

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN SINH BACTERIOCIN KHÁNG *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* GÂY BỆNH TRÊN TÔM

Phạm Minh Tuấn*, Nguyễn Thị Hồng Phấn, Trần Anh Thư

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: pmtuan@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 16/6/2017; Ngày chấp nhận đăng: 18/5/2018

TÓM TẮT

Hội chứng chết sớm (Early Mortality Syndrome - EMS) hay hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) được xem là một bệnh nguy hiểm trên tôm đã ảnh hưởng đến nhiều trang trại nuôi tôm trong khu vực Đông Nam Á. Nó được phát hiện ở miền nam Trung Quốc, lần đầu tiên được báo cáo vào năm 2009 và sau đó ở các nước khác như Việt Nam, Thái Lan và Malaysia. Việc phân lập vi khuẩn lactic và *Bacillus* từ các nguồn mẫu rau cải muối chua, ruột động vật thủy sản và mẫu nước thu từ tự nhiên được đánh giá có khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm. Khi khảo sát khả năng đối kháng của 47 chủng vi khuẩn lactic và 133 chủng vi khuẩn *Bacillus* bằng phương pháp pha loãng canh trường và khuếch tán trên đĩa thạch, kết quả phân lập và sàng lọc thu được 11/180 chủng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Chủng *Bacillus* sp. BV1 với khả năng đối kháng mạnh nhất (tỷ lệ kháng 85,6%, hoạt tính bacteriocin là 4222,820 AU/mL) được tuyển chọn vào thử nghiệm xác định khả năng đối kháng trên tôm thẻ chân trắng. Tỷ lệ sống sót của tôm ở nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. BV1 với mật độ 10^4 và 10^6 CFU/mL lần lượt đạt 85% và 90% so với nghiệm thức đối chứng trong 9 ngày thử nghiệm.

Từ khóa: Vi khuẩn lactic, *Bacillus*, bacteriocin, *Vibrio parahaemolyticus*, EMS/AHPND

1. MỞ ĐẦU

Mỗi năm ngành công nghiệp tôm tổn thất hơn 1 tỷ USD do ảnh hưởng của Hội chứng hoại tử gan tụy cấp (EMS/AHPND) ở tôm, một bệnh mới xuất hiện bị gây ra chủ yếu bởi vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* [1]. Ở Việt Nam, dịch bệnh này đã được phát hiện từ năm 2010, nhưng thiệt hại lớn do EMS chỉ được báo cáo kể từ tháng 3 năm 2011 ở Đồng bằng sông Cửu Long. Nó ảnh hưởng đến khu vực sản xuất tôm của nhiều tỉnh trong vùng như Sóc Trăng, Bạc Liêu và Trà Vinh, với diện tích thiệt hại ước tính khoảng 40.000 ha [2].

Việc điều trị bằng kháng sinh và hóa chất có thể tiêu diệt phần lớn các vi khuẩn có lợi trong nước ao nuôi tôm, chứ không chỉ các vi khuẩn gây bệnh. Bên cạnh đó, dư lượng kháng sinh và hóa chất còn lại gây ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm và sức khỏe người sử dụng [1]. Trong nuôi trồng thủy sản, việc sử dụng các chủng vi khuẩn lactic và *Bacillus* spp. có khả năng tạo ra kháng sinh sinh học (bacteriocin - một loại protein do vi sinh vật sinh ra dùng để ức chế các vi sinh vật khác) được đánh giá là một giải pháp mới, có thể ứng dụng để kiểm soát các bệnh do vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra [3-5]. Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu phân lập, tuyển chọn, đánh giá khả năng kiểm soát của các chủng vi sinh vật đối với vi khuẩn gây bệnh trên tôm [3, 6-9]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về đối kháng đối tượng gây bệnh chết sớm trên tôm theo cơ chế tạo ra bacteriocin. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng sinh bacteriocin ức chế *Vibrio*

parahaemolyticus, hướng tới sản xuất chế phẩm sinh học phòng và trị bệnh EMS cho tôm, góp phần xây dựng ngành nuôi trồng thủy sản bền vững.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn lactic, vi khuẩn *Bacillus* được phân lập từ các sản phẩm rau cải muối chua, ruột thủy sản và mẫu nước thu từ tự nhiên.

Các chủng đã được định danh gồm 6 chủng vi khuẩn lactic và 68 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. được cung cấp bởi công ty cổ phần Công nghệ sinh học Tiên Phong (Lô 23 đường Tân Tạo, KCN Tân Tạo, Q.Bình Tân, Tp.HCM).

Chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633 strain O3:K6 phân lập từ tôm bệnh AHPND đã được định danh và xác định có độc tính, cung cấp từ công ty cổ phần Công nghệ sinh học Tiên Phong.

