

# PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS* ĐỂ TẠO CHẾ PHẨM SINH HỌC SỬ DỤNG TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

KHUẤT HỮU THANH, BÙI VĂN ĐẠT

## 1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, do ảnh hưởng của bệnh, tôm nuôi bị chết trên diện rộng ở nhiều địa phương, gây tổn thất lớn trong nuôi trồng thủy sản. Ở nước ta trong các năm 2007 - 2009 do dịch bệnh, diện tích nuôi tôm sú giảm mạnh ở nhiều tỉnh: Quảng Trị có hơn 50 ha tôm sú bị thiệt hại do dịch bệnh, Bến Tre 134 ha diện tích nuôi tôm sú bị nhiễm bệnh ...

Nhiều nghiên cứu nước ngoài đã chứng minh việc bổ sung chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* vào thức ăn nuôi tôm cá có hiệu quả rất tốt. Một số chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng đối kháng các loài vi khuẩn gây bệnh chủ yếu ở tôm như *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* [3, 5], nhiều chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy chất hữu cơ mạnh, được sử dụng tạo chế phẩm sinh học phục vụ nuôi trồng thủy sản [1, 5, 10].

Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được sử dụng tạo các chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản, do tính chất hỗ trợ tiêu hóa và ức chế các vi khuẩn gây bệnh ở tôm cá [2, 9]. Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu một số kết quả nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, đồng thời có hoạt tính enzym phân giải các chất hữu cơ để tạo chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi trồng thủy sản.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu vật được sử dụng để phân lập vi khuẩn *Bacillus* gồm các mẫu đất từ các ao đang nuôi tôm tại Nha Trang (Khánh Hòa), Đồ Sơn (Hải Phòng); các mẫu lấy từ phân giun đùn đưa vào đáy ao nuôi tôm; các mẫu thu từ hệ thống tiêu hóa của tôm sú trưởng thành và một vài mẫu từ các chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi trồng thủy sản mua ngoài thị trường.

Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *E.coli* K12TG1 (do Đại học ENSPANA - Pháp cung cấp) lấy từ bộ sưu tập chủng giống của Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội. Hai chủng *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* phân lập trực tiếp từ tôm bị nhiễm bệnh tại Nha Trang, đã phân loại dựa vào trình tự gen 16S RNA, do viện Nghiên cứu NTTS III cung cấp.

Sử dụng môi trường NB (Nutrien Broth) cải tiến trong phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* [6]. Phân lập vi khuẩn theo phương pháp pha loãng liên tục trên môi trường thạch ở hộp petri, với chế độ gia nhiệt hai lần ở 80°C trong 30 phút để loại bỏ các vi khuẩn không sinh bào tử. Kiểm tra các vi khuẩn phân lập được trên môi trường đặc hiệu (PLET) để phát hiện các chủng vi khuẩn *B. anthracis* gây bệnh than [8].

Thử hoạt tính enzym theo phương pháp chấm điểm, có bổ sung các cơ chất tương ứng: bổ sung 3% sữa tách béo (skim milk) để kiểm tra hoạt tính protease; 2% tinh bột tan để kiểm tra

hoạt tính amylase; 5g/l CMC để kiểm tra hoạt tính cellulase. Hoạt tính enzym được xác định bằng chỉ số D-d (mm) sau 24 giờ nuôi cấy (D là đường kính vòng phân giải, d – độ lớn của các khuẩn lạc vi khuẩn phát triển) [6].

