TUYỂN CHỌN CÁC VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ RỪNG NGẬP MẶN CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG VIBRIO ĐỂ SẢN XUẤT CHẾ PHẨM PROBIOTIC KIỂM SOÁT BỆNH VIBRIOSIS TRÊN TÔM NƯỚC LỢ

Nguyễn Văn Duy, Mai Thị Hằng*, Vũ Thị Liên**

Scrreening and studying on bacteria isolated from mangroves of vietnam, which could inhibit vibrio for probiotic preparation controlling vibriosis in marine shrimp

(Summary)

From 448 bacterial strains isolated from mangroves of Thai Binh, Nam Dinh, Quang Ninh, Can Gio provinces sixty seven bacterial strains were screened, which could inhibit pathogenous Vibrio spp. causing Vibriosis in shrimp culture. Among them there were 4 strains signed as V33(1), 47Lm6, 47Lm9 and 55Lm1 shown to be a potential producers of probiotic preparation used in aquaculture for controlling the vibriosis in shrimp culture. They could strongly inhibit Vibrio causing vibriosis in shrimp culture in vitro and in vivo as well, harmless to the shrimps and environment, survive and produce antibiotic in shrimp pond water. In presence of 10^8CFU/ml of every selected 4 strains the survived rate of shrimps significantly increased, namely the survived rate of the shrimps by vibrios in presence of the strains signed as V33(1), 47Lm6, 47Lm9 and 55Lm1 were increased in 33.3%, 20%, 26,7 and 6,7%, respectively in comparison with the control one.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, nghề nuôi tôm đã phát triển rộng rãi khắp các vùng nhiệt đới trong đó có Việt Nam. Tuy nhiên, cùng với sự phát triển mạnh mẽ đó, ngành nuôi tôm thế giới và ở Việt Nam đã và đang phải đối mặt với những vấn đề về dịch bệnh ở tôm, đặc biệt là các bệnh do virut và các loài *Vibrio* gây nên trên tôm nước lợ. Nhiều biện pháp phòng trừ bệnh vibriosis khác nhau đã được áp dụng (sử dụng hóa chất diệt khuẩn và các chất kháng sinh). Song, những phương pháp trên lại là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường và nghiêm trọng hơn nữa là sự xuất hiện và phát triển ngày càng mạnh của các chủng vi khuẩn gây bệnh nhờn kháng sinh đến mức không kiểm soát được. Chính vì thế, đa số thuốc kháng sinh hiện đã bị cấm sử dụng hoàn toàn trong ngành thủy sản. Vì vậy, việc tìm ra một phương pháp hữu hiệu có tác dụng phòng và trị bệnh do *Vibrio* gây nên trên tôm đã trở thành trọng tâm chú ý của ngành thủy sản thế giới[5, 6]. Việc áp dụng các chế phẩm probiotic có chứa các vi sinh vật an toàn và có lợi vào môi trường nuôi thủy sản đã được chứng minh là có tác dụng phòng, trị bệnh hiệu quả cho tôm. Các chế phẩm probiotic tái thiết sự cân bằng khu hệ vi sinh vật trong môi trường nước, tăng cường giá trị dinh dưỡng của thức ăn, tăng sức đề kháng của vật nuôi, làm giảm các vi sinh vật gây bệnh. Vì thế, probiotic đã và đang được nghiên cứu áp dụng để thay thế các chất hóa học độc hại và các chất kháng sinh [4].

Chúng tôi đã tìm kiếm các nguồn gen vi sinh vật quý của rừng ngập mặn để phục vụ cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm probiotic phòng và chữa bệnh do *Vibrio* gây nên trên tôm nước lợ một cách có hiệu quả và an toàn, tăng sản lượng và giá trị kinh tế cho ngành nuôi tôm nước ta, kết quả nghiên cứu bước đầu được trình bày ở bài viết sau.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các sinh vật: Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng các chủng vi khuẩn trong bộ sưu tập vi sinh vật RNM phân lập từ các RNM Giao Thủy (Nam Định) và Cần Giờ (T.P Hồ Chí Minh) của Bộ môn Công nghệ Sinh học- Vi sinh, Khoa Sinh- KTNN, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội.