2.2. Phân lập vi khuẩn lactic và *Bacillus*

Từ các nguồn mẫu đã chọn, tiến hành đồng nhất mẫu (1 g hoặc 1 mL mẫu + 10 mL nước muối sinh lý 0,9%) và pha loãng thập phân đến nồng độ 10^{-9} bằng nước muối sinh lý 0,9%. Hút 0,1 mL dịch mẫu ở nồng độ 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} hoặc 0,1 mL nước (sông, ao nuôi) ở nồng độ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} cho vào đĩa petri chứa sẵn môi trường De Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA) đối với vi khuẩn lactic và môi trường Nutrient Agar (NA) đối với vi khuẩn *Bacillus* [10, 11]. Ủ trong tủ ấm ở 37 °C trong 48 giờ đối với vi khuẩn lactic và 24 giờ đối với vi khuẩn *Bacillus*. Mỗi nồng độ pha loãng tiến hành lặp lại 3 lần. Kiểm tra hình thái khuẩn lạc đặc trưng của vi khuẩn lactic và vi khuẩn *Bacillus* [12, 13].

Sau khi kiểm tra hình thái, một số thử nghiệm được thực hiện để xác định sơ bộ các chủng vi khuẩn lactic và *Bacillus* như: nhuộm Gram, xác định sự hình thành bào tử, thử nghiệm catalase, thử nghiệm oxidase, khảo sát khả năng di động, khả năng sinh acid lactic phân giải CaCO_3 [14-18].

2.3. Khảo sát khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*

Tiến hành tăng sinh vi khuẩn lactic trong môi trường MRS trong 48 giờ, tăng sinh vi khuẩn *Bacillus* ở môi trường Nutrient Broth (NB) trong 24 giờ. Sau đó ly tâm ở tốc độ 11000 vòng/phút trong 15 phút để tách cặn khuẩn. Dịch sau ly tâm được lọc qua màng lọc 0,2 μm trong điều kiện vô trùng để loại bỏ tế bào còn sót lại [19]. Điều chỉnh pH của dịch vi khuẩn lactic bằng dung dịch NaOH 1N đến pH 6,5 [10].

Hút 1 mL dịch vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (mật độ khoảng 10^{10} CFU/mL) cho vào môi trường NB (có bổ sung 1,5% NaCl), ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 24 giờ để tăng sinh.

2.3.1. Phương pháp pha loãng canh trường (Broth-Dilution Method)

Hút 100 μL dịch sau lọc và trung hòa pH cho vào mỗi ống thử đối kháng, sau đó cho vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* vào ống sao cho mật độ là 10^7 CFU/mL [20]. Mẫu đối chứng (-) không bổ sung vi khuẩn. Mẫu đối chứng (+) không bổ sung dịch sau lọc và trung hòa pH. Ủ ở 37 °C qua đêm rồi quan sát kết quả. Khả năng kháng khuẩn được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 600 nm. Khi tỷ lệ đối kháng lớn hơn hoặc bằng 50% thì được xem là ức chế tích cực [21]. Tỷ lệ đối kháng được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ đối kháng} = \frac{\text{OD}_{600, \text{ĐC}(+)} - \text{OD}_{600, \text{ĐK}}}{\text{OD}_{600, \text{ĐC}(+)}} \times 100 (\%)$$

Trong đó:

$\text{OD}_{600, \text{ĐC}(+)}$: mật độ quang ở bước sóng 600 nm của ống đối chứng dương

$\text{OD}_{600, \text{ĐK}}$: mật độ quang ở bước sóng 600 nm của ống đối kháng

2.3.2. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Agar Well Diffusion)

Đục lỗ với đường kính 6 mm trên bề mặt đĩa thạch. Hút 0,1 mL canh trường vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trải đều lên bề mặt thạch NA 1,5% NaCl. Hút 100 μL dịch sau lọc và trung hòa pH cho vào mỗi lỗ. Ủ đĩa ở 37 °C qua đêm rồi quan sát kết quả. Khả năng kháng khuẩn được xác định bằng sự hiện diện của vòng kháng khuẩn. Nếu đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn hoặc bằng 6 mm thì được xem là có khả năng ức chế [22].

$$\text{dkk} = D - d_i$$

Trong đó:

dkk: đường kính vòng kháng khuẩn xung quanh lỗ (mm)

D: đường kính vòng ức chế (bao gồm đường kính lỗ) (mm)

d_i : đường kính lỗ (mm)

2.3.3. Xác định hoạt tính bacteriocin

Tiến hành thí nghiệm như phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (mục 2.3.2). Một đơn vị hoạt tính của bacteriocin (AU) được định nghĩa là 1 đơn vị diện tích của vùng ức chế (mm^2) mà 1 mL dịch thử nghiệm tạo ra [23]. Công thức tính:

$$\text{AU/mL} = \frac{L_z - L_s}{V}$$

Trong đó: L_z : diện tích vòng kháng khuẩn (mm^2); L_s : diện tích lỗ (mm^2); V: thể tích mẫu (mL)

2.4. Xác định cơ chế đối kháng

Để xác định bản chất của yếu tố kháng khuẩn do chủng đối kháng sinh ra, canh trường nuôi cấy của chủng vi khuẩn đối kháng được xử lý như trên: ly tâm và lọc để tách tế bào, trung hòa pH về 6,5 (mục 2.3). Tiếp theo đó dịch sau lọc và trung hòa pH được xử lý với proteinase K (Promega, Madison, WI, USA): 5 mL dịch + 1 mL proteinase K ở nồng độ 1 mg/mL, ủ ở 37 °C trong 2 giờ, sau đó đun nóng ở 100 °C trong 3 phút để biến tính enzyme [24]. Mẫu được kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp pha loãng canh trường và khuếch tán trên đĩa thạch.

