

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN  
CÓ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC TRONG TẠO CHẾ PHẨM NUÔI TÔM SÚ**

SEPARATING AND SELECTING SOME STRAINS OF BACTERIA  
WITH PROBIOTIC PARTICULARITY IN CREATING PRODUCTS FOR SHRIMP FARMING

**Khuất Hữu Thanh<sup>1</sup>, Nguyễn Đăng Phúc Hải<sup>1</sup>, Bùi Văn Đạt<sup>1</sup>, Võ Văn Nha<sup>2</sup>**

1. Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

2. Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III, Nha Trang

**TÓM TẮT**

Tôm đông lạnh xuất khẩu chiếm tỷ trọng lớn trong xuất khẩu thủy sản ở nước ta. Hiện nay nghề nuôi tôm ở nước ta đang gặp rất nhiều khó khăn, do tôm bị chết hàng loạt ở diện rộng. Nghiên cứu tạo các chế phẩm sinh học hiệu quả, nhằm tăng khả năng đề kháng bệnh của tôm nuôi là vấn đề cấp bách hiện nay.

Vi khuẩn lactic và vi khuẩn bacillus là những vi khuẩn có đặc tính probiotic được sử dụng nhiều trong các chế phẩm sinh học cho người và động vật. Từ các mẫu đất ao nuôi tôm, phân giun làm thức ăn nuôi tôm, từ đường tiêu hóa của tôm chúng tôi đã phân lập được 60 chủng vi khuẩn lactic và bacillus. Trong đó 18/32 chủng vi khuẩn lactic và 12/28 chủng vi khuẩn bacillus có hoạt tính đối kháng vi khuẩn *Vibrio* và vi khuẩn kiểm định. Trong nghiên cứu này đã xác định trình tự 16 S rRNA của các chủng LPG 5, LRT8, BaD và BaRT. Chủng LPG 5 tương đồng 100% với *Lactobacillus acidophilus* strain LH5, chủng LRT8 tương đồng 98% với *Lactobacillus helveticus* strain IMAU40107, chủng BaD tương đồng 100% với *Bacillus subtilis* strain EBS05, chủng BaRT tương đồng 97% với *Bacillus* sp. strain RSP-GLU.

Chế phẩm probiotic tạo được có hiệu quả tăng sức kháng bệnh của tôm sú ở điều kiện thí nghiệm, tỷ lệ tôm sống tăng khoảng 15%, trọng lượng tôm 120 ngày tuổi tăng khoảng 13% so với đối chứng.

**ABSTRACT**

Export of frozen shrimp constitutes a large proportion of the seafood export of our country. However, currently the shrimp-farming in our country is facing a lot of difficulties due to the loss of shrimps on a large scale. So, research on producing efficient biological products in order to improve the resistant ability of shrimps is now of great significance.

Lactic acid and bacillus bacteria with a probiotic particularity are widely used in bio-products for human and animals. We have isolated 60 strains of lactic acid bacteria and bacillus bacteria from the samples of shrimp ponds, the worm's muck for shrimp's food, and digestive tract of shrimp. As a result, 18/32 strains of lactic acid bacteria and 12/28 strains of bacillus bacteria showed an active resistance to *Vibrio* bacteria and testing bacteria.

In this study, partial sequence of 16S rRNA of the 4 strains: LPG 5, LRT8, BaD and BaRT were defined. Strain LPG 5 have the similarity rate of 100% to *Lactobacillus acidophilus* strain LH5, strain LRT8's similarity rate is of 98% to the *Lactobacillus helveticus* strain IMAU40107, strain BaD is of 100% to *Bacillus subtilis* strain EBS05, and the strain BaRT is of 97% to the strain *Bacillus* sp. strain RSP-GLU.

The probiotic product created has an increase on the disease resistance effectiveness of shrimp in experimental conditions; the shrimp's living rate rose to around 15%, the weight of the 120 days of age shrimp increased by 13% compared to the control experiment.