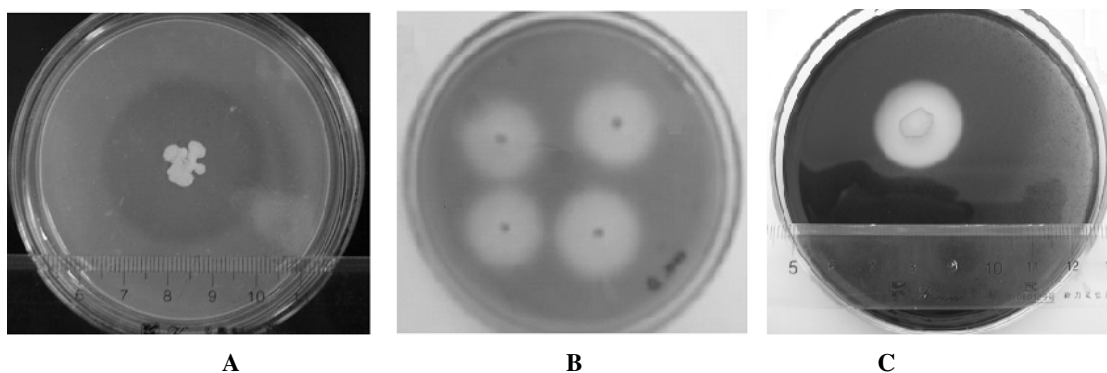
Xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên thạch [3, 7]. Các chủng vi sinh vật kiểm định được nuôi trên các môi trường thích hợp. Vòng ức chế vi sinh vật kiểm định được quan sát sau 36 giờ nuôi cấy.

Phân loại các chủng vi khuẩn có hoạt tính cao bằng kit sinh hóa API 20E (Biomerieux) và kỹ thuật phân tử [2, 10]. Sử dụng thiết bị PCR để nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA với cặp mồi: mồi xuôi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và mồi ngược 1492R 5'-TATTACCGCGGCTGCTGG-3'- hãng Alpha DNA, Canada). Trình tự đoạn gen 16S rRNA được xác định bởi hãng Macrogen (Hàn Quốc), so sánh với trình tự gen 16S trên GenBank và định tên các chủng vi khuẩn nghiên cứu với chương trình BLAST/NCBI.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có hoạt tính enzym cao

Bằng phương pháp phân lập vi khuẩn với hai lần gia nhiệt ở 80°C trong 30 phút đã thu được 95 chủng vi khuẩn có khả năng sinh bào tử (79 chủng phân lập từ các mẫu đất ở ao nuôi tôm, phân giun, đường tiêu hóa tôm, và 16 chủng sưu tập từ các chế phẩm sinh học). Nghiên cứu đặc điểm hình thái tế bào, màu sắc khuẩn lạc và khả năng sử dụng một số loại đường bằng kit sinh hóa API 20E, với khóa phân loại Bergey cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập đều có khả năng sinh bào tử, thuộc chi *Bacillus*. Kiểm tra các vi khuẩn phân lập được trên môi trường đặc hiệu (PLET) không thấy xuất hiện trường hợp dương tính, chứng tỏ các chủng vi khuẩn phân lập được không chứa *B. anthracis* gây bệnh than [8].



Hình 1. Hoạt tính enzym của chủng BaRT 9: protease (A), amylase (B) và cellulase (C)

Kết quả xác định hoạt tính protease, amylase và cellulase của các chủng vi khuẩn đã phân lập, cho thấy một số chủng có khả năng sinh cả 3 loại enzym tương đối cao, điển hình là chủng có kí hiệu BaRT9 (hình 1).

Bảng 1. Hoạt tính enzym của một số chủng vi khuẩn đã lựa chọn

Kí hiệu chủng	Hoạt tính protease (D-d) mm	Hoạt tính amylase (D-d) mm	Hoạt tính cellulase (D-d) mm
BaD	23,5	22,0	18,5
BaPG	24,5	19,5	16,5
BaPG 3	21,6	20,0	17,3
BaRT 9	22,0	20,5	21,5
BaRT 6	22,5	21,4	16,8
BaPT 4	21,1	20,6	17,4

Kết quả ở bảng 1 cho thấy 6 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã lựa chọn có hoạt tính 3 loại enzyme phân hủy các chất hữu cơ tương đối cao (amylase, protease và cellulase), có thể được sử dụng để tạo chế phẩm probiotic trong nuôi trồng thủy sản [2, 7, 10].