2.5. Khả năng đối kháng của vi khuẩn tuyển chọn thử nghiệm trên tôm

Thử nghiệm đối kháng bổ sung *Vibrio parahaemolyticus* ở mật độ 10^8 CFU/mL nước nuôi tôm và chủng vi khuẩn được tuyển chọn (BV1) ở hai mật độ tương ứng 10^4 và 10^6 CFU/mL nước nuôi tôm cho mỗi nghiệm thức [25, 26]. Mẫu đối chứng (-) không bổ sung vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Mẫu đối chứng (+) bổ sung vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mật độ 10^8 CFU/mL nước nuôi tôm.

Tôm khỏe mạnh 12 ngày tuổi được cung cấp bởi công ty cổ phần CNSH Tiên Phong và các thí nghiệm được tiến hành tại cùng một địa điểm. Khôi lượng tôm thí nghiệm dao động

trong khoảng 0,005 – 0,010 g/con, có thể được xem như không có sự sai khác về kích thước giữa các nhóm tôm. Điều kiện chăm sóc quản lý tôm trong các bể là như nhau trong thời gian thí nghiệm. Phân bố ngẫu nhiên 160 con trong 8 bể (20 con/bể) chứa 5 lít nước biển có độ mặn ở khoảng 15‰. Nuôi tôm thích nghi với điều kiện sống 2 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm.

Các thông số hóa lý của nước nuôi tôm được đo bằng bộ kit SERA (NO₂ Test Kit–Germany, NH₄/NH₃ Test Kit–Germany, kH Test Kit–Germany), sử dụng máy quang phổ so màu (Spectro-V11D, MRC, Israel) ở bước sóng 548 nm (NO₂⁻), 640 nm (NH₄⁺).

Mỗi nghiệm thức lặp lại 2 lần. Kiểm tra 2 ngày/lần trong thời gian thử nghiệm. Theo dõi các chỉ tiêu môi trường, vi sinh và tỷ lệ sống sót.

$$\text{Tỷ lệ sống sót} = \frac{\text{Số lượng lúc sau}}{\text{Số lượng ban đầu}} \times 100 (\%) [27]$$

2.6. Phân tích thống kê

Các số liệu thu thập được tính toán và thống kê mô tả bằng Microsoft Excel 2010. Số liệu được so sánh thống kê ANOVA nhiều nhân tố sử dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$). Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bằng Statgraphics Centurion XVI.II.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn lactic và *Bacillus*

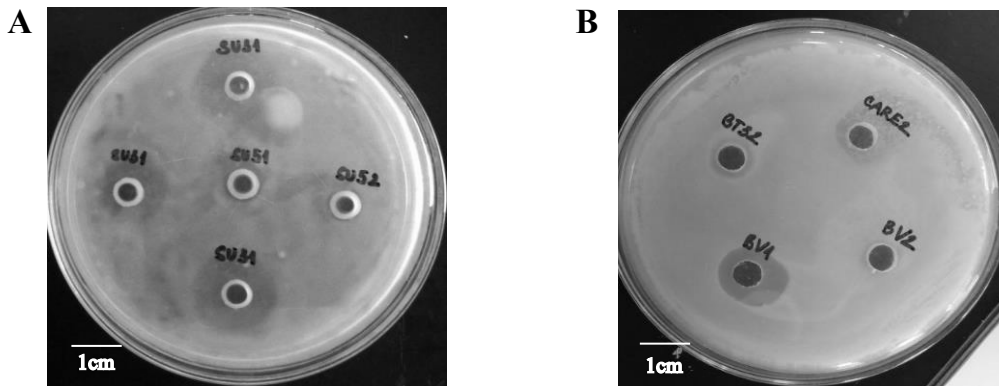
Từ hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn lactic điển hình theo mô tả của Kandler và Weiss như tròn, trắng, bờ đều đã quan sát đại thể và lựa chọn được 47 chủng từ 9 nguồn mẫu nuôi cấy trên môi trường MRS [12]. Trong đó, các chủng phân lập từ rau cải muối chua (5/47), từ ruột thủy sản chiếm nhiều hơn (42/47). Kết quả kiểm tra các đặc tính sinh hóa cho thấy 41 dòng vi khuẩn Gram dương, có khả năng sinh acid lactic, catalase (-), không di động, pH dịch nuôi cấy trung bình 3,69-4,52.

Từ hình thái khuẩn lạc đặc trưng cho vi khuẩn *Bacillus* như rìa nhăn, không đều, nhẵn bóng hoặc khô mịn, màu từ trắng trong đến vàng nhạt [13]. Quan sát đại thể và tuyển chọn 70 chủng từ 5 nguồn mẫu phân lập trên môi trường NA. Trong đó, các chủng từ sản phẩm ruột thủy sản (48/70) và các chủng từ mẫu nước thu từ tự nhiên (22/70). Sau khi kiểm tra các đặc tính sinh hóa, tuyển chọn được 65 chủng vi khuẩn có hình thái giống với *Bacillus*, là những trực khuẩn bất màu Gram dương, ngắn hoặc dài, có bào tử ngắn hơn tế bào sinh dưỡng [28].

