



MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CÓ LỢI CỦA CHỦNG *Weissella cibaria* HN07 PHÂN LẬP TỪ HỆ TIÊU HÓA TÔM CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Trịnh Thị Phương Thảo¹, Lê Mỹ Tiểu Ngọc¹, Nguyễn Văn Khanh²,
Lê Thị Kim Thoa¹, Trần Thúy Lan³, Nguyễn Đức Huy^{3*}

¹Đại học Quốc gia Jeonbuk, 567 Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, Hàn Quốc

²Đại học Quốc gia Jeonbuk, 79 Gobong-ro, Iksan-si, Jeollabuk-do 54596, Hàn Quốc

³Viện công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh Lộ 10, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Đức Huy <ndhuy@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 15-3-2022; Ngày chấp nhận đăng: 8-6-2022)

Tóm tắt. Vi khuẩn lactic (Lactic Acid bacteria – LAB) được sử dụng làm chế phẩm sinh học kích thích tiêu hóa, miễn dịch và là lựa chọn thay thế phù hợp cho thuốc kháng sinh thông thường trong hệ thống nuôi trồng thủy sản. Nghiên cứu này xác định khả năng đối kháng *Vibrio parahaemolyticus* và một số đặc điểm sinh hóa của chủng *Weissella cibaria* HN07 được phân lập từ hệ tiêu hóa của tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Theo đó, chủng vi khuẩn HN07 có khả năng đối kháng mạnh với *V. parahaemolyticus* K5 với đường kính kháng khuẩn đạt 21 mm. Thông qua giải trình tự gen *16S rRNA*, chúng tôi xác định chủng HN07 là *Weissella cibaria*. Kết quả thử khả năng kháng kháng sinh cho thấy *Weissella cibaria* HN07 nhạy cảm với ampicilin và chloramphenicol nhưng lại kháng các loại kháng sinh thuộc nhóm sulfonamides và kanamycin. Đồng thời, kết quả cũng cho thấy *Weissella cibaria* HN07 không làm tan tế bào máu trên môi trường Blood agar chứa 5% máu cừu. Vì vậy, *Weissella cibaria* HN07 là chủng vi khuẩn an toàn và cũng là chủng vi sinh vật tiềm năng để sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong phòng trị bệnh AHPND trên tôm chân trắng.

Từ khóa: đối kháng, probiotic, tôm chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus*, *Weissella cibaria*

Beneficial properties of *Weissella cibaria* HN07 isolated from white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) digestive system

Trình Thị Phương Thảo¹, Le My Tieu Ngoc¹, Nguyen Van Khanh²,
Le Thi Kim Thoa¹, Tran Thuy Lan³, Nguyen Duc Huy^{3*}

¹ Jeonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, Republic of Korea

² Jeonbuk National University, 79 Gobong-ro, Iksan-si, Jeollabuk-do 54596, Republic of Korea

³ Institute of Biotechnology, Hue University, Road No. 10, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Duc Huy <ndhuy@hueuni.edu.vn>

(Submitted: March 15, 2022; Accepted: June 8, 2022)

Abstract. Lactic acid bacteria (LAB) are used as digestive and immune stimulant probiotics and are suitable alternatives to conventional antibiotics in aquaculture systems. In this study, we determine the antagonistic ability of *Vibrio parahaemolyticus* and some biochemical characteristics of the *Weissella cibaria* HN07 strain isolated from the digestive system of white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Accordingly, bacterial strain HN07 has a strong antagonistic ability against *V. parahaemolyticus* K5 with an antibacterial diameter of 21 mm. Through sequencing the 16S rRNA gene, we determined that strain HN07 is *Weissella cibaria*. The results of antibiotic resistance tests show that *Weissella cibaria* HN07 is sensitive to ampicillin and chloramphenicol but resistant to sulfonamides and kanamycin antibiotics. At the same time, the results show that *Weissella cibaria* HN07 does not dissolve blood cells on the Blood agar medium containing 5% sheep blood. Therefore, *Weissella cibaria* HN07 is a safe bacterial strain and a potential microorganism to produce probiotics applied in the prevention and treatment of AHPND on white-leg shrimp.

