính enzyme protease tương đương với lượng enzyme cần thiết để phân giải casein và phóng thích 1  $\mu$ g tyrosine/mL/phút (Huynh *et al.*, 2018).

Hoạt tính enzyme *leu*-aminopeptidase của vi khuẩn được xác định theo phương pháp mô tả bởi Huynh *et al.* (2018). Thể tích 100  $\mu$ L dung dịch CFS của *Lactobacillus* được trộn với 1,9 mL dung dịch *p*-nitroaniline (*p*-NA) axit amin 1 mM (pha trong dung dịch đệm phosphate pH 7,2). Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 60 phút, sau đó đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 410 nm bằng máy so màu quang phổ (Helios Apha Thermo, USA). Trong đó, 1 Unit của hoạt tính enzyme được thể hiện bằng lượng enzyme để phóng thích ra 1  $\mu$ mol *p*-NA/giờ ở 37°C.

Hoạt tính enzyme ngoại bào  $\alpha$ -amylase của vi khuẩn *Lactobacillus* được xác định dựa vào sự hình thành phức chất giữa tinh bột và iod sau khi vi khuẩn *Lactobacillus* lên men tinh bột ở 35°C (pH 6,0). Phương pháp phân tích dựa theo mô tả của Onilude *et al.* (2017). Thể tích 100  $\mu$ L dung dịch CFS của vi khuẩn *Lactobacillus* được ủ với 800  $\mu$ L dung dịch chứa 0,03% tinh bột (pha trong đệm phosphate) trong 30 phút. Phản ứng được dừng lại sau khi thêm 100  $\mu$ L dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M. Dung dịch iod (2,4



mL) được thêm, sau đó hỗn hợp được so màu ở bước sóng 620 nm. Trong đó, 1 Unit được định nghĩa như là lượng enzyme sử dụng để thủy phân 10 g tinh bột trong 30 phút trong điều kiện thí nghiệm.

### 2.5 Độ an toàn và sự phát triển vi khuẩn lactic (LAB) trong ruột tôm sau khi cho ăn

Để minh chứng cho sự miễn cảm của tôm thẻ chân trắng khi được cho ăn các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* chọn lọc, thí nghiệm về độ an toàn được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm. Trong đó, chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn và có hoạt tính enzyme cao nhất được sử dụng để đánh giá độ an toàn và khả năng phát triển quần thể trong ruột tôm thẻ chân trắng bằng phương pháp cho ăn. Chủng *Lactobacillus* chọn lọc được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS ở 37°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Rửa lại và pha loãng với dung dịch PBS (pH 7.4) để đạt nồng độ 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> và 10<sup>8</sup> CFU/mL bằng phương pháp xác định giá trị OD<sub>600</sub> (Ajitha *et al.*, 2004). Sau đó, 10 mL huyền phù vi khuẩn được trộn đều vào thức ăn viên cho tôm (HI-PO 7701, CP Group, Việt Nam) để đạt được liều lượng 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> và 10<sup>9</sup> CFU/kg thức ăn và sấy khô ở 37 °C trong vòng 30 phút. Thức ăn bổ sung *Lactobacillus* được kiểm tra mật độ bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường MRS agar trước khi tiến hành thí nghiệm (Ajitha *et al.*, 2004).

Tôm thẻ chân trắng (5,0±0,3 g) được chọn để bố trí trong bể chứa 100 L nước lợ 15‰, với mật độ 10 con/bể và được trang bị hệ thống sục khí, lập lại ba lần. Thí nghiệm được bố trí gồm bốn nghiệm thức: đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) và các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn (10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> và 10<sup>9</sup> CFU/kg thức ăn). Tôm được cho ăn thức ăn đã chuẩn bị sẵn với tần suất 2 lần/ngày với tỉ lệ cho ăn 3% trọng lượng thân. Sau khi cho ăn liên tục trong bảy ngày, tỉ lệ sống và mật số của tổng vi khuẩn lactic (LAB) trong ruột tôm được đánh giá.