3.2. Khảo sát khả năng đối kháng *Vibrio parahaemolyticus*

Trong 47 chủng vi khuẩn lactic (41 chủng phân lập và 6 chủng được cung cấp từ Công ty cổ phần CNSH Tiên Phong), qua khảo sát chỉ có 2 chủng SU31 và SU41 thể hiện hoạt tính kháng đối với *Vibrio parahaemolyticus* sau 3 lần lặp thí nghiệm bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và pha loãng canh trường. Cụ thể, chủng vi khuẩn lactic SU31 được phân lập từ ruột tôm sú có tính kháng khuẩn mạnh với tỷ lệ kháng 63,7%, hoạt tính kháng khuẩn là 2487,090 AU/mL. Đặc tính kháng khuẩn của 2 chủng vi khuẩn có nguồn gốc từ ruột tôm sú này (SU31 và SU41) được trình bày trong Bảng 1. Vi khuẩn lactic thể hiện được khả năng đối kháng là do chúng có thể sinh ra các chất có tính kháng khuẩn như acid lactic, CO₂, H₂O₂, diacetyl và đặc biệt là bacteriocin [29]. Ảnh hưởng của acid lactic đã được loại bỏ khi các thí nghiệm đối kháng đều được thực hiện với canh trường đã trung hòa pH.

Vì vậy, để xác định yếu tố kháng khuẩn có phải là bacteriocin hay không, canh trường sau loại bỏ tế bào và trung hòa pH sẽ được xử lý với enzyme proteinase K trước khi thử đối kháng.



Hình 1. Kết quả đối kháng của một số chủng vi khuẩn phân lập được (A. Vi khuẩn lactic; B. Vi khuẩn *Bacillus*) đối với *Vibrio parahaemolyticus*.

Kiểm tra tính kháng khuẩn với *Vibrio parahaemolyticus* của 133 chủng vi khuẩn *Bacillus* (65 chủng phân lập và 68 chủng đã định danh), có 9 chủng (CARE2, BT32, BSU11, BSU21, BSU22, BSU51, BSU63, BA21, BV1) thể hiện đặc tính đối kháng *Vibrio parahaemolyticus* sau 3 lần lặp thí nghiệm bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và pha loãng canh trường. Trong đó, BA21 và BV1 có đặc tính kháng khuẩn vượt trội. Khả năng kháng khuẩn của các chủng được trình bày trong Bảng 2. Chủng vi khuẩn BV1 phân lập từ nước sông có tính kháng khuẩn mạnh nhất với tỷ lệ kháng 85,6%, hoạt tính bacteriocin là 4222,820 AU/mL. Bên cạnh đó, chủng BA21 phân lập từ nước ao nuôi tôm cũng thể hiện tỷ lệ kháng cao 77,1%, 7 chủng còn lại biểu hiện tính kháng khuẩn ở mức thấp hơn 34,5– 58,8%.

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

| Tên chủng | Nguồn gốc | Đối kháng lỏng | Đối kháng trên đĩa thạch | |
|-----------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| | | Kết quả đo OD _{600nm} | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) | Hoạt tính bacteriocin (AU/mL) |
| SU31 | Phân lập từ ruột tôm sú | 64,29 ± 2,06 | 12,67 ± 1,50 | 2487,09 ± 420,72 ^a |
| SU41 | Phân lập từ ruột tôm sú | 46,43 ± 3,57 | 7,33 ± 0,50 | 1115,25 ± 70,69 ^b |

^{a, b}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Ở nghiên cứu này, những chủng vi khuẩn phân lập từ nước sông và nước ao nuôi tôm có tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* mạnh hơn các chủng phân lập từ các nguồn khác. Mẫu nước thu từ tự nhiên là nguồn nước hỗn hợp của nước ngọt và nước mặn. Vì thế, sự khác biệt lớn về độ mặn được cho rằng các loài vi khuẩn phát triển mạnh trong nguồn nước đó có thể chịu được sự biến động lớn về độ mặn cũng như sản sinh các hợp chất giúp chống lại các vi khuẩn khác và thích nghi với môi trường sống. Các kết quả của nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn hiện nay đã chỉ ra rằng, các phân lập từ nguồn mẫu tự nhiên có thể tìm ra các hợp chất kháng khuẩn đa dạng [30].

Gần đây, những kết quả tương tự đã chứng minh hợp chất thứ cấp sinh ra từ *Bacillus* spp. không mất hoạt tính với những thay đổi về độ mặn và nhiệt độ của môi trường [31].

Nghiên cứu này cũng cho thấy các sản phẩm trao đổi chất của *Bacillus pumilus* có khả năng ức chế sự phát triển của *Vibrio parahaemolyticus*.