Keywords: antibacterial activity, probiotic, *Vibrio parahaemolyticus*, *Weissella cibaria*, white-leg shrimp

1 Đặt vấn đề

Tôm chân trắng, *Litopenaeus vannamei*, là một trong những loài thủy sản được nuôi chính ở các nước Châu Á và Châu Mỹ Latinh [1]. Tuy nhiên, các bệnh truyền nhiễm đã xuất hiện và lây lan trên toàn thế giới, gây thiệt hại về kinh tế và đe dọa sản xuất lương thực và nuôi trồng thủy sản bền vững [2]. Đặc biệt, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreatic necrosis disease – AHPND) làm tôm chết hàng loạt trong thời gian rất ngắn, gây thiệt hại nặng nề về kinh tế. *Vibrio parahaemolyticus* chứa hai gen *PirA* và *PirB* mã hóa cho protein độc tố nhị phân PirAB và được xác định là tác nhân chính gây bệnh AHPND [3]. Để quản lý những vấn đề này, người nuôi tôm đã thường xuyên sử dụng thuốc kháng sinh để kiểm soát *V. parahaemolyticus* [4]. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh trên diện rộng có thể gây ra những hậu quả tiêu cực đối với sức khỏe

con người, môi trường sinh thái và đặc biệt là tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn do sự tồn dư của kháng sinh trong sản phẩm thủy sản và môi trường sống của động vật thủy sản [5].

Ngày nay, việc sử dụng chế phẩm sinh học là một chiến lược thay thế để giảm sự bùng phát dịch bệnh cho tôm chân trắng [6]. Theo FAO [7], probiotics là "vi sinh vật sống, khi được sử dụng với lượng thích hợp sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ." Chế phẩm sinh học có khả năng ngăn ngừa bệnh cho tôm [8]. Một số chủng probiotic đã được chứng minh là có tác dụng điều chỉnh hệ vi sinh vật đường ruột và khả năng chống lại mầm bệnh của tôm đối với vi khuẩn gây bệnh [3]. Ngoài ra, chế phẩm sinh học còn cải thiện sự tăng trưởng, sức khỏe của tôm nuôi và chất lượng nước của hệ thống nuôi tôm [9]. Các chủng probiotic được sử dụng nhiều bao gồm vi khuẩn axit lactic (LAB), *Bacillus* sp., nấm men, v.v. [10]. Trong số đó, LAB được chú ý nhiều trong nuôi trồng thủy sản do tác dụng kháng khuẩn mạnh [11].

Vi khuẩn axit lactic là vi khuẩn Gram dương, hình que và thường được tìm thấy trong các thủy vực thủy sinh và cả trong các ao nuôi tôm [12]. Việc lựa chọn LAB không chỉ nhờ vào khả năng đối kháng mạnh mà còn khả năng phát triển của vi khuẩn trong niêm mạc của vật chủ [13]. Trong những năm gần đây, một số nghiên cứu cho rằng các vi sinh vật phân lập từ đường tiêu hóa phù hợp và hiệu quả hơn các chủng từ các nguồn khác vì chúng thích nghi tốt với môi trường đường tiêu hóa [14]. Theo Sha và cs., việc bổ sung *Enterococcus faecium* NRW-2 phân lập từ đường ruột của loài tôm nưong (*Fenneropenaeus chinensis*) có thể ức chế thành công sự phát triển của *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 [12]. Kanjan và cs. đã phân lập được chủng *Weissella cibaria* KY10 có nguồn gốc từ đường tiêu hóa của tôm chân trắng khỏe mạnh có tác dụng kháng khuẩn mạnh chống lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus* T.11 gây bệnh AHPND ở tôm [15]. Do đó, phân lập và chọn lọc LAB từ ruột tôm là một cách tiếp cận tiềm năng để thu được lợi khuẩn thích nghi tốt. Loại LAB này được sử dụng như một tác nhân kiểm soát sinh học hiệu quả với mức độ ức chế cao đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Mục đích của nghiên cứu này là xác định khả năng đối kháng của LAB phân lập từ hệ tiêu hóa của tôm với chủng *V. parahaemolyticus* mang gen độc tố nhĩ phân. Bên cạnh đó, chủng này được nghiên cứu thêm các đặc điểm sinh hóa và tính an toàn để xác định tiềm năng tạo chế phẩm sinh học ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Chủng vi khuẩn lactic, ký hiệu là HN07 từ bộ sưu tập LAB phân lập từ ruột tôm chân trắng (*L. litopenaeus*) tại tỉnh Thừa Thiên Huế, được bảo quản ở $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong môi trường de Man, Rogosa và Sharpe (MRS, Merck, Đức) và bổ sung glycerol (25% v/v) [16].