### 2.6 Phương pháp xử lý số liệu

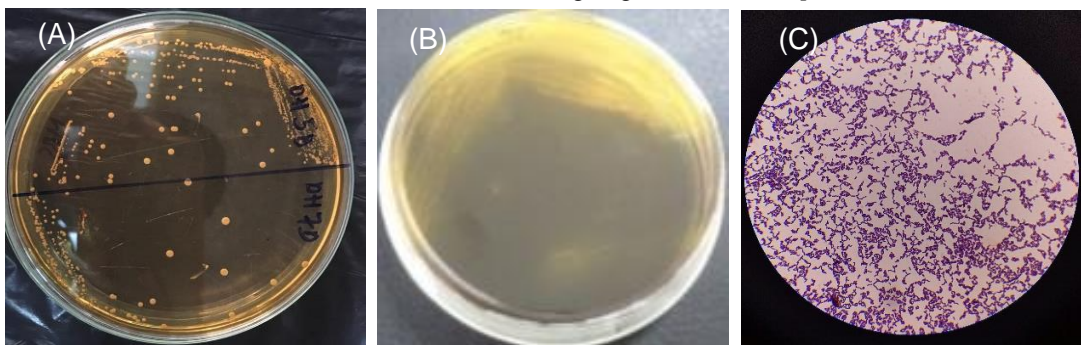
Số liệu được tính trung bình ± SD để so sánh đường kính vòng kháng khuẩn và hoạt tính enzyme của các chủng vi khuẩn để xác định chủng tốt nhất. Số liệu phần trăm về tỉ lệ sống được chuyển về arcsine trước khi xử lý ANOVA và với phép thử TUKEY ở mức ý nghĩa p=0,05 bằng chương trình SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, Mỹ).

## 3 KẾT QUẢ

### 3.1 Phân lập và nhận dạng giống *Lactobacillus* trong ruột tôm thẻ chân trắng

Tổng số 141 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. có khả năng phát triển trên môi trường MRS agar được chọn dựa theo hình thái khuẩn lạc điển hình của vi khuẩn lactic (tròn, trắng, bờ đều) theo mô tả của Kandler and Weiss (1986), Trên môi trường nuôi cấy MRS agar ở 37°C sau 24 giờ cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn phân lập đều có khuẩn lạc dạng tròn, bìa nguyên, có một vài khuẩn lạc có bìa gợn sóng, kích thước khuẩn lạc dao động từ 0,5-2,0 mm (Hình 1A&B). Hầu hết số khuẩn lạc đều có màu trắng sữa, trơn láng (139 chủng, chiếm 98,6%), có hai chủng trắng đục, gợn sóng (chiếm 1,4%).

Kết quả nhuộm Gram cho thấy có 23 chủng bắt màu tím xanh của crystal violet (Bảng 1 và Hình 1C) chứng tỏ các chủng này là vi khuẩn Gram dương. Quan sát hình dạng tế bào ở độ phóng đại 100X xác định hầu hết các tế bào vi khuẩn có dạng hình que, một số hình cầu xếp thành chuỗi hoặc xếp riêng lẻ. Trong đó, que ngắn có 10 chủng (chiếm 43,5%), cầu nhỏ có 10 chủng (chiếm 43,5%), hai chủng ở dạng chuỗi cầu nhỏ (chiếm 8,7%), và một chủng cầu to (chiếm 4,3%) (Bảng 1). Kết quả kiểm tra khả năng di động cho thấy 23 chủng trên đều không có khả năng di động và không có khả năng sinh bào tử. Đồng thời, thử nghiệm catalase và oxydase đều cho kết quả âm tính, tương đồng với các đặc tính của giống *Lactobacillus* sp.



Hình 1: Khuẩn lạc *Lactobacillus* trên môi trường MRS agar (A), MRS agar + chỉ thị Bromocresol purple (B), và kết quả nhuộm Gram (C)

**Bảng 1: Kết quả nhuộm Gram và kiểm tra đặc tính sinh hóa của vi khuẩn LAB**

TT	Chủng	Gram	Hình dạng	Catalase	Oxydase	Di động	Hình thành bào tử
1	BL8C	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không
2	BL10A	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không
3	BL11A	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
4	BL11B	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không
5	TV17	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
6	TV18	+	Cầu to	-	-	Không	Không
7	TV21	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
8	TV32	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
9	DH2B	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
10	DH3C	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
11	DH3D	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
12	DH5B	+	Chuỗi cầu nhỏ	-	-	Không	Không
13	DH7D	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
14	DH8A	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không
15	DH9C	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
16	DH10C	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không
17	DH11C	+	Que ngắn	-	-	Không	Không
18	CM1B	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không
19	CM2B	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không
20	CM5B	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không
21	CM6A	+	Chuỗi cầu nhỏ	-	-	Không	Không
22	CM6B	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không
23	ST1.1	+	Cầu nhỏ	-	-	Không	Không