Bảng 2. Khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* của vi khuẩn *Bacillus*

| Tên chủng | Nguồn gốc | Đối kháng lỏng | Đối kháng trên đĩa thạch | |
|-----------|--------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | | Kết quả đo OD _{600nm} | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) | Hoạt tính bacteriocin (AU/mL) |
| CARE2 | Công ty Tiên Phong | 34,64 ± 1,25 | 6,67 ± 1,20 | 1000,07 ± 247,72 ^c |
| BT32 | Phân lập từ ruột tôm thẻ | 49,05 ± 2,27 | 7,33 ± 0,33 | 1115,27 ± 70,69 ^c |
| BSU11 | Phân lập từ ruột tôm sú | 58,10 ± 1,04 | 11,67 ± 0,33 | 2170,32 ± 91,63 ^{bc} |
| BSU21 | Phân lập từ ruột tôm sú | 52,26 ± 2,37 | 10,33 ± 0,33 | 1814,27 ± 86,39 ^{bc} |
| BSU22 | Phân lập từ ruột tôm sú | 49,52 ± 0,66 | 9,67 ± 0,33 | 1646,72 ± 81,16 ^{bc} |
| BSU51 | Phân lập từ ruột tôm sú | 33,57 ± 1,64 | 11,00 ± 0,58 | 1992,29 ± 154,20 ^{bc} |
| BSU63 | Phân lập từ ruột tôm sú | 53,21 ± 1,76 | 11,00 ± 0,58 | 1992,29 ± 154,20 ^{bc} |
| BA21 | Phân lập từ nước ao tôm | 76,78 ± 4,39 | 14,00 ± 2,65 | 2968,81 ± 862,12 ^{ab} |
| BV1 | Phân lập từ nước sông | 85,24 ± 0,31 | 17,67 ± 2,60 | 4222,82 ± 959,09 ^a |

^{a, b, c}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Tại những thời điểm khác nhau của quá trình sinh trưởng, vi khuẩn lactic và *Bacillus* có thể tiết ra chất kháng khuẩn với hàm lượng khác nhau. Vì vậy, kích thước vòng kháng khuẩn với *V. parahaemolyticus* đo được cũng khác nhau khi thu dịch ly tâm ở những thời điểm khác nhau. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ số chủng có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* với cơ chế tạo ra hợp chất tương tự bacteriocin là 6,11% (11/180 chủng). Trong số các chủng kháng *Vibrio* spp., tỷ lệ xuất hiện chủng *Bacillus* cao hơn so với vi khuẩn lactic (9/2).

3.3. Xác định cơ chế đối kháng

Sau khi xử lý bằng enzyme proteinase K, dịch lọc của 11 chủng vi khuẩn thử nghiệm không còn hoạt tính đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus*. Điều này cho thấy yếu tố kháng khuẩn của các chủng có bản chất là protein. Kết quả này tương đồng với nhiều nghiên cứu trong những năm gần đây trên các chủng *Vibrio mediterranei* 1, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus acidilactici* HW01 [32-34]. Các nghiên cứu này đều phát hiện các hợp chất kháng khuẩn là protein và xác định các hợp chất dạng này là bacteriocin. Trong nghiên cứu này, 11 chủng vi khuẩn thử nghiệm thể hiện đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* có thể theo cơ chế tạo ra các hợp chất tương tự như bacteriocin.

Thời gian gần đây đã có một số nghiên cứu về ứng dụng bacteriocin kiểm soát tác nhân gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Các bacteriocin sản xuất từ *Lactobacillus plantarum* 89 và *Pediococcus pentosaceus* có khả năng ức chế 42-54% vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên cá [35]. Trên đối tượng tôm sú (*Penaeus monodon*), chủng *Bacillus subtilis* BT23 tạo ra hợp chất kháng khuẩn, có tác dụng tốt trong việc chống lại sự tăng trưởng của vi khuẩn gây bệnh *Vibrio harveyi*, giúp cho tỷ lệ chết của tôm giảm 90% [26]. *Bacillus pumilus* B3.10.2B, một chủng có khả năng tạo bacteriocin, khi bổ sung vào thức ăn có khả năng cải thiện tỷ lệ sống của tôm hùm bông (*Panulirus ornatus*) cảm nhiễm bởi vi khuẩn gây bệnh *Vibrio owensii* [36]. Hai *et al.* phân lập được 2 chủng thuộc các loài *Pseudomonas aeruginosa* và *Pseudomonas synxantha* có khả năng sinh hợp chất tương tự bacteriocin và ức chế được 15 loài *Vibrio* gây bệnh trên tôm (thẻ) gân (*Penaeus latisulcatus*) từ các chế phẩm

sinh học [37]. Sử dụng bacteriocin và vi khuẩn tạo bacteriocin là một giải pháp rất triển vọng để phòng chống các bệnh trên vật nuôi thủy sản do vi khuẩn gây nên [38].

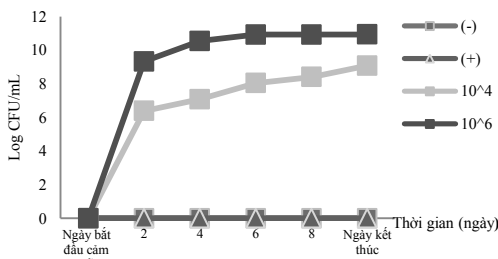
3.4. Khả năng đối kháng của vi khuẩn tuyển chọn thử nghiệm trên tôm