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* K5 mang hai gen độc tố *PirA* và *PirB* được xác định là tác nhân gây bệnh AHPND trên tôm chân trắng nuôi tại huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế [17].

2.2 Xác định khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*

Chủng HN07 được sàng lọc khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn chỉ thị *V. parahaemolyticus* K5 bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch có một vài điều chỉnh nhỏ [18]. Dịch huyền phù của dòng chỉ thị được nhân sinh khối và điều chỉnh để đạt mật độ 10^8 tế bào/mL. 50 μL dịch nuôi cấy được cấy trải lên môi trường LB đã hấp khử trùng. Các giếng với đường kính 6 mm được tạo trên trên mặt môi trường bằng thanh kim loại vô trùng. Vi khuẩn lactic được nhân sinh khối trong 5 mL môi trường MRS, lắc với tốc độ 180 vòng/phút ở $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong máy lắc Innova 4230 Refrigerated Benchtop Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Mỹ). Sau 24 giờ nuôi cấy, mật độ tế bào được điều chỉnh đến mật độ 10^8 tế bào/mL và ly tâm với tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 phút ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ để loại bỏ tế bào bằng máy ly tâm HERMLE Z 216 MK (HERMLE Labortechnik, Đức). 50 μL dung dịch sau ly tâm được cho vào từng giếng trên đĩa thạch đã chứa vi khuẩn chỉ thị. Mẫu được ủ ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút đến khi dung dịch trong giếng khuếch tán đều. Sau đó, đĩa được tiếp tục ủ ở $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ và kiểm tra đường kính vòng vô khuẩn (zone diameter of inhibition – ZDI) xuất hiện trên bề mặt đĩa.

Mức độ đối kháng được đánh giá dựa vào ZDI: không đối kháng khi $\text{ZDI} = 0\text{ mm}$; đối kháng yếu khi $0 < \text{ZDI} \leq 10\text{ mm}$; đối kháng trung bình khi $11 < \text{ZDI} \leq 14\text{ mm}$; đối kháng mạnh khi $\text{ZDI} \geq 15\text{ mm}$ [19].

2.3 Định danh phân tử

Việc xác định phân tử của dòng phân lập được thực hiện bằng cách giải trình tự đoạn 16S *rRNA*. Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong 5 mL môi trường MRS ở $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 18 giờ. Sinh khối tế bào được thu bằng cách ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 5 phút. DNA tổng số được tách chiết bằng cách sử dụng cetyl trimethyl ammonium bromide theo Sambrook [20]. Sau khi kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8%, DNA tổng số được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR khuếch đại trình tự 16S *rRNA*

bằng cặp mỗi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Sản phẩm PCR được giải trình tự nucleotide tại công ty Firstbase (Malaysia) theo phương pháp Sanger bằng máy giải trình tự gen Applied Biosystems® Genetic Analyzers. Trình tự nucleotide được so sánh đối chiếu với dữ liệu trên Genbank. Cây phát sinh loài được xây dựng sử dụng phần mềm MEGA 11 [21].

2.4 Khả năng chịu mặn

Khuẩn lạc vi khuẩn từ môi trường MRS agar trên đĩa Petri được cấy chuyển vào 5 mL môi trường MRS và tiến hành nuôi cấy ở 37 °C trong 48 giờ. Sinh khối sau khi nuôi cấy được thu nhận bằng cách ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút ở 4 °C trong 5 phút. Sinh khối được tiếp tục tái huyền phù trong nước muối sinh lý và điều chỉnh để OD_{600nm} = 1. Sau đó, tiến hành phân phối vào mỗi ống Ependoff 100 µL huyền phù và 900 µL môi trường MRS bổ sung thêm NaCl ở các nồng độ 0, 5, 10, 15 và 20% (w/v). Đo OD_{600nm} tại các thời điểm 0 và 48 giờ ở 37 °C [22].