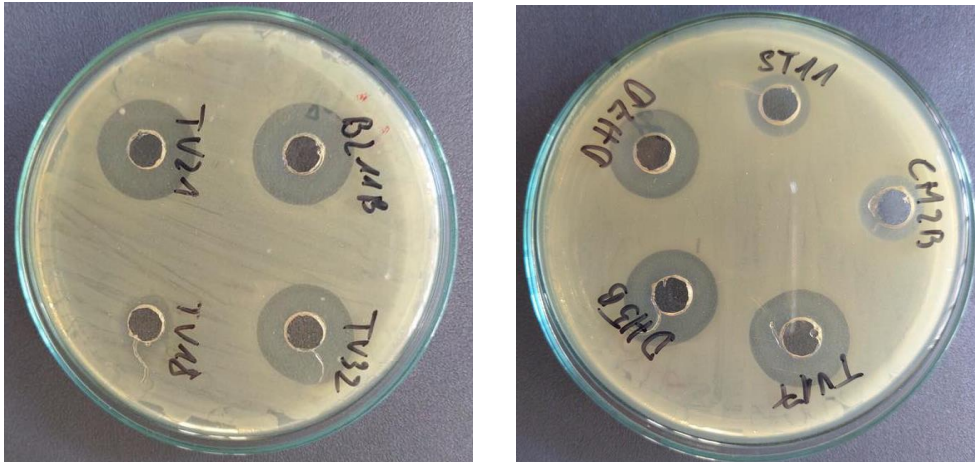
**3.2 Hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus***

Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch cho thấy trong

tổng 23 chủng vi khuẩn *Lactobacillus*, có 10 chủng có khả năng kháng khuẩn bao gồm: TV32, TV21, TV17, BL11A, DH5B, CM2B, DH3D, DH7D, DH9C, ST11 với đường kính kháng khuẩn dao động từ 7,0-11,5 mm (Bảng 2 và Hình 2).

**Bảng 2: Đường kính vòng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus***

TT	Chủng	Đường kính kháng khuẩn (D-d, mm)
1	TV32	11,5±0,71
2	TV21	10,8±0,35
3	TV17	10,5±0,71
4	BL11A	9,8±0,35
5	DH5B	8,8±0,35
6	CM2B	7,5±0,71
7	DH3D	7,5±0,71
8	DH7D	7,5±0,71
9	DH9C	7,3±0,35
10	ST11	7,0±0,71