3.4.1. Chỉ tiêu môi trường

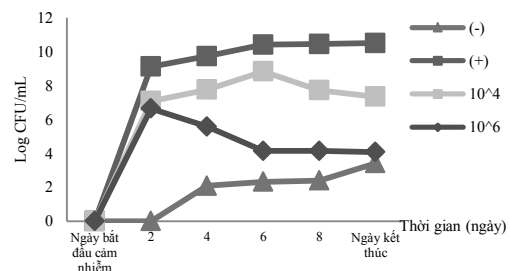
Nước trong các bể thí nghiệm có pH dao động trong khoảng 7,8-8,2, là khoảng phù hợp cho tôm [39]. Trong thời gian thí nghiệm, hàm lượng nitrite (NO₂) tăng từ 0,5 mg/L đến 3,5 mg/L, hàm lượng ammonia (NH₃) tăng từ 0,8 mg/L đến 6,0 mg/L. Các yếu tố môi trường có sự biến động do không thay nước trong thời gian thí nghiệm. Tuy nhiên, điều này ảnh hưởng không nhiều đến tăng trưởng và sống sót của tôm trong thời gian thí nghiệm. Độ kiềm ở các nghiệm thức dao động trong khoảng 130-180 mg/L. Chỉ tiêu oxy hòa tan chủ yếu phụ thuộc vào quá trình sục khí và dao động trong khoảng 4,7-7,2 mg/L.

3.4.2. Chỉ tiêu vi sinh

Sự biến động mật độ vi khuẩn *Vibrio* spp. trung bình ở các bể đối chứng (+) có khuynh hướng tăng dần từ $1,3 \times 10^9$ CFU/mL đến $3,2 \times 10^{10}$ CFU/mL trong 9 ngày (Hình 3). Ở bể khảo sát bổ sung *Bacillus* sp. BV1 với mật độ 10^4 CFU/mL, mật độ *Vibrio* spp. tăng từ $1,2 \times 10^7$ CFU/mL lên $6,8 \times 10^8$ CFU/mL trong 6 ngày đầu nhưng sau đó giảm dần còn $2,2 \times 10^7$ CFU/mL ở ngày kết thúc thí nghiệm. Điều này có thể là do mật độ vi khuẩn *Bacillus* sp. BV1 tăng lên đến một mức đủ lớn có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (Hình 2). Ở bể khảo sát bổ sung *Bacillus* sp. BV1 với mật độ 10^6 CFU/mL, mật độ *Vibrio* spp. giảm từ $4,4 \times 10^6$ CFU/mL xuống còn $1,2 \times 10^4$ CFU/mL, cho thấy tác dụng ức chế mạnh mẽ của vi khuẩn *Bacillus* sp. BV1.



Hình 2. Mật độ vi khuẩn *Bacillus* sp. BV1

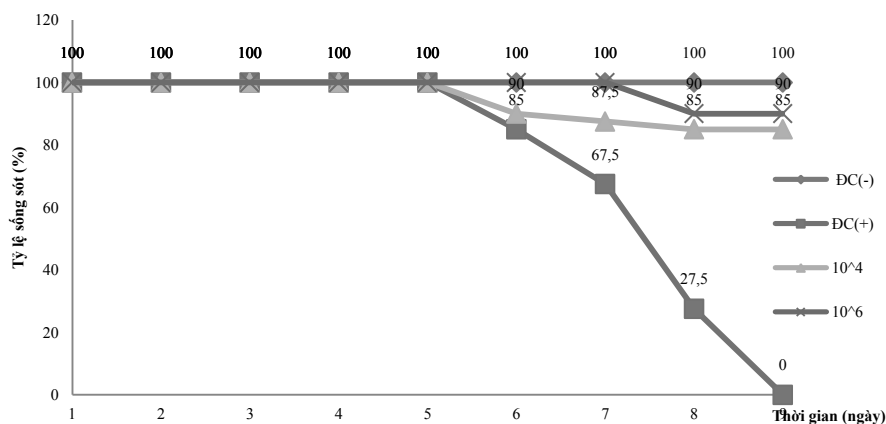


Hình 3. Mật độ vi khuẩn *Vibrio* spp.

Kết quả này cho thấy có mối liên quan của việc bổ sung vi khuẩn *Bacillus* sp. BV1 đến sự giảm mật độ vi khuẩn *Vibrio* spp. trong các bể thử nghiệm. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Moriarty: khi sử dụng probiotics chứa một chủng thuộc loài *Bacillus subtilis* tỷ lệ sống của tôm sú tăng, hạn chế được mầm bệnh do vi khuẩn *Vibrio* spp. trong nước và bùn đáy ao [40].

3.4.3. Tỷ lệ sống sót của tôm sau 9 ngày thử nghiệm

Tỷ lệ sống của tôm ở những nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *Bacillus* sp. BV1 cao hơn với nghiệm thức đối chứng (Hình 4). Sau 5 ngày đầu thí nghiệm, tỷ lệ sống của tôm không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Tuy nhiên, đến ngày thứ 6 thì tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức đối chứng (+) giảm xuống còn 85%. Tỷ lệ sống cuối cùng của tôm sau 9 ngày cảm nhiễm ở nghiệm thức đối chứng (+) là 0%, các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Bacillus* sp. BV1 với mật độ 10^4 CFU/mL và 10^6 CFU/mL có tỷ lệ sống cuối cùng của tôm lần lượt là 85% và 90%.



Hình 4. Tỷ lệ sống sót của tôm sau 9 ngày thử nghiệm

Nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ sống của tôm ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn cao hơn đối chứng có thể do *Bacillus* sp. BV1 đã ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh chết sớm trên tôm, giúp tăng tỷ lệ sống cho tôm, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi như giúp cải thiện môi trường sống bằng cách phân hủy hết thức ăn thừa, giúp tôm tiêu hóa tốt, phân tán khí độc, gia tăng miễn dịch,... Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Balcazar và Rojas, trong đó *Bacillus subtilis* UTM 126 có khả năng ức chế ba chủng *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* [11].