Các chủng vi khuẩn kiểm định: Các chủng *Vibrio* gây bệnh trên tôm và cá nước lợ do Phòng Nghiên cứu bệnh thủy sản, Viện Nghiên cứu nuôi trồng Thủy sản I (Từ Sơn, Bắc Ninh) cung cấp, gồm: *V. ordalli, V. parahaemolyticus, V. cholerae, V. alginolyticus V. fluvialis, V. vulnificus.*

Ấu trùng tôm Sú 1,5 tháng tuổi (*Penaeus monodon*) do Trại tôm giống Tuyên Hải, xã Thụy Hải, huyện Thái Thụy, tỉnh Thái Bình cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu

Thu thập mẫu vi khuẩn rừng ngập mặn ngoài tự nhiên: Chúng tôi thu mẫu đất, lá cây, thân cây mục tại RNM Giao Thủy (Nam Định) và mẫu nước đầm tôm tại huyện Giao Thủy (Nam Định). Các mẫu thu thập được bảo quản lạnh và đưa ngay về Phòng Công nghệ Sinh học - Vi sinh, Khoa Sinh- KTNN, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội để tiến hành phân lập trong ngày.

*Bộ môn Công nghệ sinh học- Vi sinh, Khoa Sinh- KTNN, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Phân lập các chủng vi khuẩn: Các mẫu thu thập được phân lập trên môi trường MPA thạch đĩa (5% pepton, 5% cao thịt, 20% thạch và nước biển), nuôi ủ ở 30°C trong 3 ngày để thu được các khuẩn lạc riêng rẽ. (*SYEP: 0,5% pepton; 0,3% cao men; 0,01%; 0,3% glycerol; sắt xitrat; 0,05% KH_2PO_4; 2% thạch, 75% nước biển và 25% nước cất).*

Xác định khả năng đối kháng với Vibrio của các chủng vi khuẩn: Khả năng đối kháng với *Vibrio* các chủng vi khuẩn tuyển chọn được xác định bằng các phương pháp sau đây:

Phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch. Hoạt tính đối kháng với *Vibrio* của các chủng vi khuẩn được tiến hành theo phương pháp 2 lớp thạch của Dopazo và cộng sự năm 1988 với một số biến đổi nhỏ (lớp thạch ở phía trên là môi trường SYEP bán lỏng được trộn đều với vi khuẩn kiểm định) [3].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với các loài *Vibrio* gây bệnh

Tiến hành kiểm tra khả năng đối kháng với 6 loài *Vibrio* gây bệnh của 448 chủng vi khuẩn RNM trong bộ sưu tập nguồn gen vi khuẩn của Bộ môn Công nghệ Sinh học- Vi sinh, Khoa Sinh- KTNN và thu được 67 chủng (chiếm tỷ lệ 15,1%) có khả năng đối kháng với các loài *Vibrio* gây bệnh. Trong đó, có 30 chủng chỉ có khả năng ức chế 1 loài *Vibrio*, 12 chủng có khả năng ức chế 2 loài *Vibrio*, 2 chủng có khả năng ức chế 3 loài *Vibrio* và 1 chủng có khả năng ức chế 4 loài *Vibrio*.

Sự mẫn cảm của 6 loài *Vibrio* kiểm định đối với các chủng vi khuẩn này cũng rất khác nhau: loài *V. ordalli* mẫn cảm nhất với tác động của các chủng vi khuẩn nghiên cứu (19/45 chủng có khả năng đối kháng với *V. ordalli*), trong khi đó loài *V. vulnificus* chỉ mẫn cảm duy nhất với 1 chủng vi khuẩn nghiên cứu . Một số nghiên cứu khác trên thế giới cũng có kết quả tương tự. Celia R. Lavilla-Pitogo và cộng sự thuộc khoa Thuỷ sản Tighauan, Trung tâm phát triển nghề cá Đông Nam Á, Phillipin đã phân lập được 80 chủng vi khuẩn có khả năng ức chế *V. harveyi* từ hàng trăm chủng vi khuẩn thu thập từ môi trường biển [2]. Điều đó cho thấy môi trường thuộc biển nói chung và rừng ngập mặn nói riêng là nơi lưu giữ một nguồn gen phong phú và đa dạng về khả năng đối kháng với các *Vibrio* gây bệnh trên tôm, cá nước lợ.