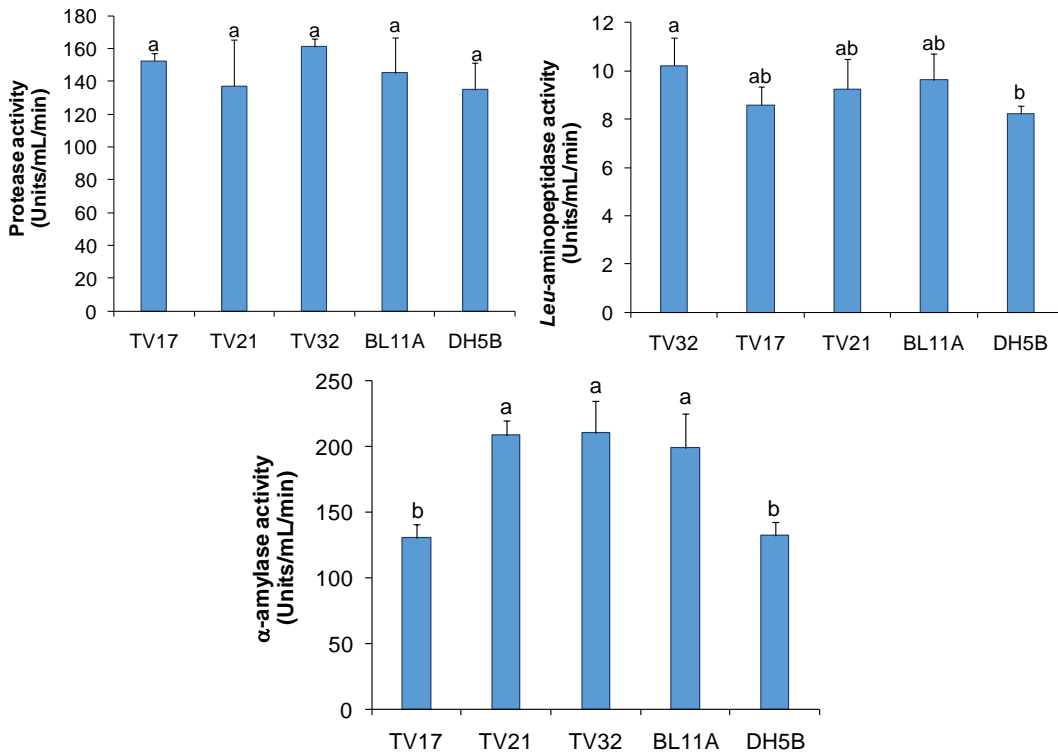


Hình 2: Vòng kháng khuẩn của dung dịch *Lactobacillus* CFS đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

**3.3 Hoạt tính enzyme của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* chọn lọc**

Sau khi kiểm tra khả năng tiết enzyme ngoại bào trên đĩa thạch, 10 chủng có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* đều có hoạt tính tiết enzyme ngoại bào protease và  $\alpha$ -amylase. Năm chủng có đường kính kháng khuẩn cao nhất bao gồm TV32, TV21, TV17, BL11A, DH5B được chọn để đánh giá hoạt tính enzyme. Kết quả cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về hoạt tính enzyme protease

giữa các chủng được chọn ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên, hoạt tính enzyme *leu*-aminopeptidase cao nhất ở chủng vi khuẩn TV32, và thấp nhất là chủng DH5B. Không có sự khác biệt có ý nghĩa về hoạt tính enzyme *leu*-aminopeptidase giữa các chủng vi khuẩn TV32, TV21, TV17, BL11A. Tương tự, chủng TV32 có khả năng tiết enzyme ngoại bào  $\alpha$ -amylase cao nhất và cao hơn có ý nghĩa so với hai chủng TV17 và DH5B (Hình 3).



Hình 3: Hoạt tính enzyme protease, *leu*-aminopeptidase and  $\alpha$ -amylase của các chủng vi khuẩn chọn lọc

### 3.4 Độ an toàn và mật độ của chủng vi khuẩn chọn lọc trên tôm thẻ chân trắng

Với khả năng kháng khuẩn và hoạt tính enzyme cao so với các chủng còn lại, chủng TV32 được sử dụng để phối trộn với thức ăn ở liều  $10^7$ ,  $10^8$  và  $10^9$  CFU/kg thức ăn và cho tôm thẻ chân trắng ăn, tỉ lệ sống của tôm được ghi nhận là 100% ở các nghiệm thức. Mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* spp. trong nghiệm thức cho ăn TV32 ở liều  $10^9$  CFU/kg thức ăn được cải thiện so với nghiệm thức đối chứng với giá trị lần lượt là  $8,2 \times 10^4$  CFU/tôm và  $2,4 \times 10^2$  CFU/tôm sau 1 tuần cho ăn. Mặc dù, chưa đánh giá được hiệu quả cải thiện tăng trưởng và sức khỏe của tôm, nhưng điều này có thể cho thấy khả năng sử dụng chủng TV32 cho các thí nghiệm *in vivo* tiếp theo.

## 4 THẢO LUẬN

Probiotic được định nghĩa là: “các vi sinh vật sống được trộn vào thức ăn giúp cải thiện hệ vi sinh đường ruột từ đó cải thiện sức khỏe tôm” (Fuller, 1989). Trong nuôi trồng thủy sản (NTTS), Moriarty (1998) đề xuất nên mở rộng định nghĩa probiotic là có thể sử dụng các vi sinh vật sống vào môi trường nước nhằm cải thiện chất lượng môi trường và sức khỏe tôm cá nuôi. Vi khuẩn lactic *Lactobacillus* được xem là vi sinh vật an toàn (Generally Recognized as Safe, GRAS) và được sử dụng phổ biến trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Vai trò của probiotic đối với vật chủ đã được nhiều nghiên cứu công bố rằng chúng sản xuất ra các hợp chất có khả năng ức chế các chủng vi khuẩn khác, cạnh tranh dinh dưỡng và môi trường sống, thúc đẩy miễn dịch và cải thiện cân bằng hệ vi sinh đường ruột của tôm cá nuôi (Chiu *et al.*, 2007). Probiotic đã được sử dụng trong NTTS nhằm hạn chế sự bùng phát dịch bệnh, thậm chí thay thế cả việc sử dụng kháng sinh nhờ việc sử dụng một số chủng probiotic có khả năng kháng khuẩn. Thực tế, rất nhiều dòng vi khuẩn Gram dương (*Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, và *Weissella*) và Gram âm (*Alteromonas*, *Photobacterium* và *Pseudomonas*) đã và đang được nghiên cứu và sử dụng hiệu quả trong NTTS (Chiu *et al.*, 2007). Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* đã được phân lập, nhằm phát hiện ra những chủng tiềm năng, vừa có khả năng kháng khuẩn, vừa có khả năng sinh enzyme để từ đó có thể thực hiện nhiều nghiên cứu sâu hơn để phát triển sản phẩm probiotic phục vụ cho nghề nuôi thủy sản trong tương lai.