**I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Nuôi tôm xuất khẩu là ngành kinh tế mũi nhọn ở nước ta hiện nay, mỗi năm xuất khẩu tôm đạt khoảng 3 tỷ USD chiếm 40% tổng giá

trị thủy sản xuất khẩu. Năm 2008, xuất khẩu tôm đạt trên 4 tỷ USD. Năm 2009 các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long phát triển diện tích

nuôi tôm sú lên 566.000 ha, tăng 27.000 ha so năm 2008.

Mấy năm gần đây, có hiện tượng tôm nuôi bị chết hàng loạt trên diện rộng ở nhiều địa phương, gây tổn thất lớn trong nuôi tôm xuất khẩu. Nguyên nhân chính của hiện tượng tôm chết hàng loạt chủ yếu do môi trường ao nuôi bị ô nhiễm và dịch bệnh. Nước ao nuôi tôm kém chất lượng làm cho các loại vi khuẩn, virus gây bệnh tôm phát triển làm cho tôm còi cọc, chậm lớn, tỷ lệ tôm chết hàng loạt cao.

Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học có khả năng tăng sức kháng bệnh của tôm sú, hạn chế dịch bệnh trong nuôi tôm, tăng năng suất và hạ giá thành sản phẩm là vấn đề quan trọng, góp phần phát triển nghề nuôi tôm bền vững ở nước ta.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nguyên vật liệu

Nguyên liệu được sử dụng để phân lập vi khuẩn Probiotic gồm mẫu đất lấy từ các ao đang nuôi tôm sú tại Nha Trang (Khánh Hòa), Đồ Sơn (Hải Phòng); từ phân giun nuôi làm thức ăn nuôi tôm, mẫu tách từ hệ thống tiêu hóa của tôm sú.

Vi sinh vật kiểm định để thử hoạt tính kháng khuẩn gồm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *E.coli* K12TG1 từ bộ sưu tập chủng giống của Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm Đại học Bách khoa Hà Nội. Các chủng *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* do phòng thí nghiệm Bệnh Thủy sản, Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III cung cấp.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn theo phương pháp pha loãng liên tục trên môi trường thạch: môi trường MRS đối với vi khuẩn lactic, môi trường NB cho vi khuẩn *Bacillus* [6].

- Nhân sinh khối vi khuẩn lactic với các loại môi trường: 1- môi trường MRS cải tiến; 2- 70% môi trường (MRS) + 30% nước chiết cà chua; 3- 50% môi trường (MRS) + 50% nước chiết cà chua, nhân sinh khối vi khuẩn *bacillus* bằng môi trường NB [5,6].

- Xác định hoạt tính xenlulaza, protease và amylaza theo phương pháp khuếch tán trên thạch [6].

- Thử hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch [6].

- Xác định sinh khối vi sinh vật bằng phương pháp pha loãng tới hạn, đo OD 620 nm [5,6]

- Tạo chế phẩm từ sinh khối vi sinh vật đã tuyển chọn trộn với phụ gia, sấy ở các chế độ nhiệt và các thiết bị sấy chân không, sấy nhiệt độ thấp theo các kỹ thuật thường quy phòng thí nghiệm.

Đánh giá hiệu quả chế phẩm ở qui mô thí nghiệm thực hiện trong bể kính và bể composit, tại phòng thí nghiệm ươm của Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III. Tỷ lệ chế phẩm bổ sung 5g/kg, 10g/kg, 15g/kg thức ăn nuôi tôm, cho tôm ăn hàng ngày. Đánh giá tỷ lệ sống, khả năng tăng trưởng theo phương pháp thống kê sinh học.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh và có hại ở tôm sú

Từ các mẫu vật đã phân lập và tuyển chọn được 60 chủng vi khuẩn, gồm 32 chủng thuộc chi *Lactobacillus* và 28 chủng thuộc chi *Bacillus*. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn thu được 18/32 chủng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và 12/28 chủng thuộc chi *bacillus* có hoạt tính kháng khuẩn, trong đó 5 chủng có hoạt tính đối kháng mạnh với một số loại vi khuẩn gây bệnh và có hại cho tôm sú, kí hiệu: LPG 5, LRT 8, LRT 2, LD 2 và LPT 3 (bảng 1)

Bảng 1 cho thấy, chủng vi khuẩn lactic kí hiệu LPG5 có khả năng đối kháng 80% số loại vi sinh vật kiểm định, trong đó có 2 chủng vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm ở tôm là *V. parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*. Các chủng vi khuẩn lactic nghiên cứu đều có khả năng đối kháng vi khuẩn *Bacillus cereus*, nhưng không có khả năng đối kháng vi khuẩn *E. coli* K12TG, kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây [3,4].