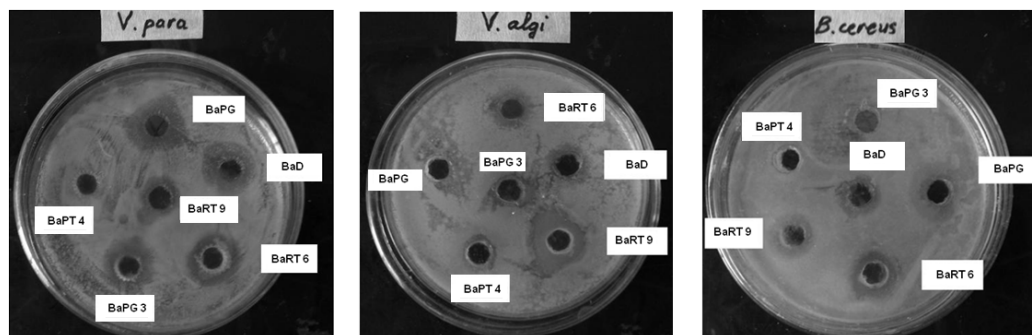
### 3.2. Tính chất đối kháng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu với vi sinh vật kiểm định

Kết quả xác định tính đối kháng với vi sinh vật kiểm định của các chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính enzym cao đã lựa chọn, được trình bày ở bảng 2. Kết quả ở bảng 2 cho thấy các chủng vi khuẩn *Bacillus* lựa chọn đều có tính kháng với 2 chủng vi khuẩn gây bệnh nghiêm trọng ở tôm là *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* (bảng 2 và hình 2). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu đã công bố [3, 7, 9]. Từ kết quả nghiên cứu nêu ở bảng 2 cho thấy chỉ có một số chủng *Bacillus* có khả năng đối kháng *Bacillus cereus* và *Staphylococcus aureus*, 50% số chủng nghiên cứu đối kháng *E. coli* K12TG. Khả năng kháng khuẩn mạnh hay yếu của các chủng thuộc chi *Bacillus* tùy thuộc các chất kháng sinh không có bản chất peptid (bacilysoicin, corynebactin...) hoặc các chất kháng sinh có bản chất protein. Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* thường ít đối kháng với *E. coli*. Kết quả thu được của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả thu được từ các nghiên cứu trước đây [2, 10].

Bảng 2. Hoạt tính ức chế đối với vi khuẩn gây bệnh của một số chủng *Bacillus*

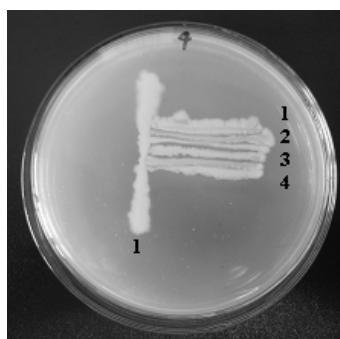
TT	Vi sinh vật kiểm định	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)					
		BaD	BaPG	BaPG 3	BaRT 9	BaRT 6	BaPT 4
1	<i>V. parahaemolyticus</i>	20,5	21,5	20,1	16,0	17,0	16,3
2	<i>V. alginolyticus</i>	16,0	16,5	16,2	17,5	16,5	16,0
3	<i>Bacillus cereus</i>	16,0	17,0	-	16,0	16,3	-
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	16,5	17,5	17,2	16,5	16,0	-
5	<i>E. coli</i>	17,5	-	-	16,0	16,4	-

Kết hợp đặc điểm đối kháng mạnh các chủng vi khuẩn gây bệnh và có hại ở tôm, đồng thời có hoạt tính enzym phân hủy các chất hữu cơ, chúng tôi lựa chọn tổ hợp 4 chủng vi khuẩn (BaD, BaPG, BaRT 9 và BaRT 6) trong tạo chế phẩm probiotic phục vụ nuôi trồng thủy sản [4].



Hình 2. Hoạt tính ức chế đối với *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *B. cereus*

Các chủng vi khuẩn probiotic có khả năng kháng khuẩn có thể ức chế nhau trong quá trình sinh trưởng. Nghiên cứu xác định tính đối kháng giữa các chủng vi khuẩn probiotic, nhằm lựa chọn và phối hợp các chủng vi khuẩn probiotic ít đối kháng lẫn nhau, tạo thuận lợi trong quá trình nhân sinh khối, tăng tác dụng của chế phẩm sinh học. Để kiểm tra tính đối kháng của 4 chủng *Bacillus* (BaD, BaPG, BaRT 9 và BaRT 6) đã lựa chọn, chúng tôi sử dụng phương pháp cấy theo vạch chéo trên đĩa thạch với môi trường NB cải tiến. Kết quả thu được cho thấy 4 chủng vi khuẩn lựa chọn đều phát triển tốt trên cùng môi trường dinh dưỡng, không có biểu hiện ức chế mạnh lẫn nhau trong quá trình sinh trưởng (hình 3), có thể sử dụng để tạo chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi trồng thủy sản.