Hiện nay, rất nhiều báo cáo ghi nhận các loài thuộc giống *Lactobacillus* phân lập từ nhiều nguồn khác nhau (thực phẩm lên men của con người, môi trường nước, ruột các đối tượng thủy sản) được phát triển thành các probiotic sử dụng hiệu quả trong nuôi tôm biển (Chiu *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2013; Tank *et al.*, 2018). *Lactobacillus* có thể phân lập trên các loài thủy sản và có thể phát triển thành các sản phẩm probiotic đầy tiềm năng trong cải thiện tăng trưởng, miễn dịch và sức đề kháng của tôm thẻ chân trắng trong giai đoạn hiện nay. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Trúc Linh và *ctv* (2018) cho thấy tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn có bổ sung các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng và ruột cá rô phi có tỉ lệ sống cao hơn nghiệm thức đối chứng sau khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trong qui mô phòng thí nghiệm. Ngoài ra, Đỗ Thị Thanh Dung và *ctv* (2017) đã nghiên cứu phân lập và sàng lọc được tám dòng *Lactobacillus* từ 30 mẫu bùn đáy ao thu tại Sóc Trăng. Kết quả thử nghiệm cho thấy tám chủng đều có khả năng kháng khuẩn gây AHPND. Kết quả phân tích tính đối kháng cho thấy, các vòng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn dao động từ 2,0-5,0 mm, trong khi phương pháp phân tích khuếch tán lỗ thạch có đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 2,6-4,2 mm. Tương tự, Khuất Hữu Thanh và *ctv*. (2009) đã phân lập và sàng lọc được 32 chủng *Lactobacillus* từ ruột tôm sú và môi trường ao nuôi tôm. Trong đó, 28/32 chủng có khả năng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Staphylococcus aureus* và *B. cereus*. Kết quả cũng cho thấy tôm sú ăn thức ăn có bổ sung những dòng vi khuẩn chọn lọc này đạt tỉ lệ sống cao hơn nghiệm thức đối chứng 15%. Đường kính vòng kháng khuẩn khá cao, dao động từ 13-17 mm. Gần đây nhất, Phạm Minh Tuấn và *ctv* (2018) đã phân lập được 42 chủng *Lactobacillus* từ ruột tôm sú và tôm thẻ chân trắng. Trong đó, hai dòng có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình dao động từ 7,3-12,7 mm. Trong nghiên cứu này, hai chủng *Lactobacillus* TV32 và TV21 có khả năng kháng khuẩn khá cao với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 10,8-11,5 mm.

Bên cạnh đó, nghiên cứu của Huynh *et al.* (2018) cho thấy khả năng tiết enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Lb. plantarum* 7-40 rất cao, và có khả năng hỗ trợ enzyme tiêu hóa của tôm, giúp tôm tăng trưởng tốt hơn khi phối hợp với galactooligosaccharide (GOS) như là nguồn carbon. Trong nghiên cứu này, khi đánh giá enzyme ngoại bào bao gồm protease, leu-aminopeptidase và  $\alpha$ -



amylase của các chủng vi khuẩn với glucose được sử dụng như nguồn carbon cho quá trình lên men, kết quả nghiên cứu đã sàng lọc được một số chủng có hoạt tính cao và rất có tiềm năng cho NTTS. Tuy nhiên, kết quả này cần được đánh giá *in vivo* trên tôm thẻ chân trắng để xác định khả năng cải thiện trực tiếp và gián tiếp hoạt tính enzyme tiêu hóa trong đường ruột của tôm khi cho ăn thức ăn có bổ sung các chủng vi khuẩn này.