2.5 Khả năng kháng kháng sinh

Khả năng kháng kháng sinh của chủng vi khuẩn được nghiên cứu bằng cách nuôi khuẩn lạc trên 5 mL môi trường MRS có bổ sung 25, 50, 100, 250, 500 µg·mL⁻¹ kháng sinh (sulfapiridine, sulfathiazole, sulfamethoxazole, oxytetracyclin hydrochloride và chlortetracyclin hydrochloride) và đối chứng không bổ sung kháng sinh ở 37 °C trong 24 giờ. Mật độ tế bào được xác định bằng cách đo tại OD_{600nm}.

2.6 Xác định hoạt tính tan máu

Để đánh giá hoạt tính tan máu, chủng phân lập được cấy ria trên môi trường Blood agar chứa 5% máu cừu. Sau đó, đĩa được ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Hoạt tính tan máu được xác định dựa vào vòng phân giải tan máu xuất hiện xung quanh khuẩn lạc trên môi trường chứa máu cừu [23].

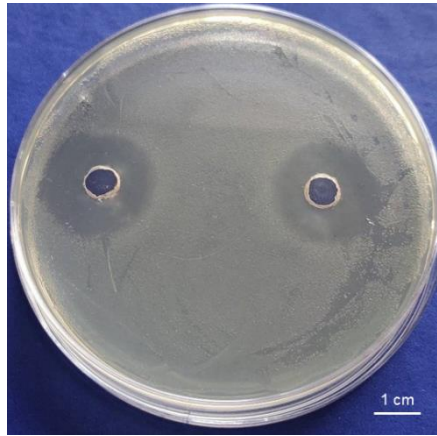
2.7 Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được bố trí lặp lại ba lần. Số liệu thực nghiệm được xử lý trên phần mềm SPSS 16.0.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Thử nghiệm khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus*

Kết quả cho thấy, chủng HN07 có khả năng đối kháng mạnh với *V. parahaemolyticus* K5 với đường kính đối kháng ZDI = 21 mm (Hình 1). Linh và cs. đã phân lập được 51 chủng LAB từ ruột

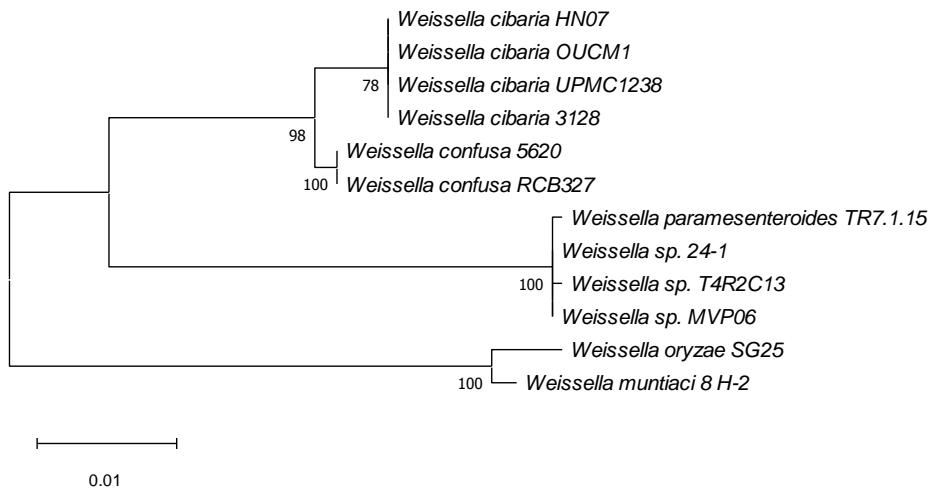


Hình 1. Vòng đôi kháng *V. parahaemolyticus* của chủng HN07

tôm chân trắng (*Penaeus vannamei*). Các chủng này có đường kính kháng *V. parahaemolyticus* từ 6 đến 18 mm [24]. Kanjan và cs. đã phân lập được 106 khuẩn lạc LAB từ hệ tiêu hóa tôm, trong đó mười chủng phân lập có khả năng ức chế đối với *V. parahaemolyticus* T.11 với đường kính kháng khuẩn lớn hơn 15 mm. Trong số này, chủng *W. cibaria* KY10 có hoạt tính kháng khuẩn lớn nhất là 18 mm [15]. Do đó, chủng HN07 trong nghiên cứu này có khả năng đối kháng mạnh hơn với *V. parahaemolyticus* so với các chủng LAB phân lập ở ruột tôm trong nghiên cứu trước đây.