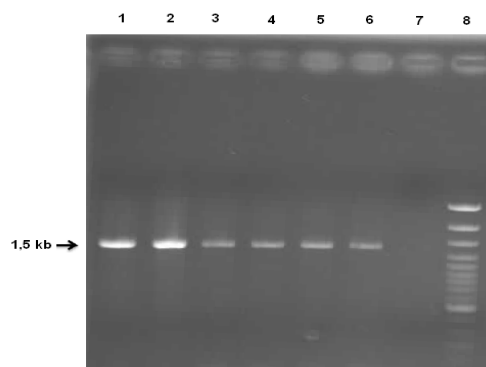
Hình 3. Tính đối kháng của các chủng vi khuẩn *Bacillus*  
(1- BaD, 2- BaPG, 3- BaRT 9 và 4- BaRT 6)

### 3.3. Định tên các chủng vi khuẩn đã lựa chọn dựa trên trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA

Trên cơ sở phân loại sơ bộ bằng kit sinh hóa API 20E, các chủng *Bacillus* đã lựa chọn được tiếp tục định tên đến loài bằng kỹ thuật phân tử. Sử dụng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu đã

nhân được đoạn gen có kích thước khoảng 1,5 kb, tương ứng kích thước gen 16S rRNA của vi khuẩn *Bacillus* (hình 4).

Trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn nghiên cứu được xác định bởi hãng Macrogen (Hàn Quốc). Phân tích trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn nghiên cứu thuộc chi *Bacillus*, so sánh với trình tự gen 16S trên GenBank với chương trình BLAST/NCBI cho thấy có độ tương đồng cao với đoạn gen 16S rRNA của nhiều loài thuộc chi *Bacillus*: Chủng BaD với trình tự đoạn gen 16S có độ tương đồng 100% với chủng *Bacillus subtilis* EBS05 (FJ876834);



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA từ DNA tổng số

Giếng 1: BaD; Giếng 2: BaPG; Giếng 3: BaPG; Giếng 4: BaRT9;

Giếng 5: BaRT 6; Giếng 6: BaPT 4; Giếng 7: Đối chứng; Giếng 8: Maker

Chủng BaPG tương đồng 99% với chủng *Bacillus subtilis* BFE 5314 (GU250453.1); Chủng BaPG 3 tương đồng 99% với chủng *Bacillus subtilis* GB16 16S AY11607.1); Chủng BaRT 9 tương đồng 99% với chủng *Bacillus licheniformis* SL2 (GQ184581.1); Chủng BaRT 6 tương đồng 99% với chủng *Bacillus* sp. CMAP11 (FJ405190.1); Chủng BaRT 4 tương đồng 89% với chủng *Bacillus* sp. B26 (2008) (EU362172.1).

#### 4. KẾT LUẬN

Từ 95 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã phân lập, xác định được chủng vi khuẩn BaPG có hoạt tính protease cao nhất (24,5), chủng BaD có hoạt tính amylase cao nhất (22,0) và chủng BaRT9 có hoạt tính cellulase cao nhất (21,5). Sáu chủng vi khuẩn được lựa chọn (BaD, BaPG, BaPG3, BaRT 9, BaRT 6 và BaPT4) đều có tính đối kháng mạnh đối với 2 chủng vi khuẩn gây bệnh chủ yếu ở tôm là *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*.

Tổng hợp các kết quả nghiên cứu, chúng tôi lựa chọn tổ hợp gồm 4 chủng vi khuẩn (BaD, BaPG, BaRT 9 và BaRT 6) có khả năng kháng khuẩn và có hoạt tính enzym phân hủy chất hữu cơ mạnh, để sử dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ nuôi trồng thủy sản.