Vi khuẩn lactic thể hiện được khả năng đối kháng là do chúng có thể sinh ra các chất có tính kháng khuẩn như axit lactic, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diacetyl và đặc biệt là bacteriocin (Ouweland *et al.*, 2004). Ảnh hưởng của axit lactic được loại bỏ khi các thí nghiệm đối kháng đều được thực hiện với phần dịch nổi (cell-free supernatant, CFS) đã trung hòa pH. Vì vậy, để xác định yếu tố kháng khuẩn có phải là bacteriocin hay không, CFS sau khi xử lý trung hòa pH sẽ được xử lý với enzyme proteinase K trước khi kiểm tra tính đối kháng. Kết quả của Phạm Minh Tuấn và *ctv* (2018) chỉ ra rằng sau khi xử lý bằng enzyme proteinase K, dung dịch CFS từ các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* phân lập không còn hoạt tính đối kháng với *V. parahaemolyticus*. Điều này chứng tỏ yếu tố kháng khuẩn của các dòng có bản chất là protein và cơ chế đối kháng với *V. parahaemolyticus* có thể theo cơ chế tạo ra các hợp chất tương tự như bacteriocin.

Hayek and Ibrahim (2013) đã đưa ra những đặc điểm quan trọng để nhận biết các loài vi khuẩn lên men lactic như là Gram dương, không tạo bào tử, kỵ khí hoặc hiếu khí không bắt buộc, hình que hoặc cầu, sản sinh axit lactic trong quá trình tiêu hóa chất bột đường. Trong khi đó, Orla-Jensen (1919) cho rằng sự phân loại các giống vi khuẩn lactic được dựa trên bốn tiêu chí bao gồm hình dạng tế bào, phương thức lên men glucose, khoảng nhiệt độ phát triển tối ưu và khả năng sử dụng đường. Các giống vi khuẩn lactic thường được nhận dạng bao gồm cầu khuẩn *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* và hình que *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*. Khi sử dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới NGS (next generation sequencing) để định danh hệ vi sinh đường ruột của tôm thẻ chân trắng, năm loài thuộc giống *Lactobacillus* được phát hiện định cư trong ruột tôm bao gồm *Lb. paraplantarum*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. reuteri*, và *Lb. ruminis* (Huynh *et al.*, 2019). Trong nghiên cứu này, 141 chủng *Lactobacillus* đã được sàng lọc với 23 chủng có khả năng kháng khuẩn, trong đó có 10 chủng có khả năng kháng khuẩn cao với đường kính vòng kháng khuẩn từ 7 mm. Do chỉ bước đầu sàng lọc các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng

probiotic, nghiên cứu tiếp theo cần tập trung tiến hành định danh vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA và đánh giá khả năng tiết enzyme tiêu hóa, khả năng phân hủy các dạng đường khác nhau để làm cơ sở cho việc phát triển sản phẩm probiotic phục vụ cho NTTS trong thời gian tới.