Trong số 57 chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng với các *Vibrio* có 17 chủng có hoạt tính mạnh với *Vibrio*,: đó là: BT31, BT36, BT38, BT49, 5, BT61, BT66, BT88, BT92, THB34, 47Lm2, 47Lm6,47Lm9, 48Lm6, 55Lm1 ,V33(1), V35, V36(2).

2. Nghiên cứu khả năng đối kháng lẫn nhau của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Kết quả thực nghiệm cho thấy, một chủng vi khuẩn không có hoạt tính ức chế tất cả các loài *Vibrio* gây bệnh trên tôm, nên để có được chế phẩm probiotic có hiệu quả cao chống các loài *Vibrio* trên tôm nuôi nước lợ thì cần phải kết hợp các chủng vi khuẩn khác nhau trong cùng một chế phẩm. Vì thế, các chủng vi khuẩn tuyển chọn phải sống chung được trong cùng một môi trường. Do đó, 17 chủng vi khuẩn có hoạt tính mạnh nêu trên được đem kiểm tra về đặc điểm này bằng phương pháp cấy các vạch cắt ngang trên môi trường MPA thạch đĩa. Kết quả cho thấy các chủng BT66, BT88, BT92, 47Lm6, 47Lm9, 55Lm1, V33(1) và V36(2) không thể hiện hoạt tính đối kháng lẫn nhau, có thể kết hợp để tạo chế phẩm. Tám chủng này cũng là 8 chủng thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh với *Vibrio* khi thử bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch, vì thế các chủng vi khuẩn này tiếp tục được nghiên cứu về các chỉ tiêu tuyển chọn khác.

3. Nghiên cứu khả năng ức chế sự sinh trưởng của các loài *Vibrio* trên môi trường dịch thể

Để khẳng định khả năng đối kháng của các chủng tuyển chọn đối với các loài *Vibrio* nghiên cứu, chúng tôi tiến hành kiểm tra hoạt lực của chúng trong môi trường dịch thể. Chúng tôi bổ sung 200µl dịch ly tâm vi khuẩn 3 ngày tuổi vào 5ml môi trường SYEP dịch thể đã cấy 200µl dịch nhân giống của các chủng vi khuẩn kiểm định 1 ngày tuổi. Xác định khả năng sinh trưởng của các loài *Vibrio* có trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp đo OD ở bước sóng 610.0nm. Trong lô đối chứng thay việc bổ sung 200µl dịch ly tâm vi khuẩn 3 ngày tuổi bằng bổ sung 200µl môi trường MPA dịch thể đã vô trùng.

Kết quả thực nghiệm cho thấy: Các chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn kiểm định trong môi trường dịch thể. Các chủng ký hiệu 47Lm9, 55Lm1, BT88 là những chủng có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của các vi khuẩn kiểm định mạnh nhất. Loài *V. parahaemolyticus* bị ức chế mạnh nhất bởi các chủng vi khuẩn nghiên cứu. Tỷ lệ loài này bị ức chế dưới tác động của các chủng BT66, 55Lm1 và 47Lm9 lần lượt là

82,4%, 75,8% và 75,6%; Trong khi đó loài *V. vulnificus* bị ức chế ít nhất (sự sinh trưởng của nó chỉ giảm 10,4% so với đối chứng dưới tác động của chủng V33(1)).