4. KẾT LUẬN

Sàng lọc khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của 180 chủng vi khuẩn, kết quả thu được 2 chủng vi khuẩn lactic (SU31, SU41) và 9 chủng vi khuẩn *Bacillus* (CARE2, BT32, BSU11, BSU21, BSU22, BSU51, BSU63, BA21, BV1) thể hiện tính chất đối kháng thông qua cơ chế sinh hợp chất bacteriocin. Trong đó, chủng vi khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng tốt nhất là BV1 phân lập từ nước sông (tỷ lệ kháng 85,6%, hoạt tính bacteriocin 4222,820 AU/mL). Tỷ lệ sống sót của tôm ở nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. BV1 với mật độ 10⁴ CFU/mL đạt 85% so với nghiệm thức đối chứng. Ở nghiệm thức bổ sung *Bacillus* sp. BV1 với mật độ 10⁶ CFU/mL tỷ lệ sống sót đạt 90% trong 9 ngày thử nghiệm. Chủng BV1 thể hiện tiềm năng có thể phát triển thành chế phẩm sinh học dùng để kiểm soát bệnh EMS/AHPND trên tôm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Newman S. G. - AHPND inferences based on behavior of *Vibrio* bacteria, *The Global Aquaculture Advocate* **16** (6) (2013) 34-36.
2. Lyon A., Mooney A. and Grossel, G. - Using AquaticHealth.net to Detect Emerging Trends in Aquatic Animal Health, *Agriculture* **3** (2013) 299-309.
3. Đặng Phương Nga, Nguyễn Thị Yên. - Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* trong nước nuôi tôm của *Bacillus subtilis* HY1 và *Lactococcus lactis* CC4K, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* **5** (3) (2007) 383-390.
4. Newaj-Fyzul A., Al-Harbi A. H., Austin B. - Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture, *Aquaculture* **431** (2014) 1-11.

5. Kumar V., Roy S., Meena D. K., Sarkar U. K. - Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* **24** (4) (2016) 342-368.
6. Phạm Thị Tuyết Ngân, Trần Suong Ngọc, Hồ Diễm Thơ. - So sánh khả năng cải thiện chất lượng nước và ức chế *Vibrio* của xạ khuẩn *Streptomyces parvulus* và vi khuẩn *Bacillus subtilis* chọn lọc trong hệ thống nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), *Tạp chí khoa học Trường đại học Cần Thơ* **47** (2016) 87-95.
7. Nguyễn Xuân Cảnh, Hồ Tú Cường, Nguyễn Thị Định, Phạm Thị Hiếu. - Nghiên cứu chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm, *Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt nam* **14** (11) (2016) 1809-1816.
8. Nguyễn Thị Chính, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Văn Duy. - Tuyển chọn một số chủng vi khuẩn chịu muối mật, chịu axit và đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh chết sớm ở tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang* **4** (2016) 35-41.
9. Nguyễn Thị Bích Đào, Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Văn Khanh, Nguyễn Quang Linh. - Phân lập và tuyển chọn các chủng *Bacillus* ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh tôm chết sớm ở tỉnh Thừa Thiên Huế, *Tạp chí khoa học (Đại học Huế)* **100** (1) (2015) 15-28.
10. Mahrous H., Mohamed A., Abd El-Mongy M., El-Batal A. I., Hamza H. A. - Study bacteriocin production and optimization using new isolates of *Lactobacillus* spp. isolated from some dairy products under different culture conditions, *Food and Nutrition Sciences* **4** (3) (2013) 342-356.
11. 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* **55** (5) (2007) 409-412.
12. Kandler O., Weiss N. - Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212 AL, In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2, Ed. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Baltimore: Williams and Wilkins (1986) 1209-1234.
13. Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C. H. - The genus *Bacillus*, *Agricultural handbook No. 427*, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C. (1973) 4-5.
14. Lê Văn Việt Mẫn, Lại Mai Hương. - Thí nghiệm vi sinh vật học thực phẩm, NXB Đại học Quốc gia TP.HCM (2006) 45-48.
15. Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết. - Thí nghiệm vi sinh vật học, NXB Đại học Quốc Gia TP.HCM (2003) 38-49.
16. Trần Linh Thước. - Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội (2013) 71-101.
17. Verón, Herná E., Di Risio, H. D., Isla María Inés, Torres S. - Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina, *LWT - Food Science and Technology* **84** (2017) 231-240.
18. Parada J. L., Caron C. R., Medeiros A. B. P., and Soccol C. R. - Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives, *Brazilian Archives Of Biology And Technology* **50** (3) (2007) 521-542.
19. Daba H., Pandian S., Gosselin J. F, Simard R. E., Huang J., and Lacroix C. - Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*, *Applied and Environmental Microbiology* **57** (12) (1991) 3450-3455.