3.2 Định danh phân tử

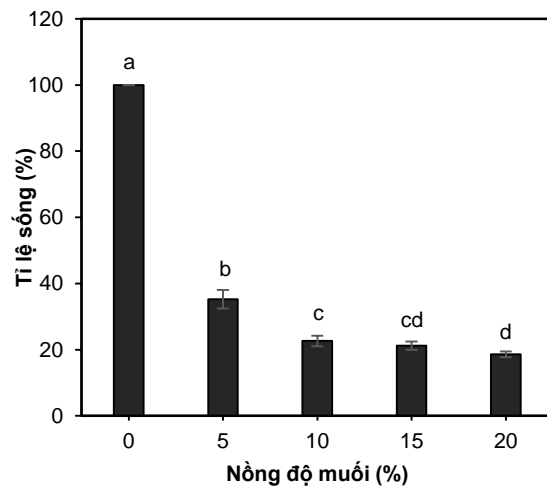
Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong 5 mL môi trường MRS ở 30 °C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 18 giờ. Sau đó, sinh khối tế bào được thu và tách chiết DNA làm khuôn mẫu để khuếch đại trình tự *16S rRNA*. Sản phẩm PCR được giải trình tự nucleotide thông qua công ty Firstbase (Malaysia). Trình tự *16S rRNA* của chủng HN07 được so sánh với các chủng vi khuẩn khác bằng phân tích BLAST trong cơ sở dữ liệu NCBI. Kết quả phân tích BLAST cho thấy trình tự của chủng này có tính tương đồng cao (100%) với các chủng *W. cibaria* khác. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự của gen *16S rRNA* được trình bày trên Hình 2. Chủng HN07 được xác định là *W. cibaria* HN07 (mã số: MK990004).



Hình 2. Cây phát sinh loài của chủng *W. cibaria* HN07 và một số loài *Weissella* khác trên Genbank

3.3 Khả năng chịu mặn

Để đánh giá khả năng chịu mặn, chủng *W. cibaria* HN07 được nuôi cấy trong môi trường MRS bổ sung nồng độ muối 5, 10, 15 và 20%. Kết quả cho thấy nồng độ muối càng cao thì tỉ lệ sống của chủng này càng giảm (Hình 3). Ở nồng độ muối 5%, tỉ lệ sống là 35,23%, nhưng ở nồng độ muối 20% chỉ còn là 16,82%. Các chủng *W. cibaria* trong nghiên cứu của Lee và cs. chỉ có khả năng phát triển ở nồng độ muối thấp khoảng 3%, còn ở nồng độ muối cao hơn các chủng này bị ức chế hoàn toàn [25].



Hình 3. Khả năng chịu mặn của *W. cibaria* HN07. Các chữ cái khác nhau cho biết sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

3.4 Khả năng kháng kháng sinh

Khả năng kháng kháng sinh của chủng *W. cibaria* HN07 được đánh giá trên các loại kháng sinh khác nhau ở nồng độ 25, 50, 100, 250 và 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Các thử nghiệm cho thấy chủng *W. cibaria* HN07 sinh trưởng tốt trên môi trường không có kháng sinh. Bên cạnh đó, *W. cibaria* HN07 phát triển tốt khi có sulfapyridine, sulfathiazole, sulfamethoxazole và kanamycin. Trong khi đó, oxytetracycline hydrochloride và chlortetracycline hydrochloride có khả năng ức chế *W. cibaria* HN07 ở nồng độ $\geq 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ampicillin và chloramphenicol ức chế hoàn toàn *W. cibaria* HN07 ở nồng độ 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Bảng 1). Trong nghiên cứu đánh giá tính an toàn của probiotic *W. cibaria*, chủng *W. cibaria* JW15 thể hiện khả năng kháng mạnh với kanamycin và vancomycin trong khi nhạy cảm với ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamicin, streptomycin và tetracycline [26].