4. Nghiên cứu khả năng ức chế các chủng *Vibrio* trên tôm *in vitro*

Để tiến hành thí nghiệm, chúng tôi chia tôm thành 4 lô với các bình thí nghiệm dung tích 1lít. Mỗi bình thí nghiệm có 500ml nước đầm nuôi tôm, 30 con tôm sú (*Penaeus monodon*) giống, 1ml dịch nhân giống 1 ngày tuổi của mỗi loài *Vibrio* gây bệnh (khoảng 10^7 tế bào/ml) và 1ml dịch nhân giống 1 ngày tuổi của mỗi chủng vi khuẩn tuyển chọn tương ứng (khoảng 10^9 tế bào/ml). Các lô thí nghiệm được đặt ở nhiệt độ phòng. Cho tôm ăn 6h một lần bằng thức ăn tổng hợp không chứa kháng sinh. Oxy được cung cấp liên tục trong quá trình thí nghiệm bằng máy sục khí. Quan sát và đếm số tôm sống sót ở các bình thí nghiệm trong mỗi lô.

Ghi chú: Lô 1: Đối chứng 1: Nuôi 30 tôm giống/1bình, không bổ sung vi khuẩn đối kháng cũng như vi khuẩn gây bệnh.

Lô 2: Đối chứng 2: Mỗi bình nuôi 30 tôm và được bổ sung bởi 1ml dịch nhân giống 1 ngày tuổi của mỗi loài Vibrio gây bệnh.

Lô 3: Đối chứng 3: Mỗi bình nuôi 30 tôm và được bổ sung bởi 1ml dịch nhân giống 1 ngày tuổi của mỗi chủng vi khuẩn tuyển chọn.

Lô 4: Thí nghiệm: Mỗi bình nuôi 30 tôm và được bổ sung 1ml dịch nhân giống Vibrio và 1 ml dịch nhân giống vi khuẩn tuyển chọn tương ứng.

Kết quả thực nghiệm cho thấy: Sau 3 ngày thí nghiệm cả 4 lô thí nghiệm đều có tỷ lệ tôm sống sót là 100%, nhưng đến ngày thứ 5 đã có sự phân hoá rõ rệt về tỷ lệ sống sót của tôm ở các lô. Lý do là lúc này các vi khuẩn gây bệnh đã đủ thời gian ủ bệnh và phát bệnh trên tôm làm cho tôm thí nghiệm bị chết.

Ở lô1: Khi không bổ sung các vi khuẩn , tỷ lệ sống sót của tôm là 93,3%. Có 6,7% số tôm bị chết là do tỷ lệ chết tự nhiên của tôm giống.

Ở lô 2: Dưới tác động riêng rẽ của từng loài *Vibrio* tỷ lệ sống sót của tôm rất thấp từ 10% (dưới tác động của *V. parahaemolyticus*) đến 63,3% (dưới tác động của *V. cholerae*).

Ở lô 3: Dưới tác động riêng rẽ của từng chủng vi khuẩn tuyển chọn, tỷ lệ sống sót của tôm rất khác nhau, dao động từ 16,7% đến 100%.

Trong lô 4: Khi bổ sung các chủng vi khuẩn tuyển chọn vào môi trường nuôi tôm đã bị nhiễm các loài *Vibrio,* dưới tác động của các chủng BT66, BT88, BT92 và V36(2) tỷ lệ sống sót của tôm cũng thấp, chỉ lần lượt là 16,7%, 16,7%, 20% và 56,7%. Dưới tác động của các chủng V33(1), 47Lm6, 47Lm9 và 55Lm1 tỷ lệ sống sót của tôm lần lượt là 80%, 70%, 76,7% và 66,7%. So sánh với đối chứng (lô bị nhiễm *Vibrio*) tỷ lệ tôm sống sót dưới tác động của các chủng V33(1), 47Lm6, 47Lm9 và 55Lm1 tăng lần lượt là 33.3%, 20%, 26,7 và 6;7%

So sánh kết quả giữa 4 lô thí nghiệm chúng tôi rút ra những nhận xét như sau:

(+) Các chủng BT66, BT88, BT92 và V36(2) không có tác dụng ức chế các *Vibrio* gây bệnh trên tôm *in vitro*. Thậm chí, các chủng vi khuẩn này còn làm tăng tỷ lệ chết của tôm thí nghiệm. Điều này có thể được giải thích là do các chủng vi khuẩn này có thể đã gây bệnh cho tôm hoặc sản sinh ra các chất có khả năng gây độc làm chết tôm thí nghiệm.