Phân loại các chủng vi khuẩn đã lựa chọn bằng các kết sinh hóa và kỹ thuật phân tử với trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy, ba chủng có kí hiệu BaD, BaPG và BaPG3 có độ tương đồng 99% - 100% với loài *Bacillus subtilis*. Chủng vi khuẩn kí hiệu BaRT 9 tương đồng 99% với chủng *Bacillus licheniformis* SL2 (GQ184581.1); Hai chủng vi khuẩn kí hiệu BaRT 6 và BaRT 4 tương đồng với *Bacillus* sp. với tỷ lệ 99% và 89%.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adnan Tamime (Ed.), et all. - Probiotic Dairy Products. Blackwell Publishing Ltd, 2005.
2. Đặng phương Nga, Nguyễn Thị Yên, Đỗ thu Phương, Nguyễn Bá Tú, Lại Thúy Hiền - Khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* trong nước nuôi tôm của *Bacillus subtilis* HY1 và *Lactococcus lactis* CC4K, Tạp chí Công nghệ sinh học **5** (3) (2007) 383-390.
3. Jayasree L., Janakiram P., and Madhavi R. - Characterization of *Vibrio spp.* associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India), Journal of the World Aquaculture Society **37** (4) (2006) 523.
4. Khuat Huu Thanh, Nguyen Thy Ngoc – Research on the condition and the production process of biological product BIO-TS3 used for the intensive shrimp farming, Journal of Science & Technology Technical Universities (78A) (2010) 12-16.
5. Kozasa M. - Probiotics for animal use in Japan. Rev. Sci. Tech (1998), Int. Epiz. 8.2.
6. Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng, Lê Thị Lan Chi - Các phương pháp phân tích ngành Công nghệ lên men, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 2005.
7. Maloy Kumar Sahu N. S. Swarnakumar K. Sivakumar T. Thangaradjou, and L. Kannan - Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives, Indian Journal of Microbiology (2008) 5.
8. Pierre Wattiau, Silke R. Klee, David Fretin, Mieke Van Hesseche, Marie Ménart, Tatjana Franz Camille Chasseur, Patrick Butaye, and Hein Imberechts - Occurrence and genetic diversity of *Bacillus anthracis* strains isolated in an active Wool-Cleaning Factory, Applied and Environmental Microbiology **7** (2008) 4005-4011.
9. Rajinikanth T., P. Ramasamy, and V. Ravi - Efficacy of Probiotics, Growth Promoters and Disinfectants in Shrimp Grow out Farms, World Journal of Fish and Marine Sciences **2** (3) (2010) 208-215.
10. Siriat Rengpiat, Wannipa Phianphak, Somkiat Piyatirativorakul, Piamsak Menasveta - Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) survival and growth, Aquaculture **167** (1998) 301-313.

## SUMMARY

### ISOLATION AND SELECTION OF *BACILLUS* STRAINS FOR THE PRODUCTION OF BIO-PRODUCTS USING IN AQUACULTURE

95 strains of bacilli were isolated from the samples of shrimp ponds, the worm's muck for shrimp's food, and the digestive tract of shrimp. As a result, six strains of *Bacillus* were selected. All the selected strains contain the active enzymes (protease, cellulase and amylase), which can strongly disintegrate the organic substances with (D-d ~ 16,5 – 24,5 mm). The strains BaD, BaPG, BaRT 9 and BaRT 6 were chosen for the production of bio-products in aquaculture. These *Bacillus* strains showed strong antagonistic properties against pathogenic and harmful bacteria, and high enzyme activities as well.

The classification of these strains based on their physiological characteristics and 16S rRNA sequence indicated that strain BaD which has the similarity rate of 100% to *Bacillus*

*subtilis* EBS05 (FJ876834), strain BaPG with the similarity rate of 99% to the *Bacillus subtilis* BFE 5314 (GU250453.1), strain BaPG 3 with the similarity rate of 99% to the *Bacillus subtilis* GB16 16S AY11607.1), strain BaRT 6 with the similarity rate of 99% to the *Bacillus licheniformis* SL2 (GQ184581.1); The strain BaRT 4 with the similarity rate of 89% to the *Bacillus sp.* B26(2008) (EU362172.1).

*Địa chỉ:*

*Nhận bài ngày 12 tháng 12 năm 2009*

Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm,  
Trường Đại học Bách khoa Hà Nội