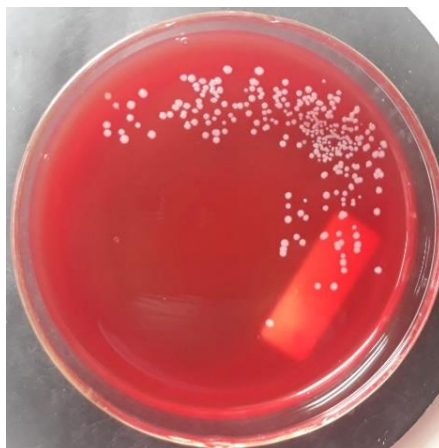
3.5 Hoạt tính tan máu

Hemolysin là một enzyme độc của vi khuẩn gây bệnh như *Bacillus cereus* và có hoạt tính tan máu để phá hủy hồng cầu trong cơ thể vật chủ, cũng như có khả năng gây phù và thiếu máu [27, 28]. Nói chung, β -hemolysis có liên quan đến khả năng gây bệnh của vi sinh vật. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chủng *W. cibaria* HN07 không cho thấy hoạt tính tan máu β (Hình 4). Do đó, chủng *W. cibaria* HN07 được coi là chủng an toàn. Kết quả này tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây: các chủng *W. cibaria* CMU và *W. cibaria* JW15 đều không thể hiện hoạt tính tan máu trên môi trường bổ sung 5% máu cừu [23, 26].

Bảng 1. Thử nghiệm khả năng kháng kháng sinh của *W. cibaria* HN07

Kháng sinh	Nồng độ kháng sinh ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	500	250	100	50	25
Sulfapyridine	+	+	+	+	+
Sulfathiazole	+	+	+	+	+
Sulfamethoxazole	+	+	+	+	+
Oxytetracyclin hydrochloride	-	-	-	+	+
Chlotetracyclin hydrochloride	-	-	-	+	+
Ampicilin	-	-	-	-	-
Kanamycin	+	+	+	+	+
Chloranphenicol	-	-	-	-	-

Chú thích: - không phát triển; + có phát triển



Hình 4. Thử nghiệm hoạt tính tan máu của *W. cibaria* HN07 trên môi trường Blood agar

4 Kết luận

Chủng vi khuẩn HN07 có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* K5. Chủng này thuộc loài *W. cibaria*, được đặt tên là *W. cibaria* HN07, và đã được đăng ký trên Genbank với mã số: MK990004. *W. cibaria* HN07 có khả năng tồn tại ở nồng độ muối cao lên tới 20%.

W. cibaria HN07 có khả năng kháng một số loại kháng sinh thuộc nhóm sulfonamides và kanamycin. Trong khi đó, nó lại nhạy cảm với ampicillin và chloramphenicol. *W. cibaria* HN07 không thể hiện hoạt tính tan máu β và đây là chủng vi khuẩn an toàn.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được tài trợ từ Bộ Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ, mã số: CT-2018-DHH-06, và Đại học Huế qua chương trình phát triển nhóm nghiên cứu mạnh Đại học Huế, mã số: NCM.DHH.2020.11.

Tài liệu tham khảo

1. Gao, W., Tian, L., Huang, T., Yao, M., Hu, W., Xu, Q. (2016), Effect of salinity on the growth performance, osmolarity and metabolism-related gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture Reports*, 4, 125–9.

2. Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Vinu Salachan, P., Sritunyalucksana, K., et al. (2016), Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia, *Aquaculture research*, 452, 69–87.
3. Imaizumi, K., Tinwongger, S., Kondo, H., Hirono, I. (2021), Analysis of microbiota in the stomach and midgut of two penaeid shrimps during probiotic feeding, *Scientific Reports*, 11(1), 9936.
4. De Melo, L. M., Almeida, D., Hofer, E., Dos Reis, C. M., Theophilo, G. N., Santos, A. F., et al. (2011), Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in natal, brazil, *Braz J Microbiol*, 42(4), 1463–9.
5. Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dolz, H., Millanao, A., et al. (2013), Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health, *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917–42.
6. Nguyễn Thị Thúy, Nguyễn Thị Minh Xuân (2020), Phân lập các chủng probiotics có khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*, 19(4.2), 58–63.
7. FAO/WHO (2002), *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Joint FAO/WHO Working Group Meeting: London Ontario, Canada.*
8. Kumar, V., Roy, S., Meena, D. K., Sarkar, U. K. (2016), Application of probiotics in shrimp aquaculture: Importance, mechanisms of action, and methods of administration, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 24, 342–68.
9. Kewcharoen, W., Srisapoom, P. (2019), Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains), *Fish and Shellfish Immunology*, 94, 175–89.
10. Cai, Y., Yuan, W., Wang, S., Guo, W., Li, A., Wu, Y., et al. (2019), *In vitro* screening of putative probiotics and their dual beneficial effects: To white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae and to the rearing water, *Aquaculture Reports*, 498, 61–71.
11. Meidong, R., Nakao, M., Sakai, K., Tongpim, S. (2021), *Lactobacillus paraplantarum* L34b-2 derived from fermented food improves the growth, disease resistance and innate immunity in *Pangasius bocourti*, *Aquaculture*, 531,735878.
12. Sha, Y., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Xin, F., Wang, B. (2016), Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture*, 452, 28–36.