(+) Các chủng V33(1), 47Lm6, 47Lm9 và 55Lm1 đều có khả năng ức chế các *Vibrio in vitro*, giúp tôm có khả năng sống sót cao hơn dưới tác dụng của các loài *Vibrio* gây bệnh. Do vậy chúng tôi chọn 4 chủng vi khuẩn này để tiếp tục đi sâu nghiên cứu về các chỉ tiêu sinh lý và sinh hoá nhằm ứng dụng cho việc tạo chế phẩm probiotic phòng bệnh do *Vibrio* trên tôm nước lợ. Trong số 4 chủng vi khuẩn được tuyển chọn, chủng V33(1) có nguồn gốc từ rừng ngập mặn Giao Thuỷ (Nam Định), các chủng 47Lm6, 47Lm9 và 55Lm1 đều có nguồn gốc từ rừng ngập mặn Cần Giờ (TP. Hồ Chí Minh).

Một số nghiên cứu khác trên thế giới về khả năng đối kháng với *Vibrio in vitro* cũng có những kết quả tương tự như các kết quả nghiên cứu của Rengpipat và Rukpratanporn (1998) [8], của T. J. Abraham (2004) [1].

5. Khả năng phân giải một số hợp chất hữu cơ của 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu Khả năng phân giải một số enzim ngoại bào của các chủng nghiên cứu.

Kết quả thí nghiệm cho thấy cả 4 chủng vi khuẩn đều có khả năng phân giải tinh bột, cazein, gelatin nhưng không có khả năng phân giải bột giấy. Điều đó chứng tỏ cả 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có hoạt tính proteaza và amylaza ngoại bào mà không có hoạt tính xenlulaza ngoại bào. Với khả năng phân giải tinh bột và protein các chủng vi khuẩn tuyển chọn khi đưa

vào môi trường sẽ phân giải các vật chất hữu cơ trong môi trường có bản chất là prôtêin và tinh bột như các chất thải, các thức ăn thừa, các xác động thực vật,... làm giảm sự ô nhiễm môi trường nuôi tôm. Môi trường có thể sẽ trở nên sạch hơn, góp phần nâng cao sự sống sót của tôm.

Các chủng vi khuẩn chúng tôi nghiên cứu đều là các trực khuẩn Gram dương, sinh nội bào tử hình ovan, hô hấp hiếu khí. Sau 2 ngày nuôi ủ trên môi trường MPA thạch đĩa ở 30°C các chủng đều có khuẩn lạc hình tròn màu trắng đục, mép khuẩn lạc không nhẵn, bề mặt khuẩn lạc dẹp và hơi bóng. Dựa vào các đặc điểm trên đây, cả 4 chủng vi khuẩn đều được xếp vào chi *Bacillus*. Các chủng này đang được nghiên cứu phân loại đến loài để góp phần khẳng định tính an toàn của nó trong môi trường.

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã kiểm tra khả năng đối kháng với 6 loài *Vibrio* gây bệnh trên tôm của 448 chủng vi khuẩn và trong số đó thu được 67 chủng vi khuẩn thể hiện tính đối kháng với 6 loài *Vibrio* gây bệnh trên tôm nước lợ (chiếm 15,1%).