*Lactobacillus* là giống có thành phần loài rất đa dạng với đặc điểm không tạo bào tử, Gram dương kích thước từ 0,5-1,2 × 1-10 μm, sản phẩm phân hủy là axit lactic (Aasen *et al.*, 2000). Hiện có khoảng 25 loài có khả năng lên men các sản phẩm có nguồn gốc thực vật, động vật và môi trường biển (Huynh and Liu, 2018). *Lactobacillus* có khả năng tiết enzyme protease, *leu*-aminopeptidase (Huynh *et al.*, 2018) và  $\alpha$ -amylase (Onilude *et al.*, 2017). Trong số các enzyme ngoại bào do vi khuẩn *Lactobacillus* tiết ra, protease là enzyme tham gia vào quá trình thủy phân các liên kết peptide trong phân giải protein (Sulthonyah *et al.*, 2015), *leu*-aminopeptidase tham gia vào quá trình thủy phân các peptide thành các axit amin cho vi khuẩn. Ngoài ra, những dòng vi khuẩn lactic có khả năng phân hủy tinh bột là rất hiếm. Chỉ duy nhất ba giống là *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* thuộc nhóm vi khuẩn lactic được báo cáo là có khả năng sản sinh axit lactic khi sử dụng tinh bột như là nguồn carbon (Onilude *et al.*, 2017). Nghiên cứu của Marathe and Ghosh (2009) cho thấy hoạt tính enzyme protease của vi khuẩn *Lb. plantarum* NCIM 2083 là 1,1 Units/mL/phút (pH 7,0; 30°C), trong khi đó nghiên cứu của Huynh *et al.* (2018) cho thấy hoạt tính enzyme của vi khuẩn *Lb. plantarum* 7-40 là 54,2 Units/mL/phút (tương đương 70,5 Units/mg protein/phút ở 37°C, pH 9,0) khi được nuôi trong môi trường MRS cải tiến với glucose là nguồn carbon. Ngoài ra, nghiên cứu của Huynh *et al.* (2018) cũng cho thấy hoạt tính *leu*-aminopeptidase là 104,8 Units/mg protein. Trong nghiên cứu hiện tại, các chủng vi khuẩn chọn lọc có hoạt tính enzyme protease khá cao, dao động từ 134,9-161,2 Units/mL/phút, và hoạt tính enzyme *leu*-aminopeptidase dao động từ 8,20-10,2 Units/mL/phút. Điều này cho thấy đây là những chủng tiềm năng để chọn lọc và phát triển thành probiotic có khả năng cải thiện hiệu quả sử dụng protein trong thức ăn của tôm thẻ chân trắng khi cho ăn thức ăn có bổ sung các chủng vi khuẩn này. Do đó, nghiên cứu tiếp theo cần thực nghiệm khả năng cải thiện tăng trưởng của tôm, khả năng tiêu hóa và hiệu quả sử dụng protein khi phối trộn một trong những chủng sàng lọc được vào thức ăn trong điều kiện thí nghiệm.



## 5 KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được 23 chủng vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus* từ 141 chủng vi khuẩn phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng. Mười chủng *Lactobacillus* có hoạt tính probiotic đã được đánh giá đặc tính sinh hóa, khả năng kháng khuẩn và hoạt tính enzyme ngoại bào bao gồm protease, leu-aminopeptidase và  $\alpha$ -amylase. Chủng *Lactobacillus* TV32 có hoạt tính cao nhất và có tiềm năng phát triển probiotic cho tôm nuôi. Tuy nhiên, những nghiên cứu về khả năng cải thiện tăng trưởng, enzyme tiêu hóa, hiệu quả sử dụng thức ăn của tôm cần phải được đánh giá trong các nghiên cứu tiếp theo.

## LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aasen, I.M., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L. and Storro, I., 2000. Influence of complex nutrient, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG42687. Applied Microbiology and Biotechnology. 53: 159-166.

Ajitha, S., Sridhar, M., Sridhar, N., Singh, I.S.B. and Varghese, V., 2004. Probiotic effects of lactic acid bacteria against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus (Fenneropenaeus) indicus* (H. Milne Edwards). Asian Fish Science. 17: 71-80.

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibsouda, S.K., 2012. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 6: 71-79.

Cebeci, A. and Gurakan, C., 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiology. 20: 11-518.

Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M. and Cheng, W., 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish and Shellfish Immunology. 23: 364-377.

Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Các bệnh nguy hiểm trên tôm nuôi ở đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 22C: 106-118.

Đỗ Thị Thanh Dung, Võ Đình Quang và Phan Thị Phương Trang, 2017. Phân lập và tuyển chọn *Lactobacillus* spp. kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây hội chứng chết sớm trên tôm tại Sóc Trăng. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ. 3: 5-15.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization), 2006. Probiotics in food.

Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 85. FAO, Rome. 56 pages.

Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 365-378.

Hayek, S.A. and Ibrahim, S.A., 2013. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A Review. Food and Nutrition Sciences. 4: 73-87.

Hoseinifar, S.H., Zare, P. and Merrifield, D.L., 2010. The effects of inulin on growth factors and survival of the Indian white shrimp larvae and postlarvae (*Fenneropenaeus indicus*). Aquaculture Research. 41: e348-e352.

Hung, L.T. and Quy, O.M., 2013. On farm feeding and feed management in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming in Vietnam. In: Hasan, M.R., New, M.B. (Eds), On-farm feeding and feed management in aquaculture. Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 583, pp. 337-357. FAO, Rome.

Huynh, T.G. and Liu, C.H., 2018. Study on action mechanisms of synbiotic as growth-promoting factor in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Doctoral thesis on Aquaculture. National Pingtung University of Science and Technology.