13. Khan, M. I. R., Choudhury, T. G., Kamilya, D., Monsang, S. J., Parhi, J. (2020), Characterization of *Bacillus* spp. isolated from intestine of *Labeo rohita* - Towards identifying novel probiotics for aquaculture, *Aquaculture Research*, 52, 822–30.
14. Mortezaei, F., Royan, M., Allaf Noveirian, H., Babakhani, A., Alaie Kordghashlaghi, H., Balcazar, J. L. (2020), In vitro assessment of potential probiotic characteristics of indigenous *Lactococcus lactis* and *Weissella oryzae* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*), *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 1004–19.
15. Kanjan, P., Kimtun, A., Chaimongkol, S., Sakpetch, P. (2022), Probiotic *Weissella cibaria* KY10 derived from digestive tract of healthy shrimp exhibits strong antibacterial effects against *Vibrio parahaemolyticus* causing AHPND in shrimp, *Aquaculture research*, 1–11.
16. Huy, N., Ngoc, L., Loc, N., Lan, T., Quang, H., Dung, T., et al. (2020), Isolation of *Weissella cibaria* from Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gastrointestinal tract and evaluation of Its pathogenic bacterial inhibition, *Indian Journal of Science and Technology*, 13(10), 1200–12.
17. Nguyễn Văn Khanh, Nguyễn Quang Linh, Trần Thúy Lan, Lê Thị Tuyết Nhân, Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Thị Kim Co, et al. (2019), Phân lập và sàng lọc các chủng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng nuôi tại Phong Điền, Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 128(1E), 47–58.
18. Iyapparaj, P., Maruthiah, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Kumar, C., Immanuel, G., et al. (2013), Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens, *Aquatic Biosystems*, 9(1), 12.
19. Tagg, J. R., McGiven, A. R. (1971), Assay system for bacteriocins, *Journal of Applied Microbiology*, 21(5), 943.
20. Sambrook, J., Maccallum, P., Russell, D., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press: NY2001.
21. Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021), MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–7.
22. Kobayashi, T., Kajiwara, M., Wahyuni, M., Hamada-Sato, N., Imada, C., Watanabe, E. (2004), Effect of culture conditions on lactic acid production of *Tetragenococcus* species, *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1215–21.
23. Kang, M. S., Yeu, J. E., Hong, S. P. (2019), Safety evaluation of oral care probiotics *Weissella cibaria* CMU and CMS1 by phenotypic and genotypic analysis, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11).
24. Linh, N. T. T., Phong, H. T., Nghia, N. T., Oanh, D. T. H, Phu, T. Q. (2017), Isolation and selection of lactic acid bacteria that can antagonize *Vibrio parahaemolyticus* causing acute

hepatopancreatic necrosis disease in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*), *Can Tho University Journal of Science*, 7, 74–81.

25. Lee, K. W., Park, J. Y., Jeong, H. R., Heo, H. J., Han, N. S., Kim, J. H. (2012), Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces, *Anaerobe*, 18(1), 96–102.
26. Jang, Y-J., Gwon, H-M., Jeong, W-S., Yeo, S-H., Kim, S-Y. (2021), Safety evaluation of *Weissella cibaria* JW15 by phenotypic and genotypic property analysis, *Microorganisms*, 9(12), 2450.
27. Vitetta, L., Coulson, S., Thomsen, M., Nguyen, T., Hall, S. (2017), Probiotics, D-Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity, *Gut Microbes*, 8, 311–22.
28. Kim, M. J., Ku, S., Kim, S. Y., Lee, H. H., Jin, H., Kang, S., et al. (2018), Safety evaluations of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1422.