20. Hor Y. Y., Liong M. T. - Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*, *Dermatologica Sinica* **32** (3) (2014) 141- 147.
21. Chavasirikunton V., Vatanyoopaisarn S. and Phalakornkule C. - Bacteriocin-like activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional Thai fermented sausages, *Journal of Culture Collection* **5** (2006-2007) 64-72.
22. Cheikhyoussef A., Pogori N., and Zhang H. - Study of the inhibition effects of *Bifidobacterium* supernatants towards growth of *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*, *International Journal of Dairy Science* **2** (2) (2007) 116-125.
23. Usmiati, S. and Marwati, T. - Selection and optimization of process of bacteriocin production from *Lactobacillus* sp., *Indonesian Journal of Agriculture* **2** (2) (2009) 82-92.
24. Marwa A., Saad H. M. *et al.* - Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, *Benha Veterinary Medical Journal* **28** (1) (2015) 210-215.
25. Selvin J., Manilal A., Sujith S., Kiran G. S. & Lipton A. P. - Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases, *Latin American Journal Aquatic Research* **39** (2) (2011) 197-204.
26. Vaseeharan B. and Ramasamy P. - Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Letters in Applied Microbiology* **36** (2) (2003) 83-87.
27. Kongnum K. and Hongpattarakere T. - 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 & Shellfish Immunology* **32** (2012) 170-177.
28. Abriouel H., Franz C. M., Ben Omar N., Gálvez A. - Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins, *FEMS Microbiological Reviews* **35** (1) (2011) 201-232.
29. Ouwehand A. C., Vesterlund S., Paltta J., Lauková A., Karp M. - Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances, *Journal of Microbiological Methods* **57** (1) (2004) 23-31.
30. Ghosh S., Ringo E., Selvam A.D.G, Rahiman K. M. M., Sathyan N., John N. and Hatha A. A. M. - Gut associated lactic acid bacteria isolated from the estuarine fish *Mugil cephalus*: Molecular diversity and antibacterial activities against pathogens, *International Journal of Aquaculture* **4** (1) (2014) 1-11.
31. Liu Y., He L. and Chen W. - Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12, *Microbiological Research* **161** (4) (2006) 321-326.
32. Carraturo A., Raieta K., Ottaviani D. and Russo G. L. - Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by a bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Vibrio mediterranei* 1, *Journal of Applied Microbiology* **101** (1) (2006) 234-241.
33. Hwanhlem N., Ivanova T., Biscola V., Choiset Y., Haertlé T. - Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties, *Food Control* **78** (2017) 187-195.

34. Ahn H., Kim J., Kim W. J. - Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria, *Food Control* **80** (2017) 59-66.
35. Panchayuthapani D., Abraham T. J. and Jeyachandran P. - Inhibition of fish bacterial flora by bacteriocin of lactic acid bacteria, *Fishery Technology* **32** (2) (1995) 118-121.
36. Van Duy Nguyen, Thu Thuy Pham, Thi Hai Thanh Nguyen, Thi Thanh Xuan Nguyen, Lone Hoj - Screening of marine bacteria with bacteriocin-like activities and probiotic potential for ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) juveniles, *Fish & Shellfish Immunology* **40** (1) (2014) 49-60.
37. Ngo Van Hai, Fotedar R. and Buller N. - Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Panaeus latisulcatus* (Kishinouye), *Aquaculture* **272** (1-4) (2007) 231-239.
38. Sahoo T. K., Jena P. K., Patel A. K. and Seshadri S. - Bacteriocins and their applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review, *Aquaculture Research* **47** (4) (2016) 1013-1027.
39. Chanratchakool P. - Problems in *Penaeus monodon* culture in low salinity areas, *Aquaculture Centres in Asia-Pacific* **8** (1) (2003) 55-56.
40. Moriarty D. J. W - Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds, *Aquaculture* **164** (1998) 351-358.

ABSTRACT

ISOLATION AND SCREENING OF BACTERIOCIN PRODUCING BACTERIA INHIBITING SHRIMP PATHOGENIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Pham Minh Tuan*, Nguyen Thi Hong Phan, Tran Anh Thu
Ho Chi Minh University of Food Industry
*Email: pmtuan@cntp.edu.vn

Early Mortality Syndrome (EMS) also named Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) should be considered as a dangerous shrimp disease that has affected shrimp farms in Southeast Asia. It was detected in shrimp farms in southern China as first record in 2009 and afterward in Vietnam, Thailand and Malaysia. Lactic acid bacteria and *Bacillus* isolated from some samples of various fermented vegetables, seafood gastrointestinal tract and pond water were supposed to have capability to antagonize *Vibrio parahaemolyticus* causing the EMS. 47 strains of lactic acid bacteria and 133 strains of *Bacillus* were isolated and tested for antibacterial assays with the broth-dilution method and the agar well diffusion method. The results showed that 11 out of 180 strains could inhibit the *Vibrio*. The *Bacillus* sp. BV1 strain showed the highest antibacterial activity (antibacterial activity of 85.6%, bacteriocin activity of 4222.820 AU/mL). This strain was selected for the antagonistic experiment to *Vibrio parahaemolyticus* on white leg shrimp. Survival rates were significantly improved to 85% and 90% (for the treatment with 10^4 and 10^6 CFU/mL of *Bacillus* sp. BV1, respectively), which were much higher than untreated control after 9 days of challenge.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Bacillus*, bacteriocin, *Vibrio parahaemolyticus*, EMS/AHPND.