Trong số 67 chủng vi khuẩn này có 17 chủng vi khuẩn có hoạt tính ức chế mạnh sự sinh trưởng của các loài *Vibrio* nghiên cứu, nhưng chỉ có 4 chủng vi khuẩn kí hiệu là V33(1), 47Lm6, 47Lm9 và 55Lm1 trong số đó có đủ các tiêu chuẩn tuyển chọn để tạo chế phẩm probiotic phòng bệnh do *Vibrio* gây nên trên tôm nước lợ. Chúng ức chế các loài *Vibrio* gây bệnh khác nhau, không đối kháng lẫn nhau, có khả năng sinh trưởng và đối kháng với *Vibrio* trong môi trường nước lợ và làm tăng sự sống sót của tôm *in vitro*,,có khả năng sinh các enzim phân giải tinh bột và protein để loại bỏ các chất thức ăn thừa trong ao nuôi.

Cả 4 chủng nghiên cứu đều thuộc chi *Bacillus* - một nhóm vi sinh vật khá an toàn cho môi trường. Vì thế, chúng là các vi khuẩn tiềm năng để ứng dụng sản xuất probiotic cho nuôi trồng thủy hải sản. Các nghiên cứu khảo sát sâu hơn sẽ trình bày ởcác báo cáo khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

(1). Abraham T. J., Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae, NAGA Worldfish Center Quarterly, 2004, 27(3;4): 28-31.

(2). Celia R., Lavilla P., Leobert D. de la Pena and Demy D. C., Use of Bacteria as Biological Control Agent against Microbial Diseases in Shrimp (Penaeus monodon) and Crab (Scylla serrata) Hatcheries. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department Tigbauan 5021, Iloilo, Philippines.

(3). Guérard F., Queffelec, de la Broise D., Partial purification and characteriation of an endocellular aminopeptidase activity produced by a marine Vibrio sp. in the meeting entitled: Marine Microoganisms for Industry was held in Brest- France, 17- 19th Sept 1997: 91- 96.

(4). Laurence E., Application of probiotic in aquaculture. (www.alken-murray.com/probiotic_shrimp hatchery.htlm-10k).

(5). Moriarty D. J. W., Disease control in Shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial Biosystems, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, 1999. (ag.arizona.edu/azaqua/tilapia/tila_shrimp/moriarty.PDF)...❑

ĐỐT TRƯỚC ĐỂ PHÒNG CHỐNG CHÁY RỪNG

(Tiếp theo trang 103)

Ngoài ra hoạt động đốt trước cần được thực hiện theo những phương án đã được phê duyệt bởi các cơ quan chức năng có đủ chuyên môn và thẩm quyền.

6. Chu kỳ đốt trước và tỷ lệ diện tích đốt trước hàng năm: Chu kỳ đốt trước là khoảng thời gian lặp lại hoạt động đốt trước tính bằng năm. Chu kỳ đốt trước càng dài thì ảnh hưởng tiêu cực của nó đến hoàn cảnh sinh thái càng ít. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, chu kỳ đốt trước dài sẽ làm cho khối lượng vật liệu cháy tích tụ được tăng và nguy cơ cháy rừng cũng lớn lên, việc kiểm soát ngọn lửa trong đốt trước trở lên khó khăn. Vì vậy, người ta thường xác định chu kỳ đốt trước là khoảng thời gian dài nhất mà ngọn lửa trong đốt trước vẫn có thể kiểm soát được. Như vậy, chu kỳ đốt trước được quyết định trên cơ sở phân tích quy luật tích tụ vật liệu cháy và sự phụ thuộc của cường độ cháy vào khối lượng vật liệu. Theo hướng dẫn của Cục Kiểm lâm thì chu kỳ đốt trước được xác định chung cho các loại rừng là khoảng 5-6 năm và tỷ lệ diện tích đốt trước hàng năm là khoảng 15-20%. Tuy nhiên, nghiên cứu ở Tây Nguyên cho thấy, trong điều kiện cực kì khô hạn ở đây thì chu kì đốt trước được xác định là 3-4 năm với rừng khộp và 4-5 năm với rừng thông. Như vậy, tỷ lệ diện tích đốt trước hàng năm với rừng khộp khoảng 25-30% còn với rừng thông là 20-25%.❑