Huynh, T.G., Chi, C.C., Nguyen, T.P., Hien Tran, T.T.T., Cheng, A.A. and Liu, C.H., 2018. Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research. 46: 2416-2428.

Huynh, T.G., Chiu, C.H., Wang, Y.C., Truong, Q.P. and Liu, C.H., 2019. Bacterial population in intestines of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed a synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* and galactooligosaccharide. Aquaculture Research. 50: 807-817.

Huynh, T.G., Shiu, Y.L., Nguyen, T.P., Truong, Q.P., Chen, J.C. and Liu, C.H., 2017. Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. Fish and Shellfish Immunology. 64: 367-382.

Huynh, T.G., Yeh, S.T., Lin, Y.C., Shyu, J.F., Chen, L.L. and Chen, J.C., 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphylum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology. 31: 286-293.

Kandler, O. and Weiss N., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212 AL. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and

- Holt, J.G., Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins. pp. 1209-1234.
- Khuất Hữu Thanh, Nguyễn Đăng Phúc Hải, Bùi Văn Đạt và Võ Văn Nha, 2009. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có đặc tính probiotic trong tạo chế phẩm nuôi tôm sú. Tạp chí Khoa học và Công nghệ các Trường Đại học Kỹ thuật. 74: 113-116.
- Kongnum, K. and Hongpattarakere, T., 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish and Shellfish Immunology. 32: 170-177.
- Liu, C.H., Chiu, C.S., Ho, P.L and Wang, S.W., 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. Journal of Applied Microbiology. 107: 1031-1041.
- Liu, H., Li, Z., Tan, B., Lao, Y., Duan, Z., Sun, W. and Dong, X., 2014. Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. 41: 300-307.
- Marathe, M.Y. and Ghosh, J.S., 2009. Study of proteinase activity of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2083. International Journal of Genetics and Molecular Biology. 1: 001-005.
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture. 164: 351-358.
- Nguyễn Thị Trúc Linh, Nguyễn Trọng Nghĩa, Đặng Thị Hoàng Oanh và Trương Quốc Phú, 2017. Ảnh hưởng của vi khuẩn lactic bổ sung vào thức ăn lên khả năng kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52B: 122-130.
- Nirunya, B., Suphitchaya, C. and Tipparat, H., 2008. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 30: 141-148.
- Onilude, A.A., Ayinla, G.S. and Eluehike, C., 2017. Properties of alpha-amylase of *Lactobacillus plantarum* isolated from cassava waste samples. Biotechnology Journal International. 19: 1-14.
- Orla-Jensen, S., 1919. The Lactic Acid Bacteria. Andr. Fred. Host and Son, Copenhagen.
- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S., Palta, J., Lauková, A. and Karp, M., 2004. Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances, Journal of Microbiological Methods. 57: 23-31.
- Phạm Minh Tuấn, Nguyễn Thị Hồng Phần và Trần Anh Thư, 2018. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn sinh bacteriocin kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm. Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm. 15: 46-56.
- Sulthoniyah, S.T.M., Hardoko, Nursyam, H., 2015. Characterization of extracellular protease lactic acid bacteria from shrimp paste. Journal of Life Science and Biomedicine. 5: 01-05.
- Tank, P.R., Vadher, K.H. and Patel, M.P., 2018. Isolation of probiotic bacteria from gastrointestinal tract of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and antibacterial activity of probiotic bacteria against *Vibrio* spp. Journal of Entomology and Zoology Studies. 6: 974-978.
- Trần Thị Ngọc Phương và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Sàng lọc các dòng vi khuẩn lactic từ ruột một số loài cá da trơn có tiềm năng sử dụng làm probiotic. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 44B: 76-85.
- VASEP, 2019. Tổng quan ngành thủy sản Việt Nam 2018, truy cập ngày 14/9/2019. Truy cập tại <http://vasep.com.vn/1192/OneContent/tong-quan-nganh.htm>.
- Vieira, F.N., Jatobá, A., Mourinho, J.L.P., et al., 2013. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 48: 998-1004.
- Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture. 269: 259-264.
- Wang, Y.B., Li, J.R. and Lin, J., 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture. 281: 1-4.
- Zokaeifar, H., Balcazar, J.L., Saad, C.R., et al., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fish and Shellfish Immunology. 33: 683-689.