Bảng 1. Khả năng đối kháng vi khuẩn kiểm định của một số chủng vi khuẩn lactic.

T	Vi sinh vật kiểm định	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)				
		LPG 5	LRT 8	LRT 2	LD2	LPT 3
1	<i>V.pahaemolyticus</i>	17,5	16,5	17,0	16,5	-
2	<i>V.alginolyticus</i>	16,5	-	15,0	-	16,0
3	<i>B. cereus</i>	16,0	14,0	13,0	15,0	12,5
4	<i>S. aureus</i>	13,5	-	-	-	14,5
5	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-

Các chủng vi khuẩn lactic có khả năng đối kháng khác nhau với vi khuẩn kiểm định, có thể do hàm lượng acid lactic sinh ra khác nhau hoặc bản chất các chất kháng khuẩn ở các vi khuẩn lactic khác nhau [1÷3].

Thử nghiệm khả năng đối kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. cho thấy, trong số 28 chủng vi khuẩn phân lập được có 12 chủng có hoạt tính kháng khuẩn.

Bảng 2. Khả năng đối kháng vi kiểm định của một số chủng vi khuẩn *Bacillus*

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

Kết quả thử hoạt tính đã lựa chọn được 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* kí hiệu BaD, BaPG và BaRT có khả năng đối kháng tương đối mạnh với các vi sinh vật kiểm định (bảng 2).

**3.2 Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính enzyme phân hủy các chất hữu cơ**

Hiệu quả của chế phẩm vi sinh phụ thuộc không chỉ ở hoạt tính kháng khuẩn, còn phụ thuộc rất nhiều vào hoạt tính enzyme của các chủng vi sinh vật trong chế phẩm. Trong các chế phẩm probiotic sử dụng trong nuôi tôm, các enzyme của vi sinh vật có ích trong ruột tôm có tác dụng hỗ trợ tiêu hóa, tăng hiệu quả chuyển hóa thức ăn. Mặt khác một phần vi sinh vật có ích trong chế phẩm có tác dụng phân hủy các chất hữu cơ dư thừa, góp phần cải thiện môi trường nuôi.

Kết quả bảng 3 cho thấy chủng vi khuẩn lactic kí hiệu LPG 5 có hoạt tính cả 3 loại enzyme amylase, protease và cellulose tương đối cao (D-d > 20,5 mm); chủng LRT 8 có hoạt tính cao ở 2 loại enzyme amylase và protease. Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* kí hiệu BaD, BaPG và BaRT có hoạt tính tương đối cao ở đồng thời cả 3 loại enzyme.

Bảng 3. Một số chủng vi khuẩn có hoạt tính enzyme cao

	Hoạt tính amylase (D-d) mm	Hoạt tính protease (D-d) mm	Hoạt tính cellulose (D-d) mm
LPG 5	23,6	24,5	20,5
LRT 2	-	21,5	-
LRT 8	21,5	23,0	-
LD 2	-	22,0	-
LPT 3	-	-	23,5
BaD	22,0	23,5	18,5
BaPG	19,5	24,5	16,5
BaRT	20,5	22,0	21,5

**3.3 Nghiên cứu, định tên các chủng vi khuẩn đã lựa chọn bằng kỹ thuật phân tử**

Bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi có trình tự: Mồi xuôi F 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3' và mồi ngược R: 5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3' (Hãng Alpha DNA, Canada), chúng tôi đã phân lập được gen gen mã hóa đoạn gen 16 S RNA của 5 chủng vi khuẩn đã được lựa chọn: LPG 5, LRT 8, BaD, BaPG và BaRT. Từ kết quả giải trình tự gen (hãng Macrogen, Hàn Quốc) và so sánh bằng chương trình BLAST/NCBI đã định tên đến loài các chủng nghiên cứu:

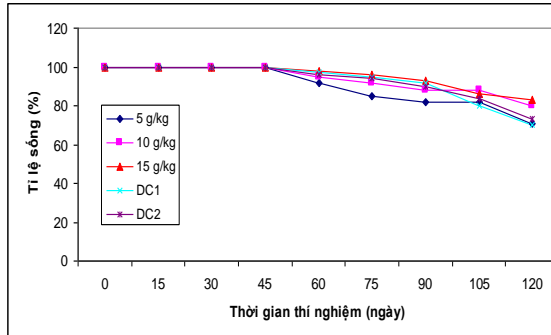
- Chủng LPG 5 tương đồng 100% với *Lactobacillus acidophilus* strain LH5.
- Chủng LRT8 tương đồng 98% với *Lactobacillus helveticus* strain IMAU40107.
- Chủng BaD tương đồng 100% với *Bacillus subtilis* strain EBS05.
- Chủng BaRT tương đồng 97% với *Bacillus* sp. strain RSP-GLU.

Dựa trên các kết quả nghiên cứu và định tên, cho thấy các chủng vi khuẩn được lựa chọn thuộc nhóm vi sinh vật được sử dụng trong các chế phẩm sinh học, chúng tôi lựa chọn 5 chủng vi khuẩn: LPG 5, LRT 8, BaD, BaPG và BaRT

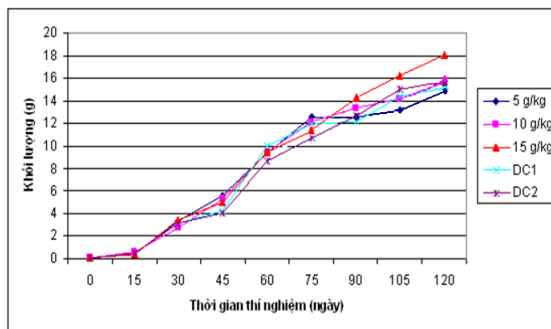
làm các chủng giống để tạo chế phẩm probiotic sử dụng trong nuôi tôm sú thâm canh.

### 3.4 Thử nghiệm chế phẩm trong nuôi tôm sú ở quy mô thí nghiệm

Kết quả thí nghiệm cho tôm sú thí nghiệm ăn thức ăn có bổ sung chế phẩm cho thấy: Tỷ lệ tôm sống tăng so với đối chứng khoảng 15%, tăng trọng của tôm so với đối chứng tăng trung bình 2g/1con, tăng khoảng 13% (hình 1,2).



Hình 1. Tỷ lệ sống của tôm sú nuôi thương phẩm trong điều kiện phòng thí nghiệm



Hình 2. Khả năng tăng trưởng của tôm sú nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả nghiên cứu chứng tỏ sử dụng chế phẩm probiotic có khả năng tăng khả năng đề kháng bệnh tật ở tôm sú thí nghiệm, làm tăng tỷ lệ sống cũng như tăng khả năng sinh trưởng của tôm nuôi.

### IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 32 chủng vi khuẩn lactic và 28 chủng vi khuẩn *Bacillus*. Trong đó 18 chủng vi khuẩn lactic và 12 chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính kháng khuẩn. Các chủng vi khuẩn kí hiệu LPG 5, LRT 8, BaD, BaPG và BaRT đồng thời có hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính enzyme cao được lựa chọn để tạo chế phẩm probiotic.

Các chủng vi sinh vật được lựa chọn tạo chế phẩm đã được định tên đến loài bằng kỹ thuật phân tử:

- Chủng LPG 5 tương đồng 100% với *Lactobacillus acidophilus* strain LH5.

- Chủng LRT8 tương đồng 98% với *Lactobacillus helveticus* strain IMAU40107.

- Chủng BaD tương đồng 100% với *Bacillus subtilis* strain EBS05.

- Chủng BaRT tương đồng 97% với *Bacillus* sp. strain RSP-GLU.

Chế phẩm probiotic tạo được có hiệu quả tăng sức kháng bệnh của tôm sú ở điều kiện thí nghiệm, tỷ lệ tôm sống tăng khoảng 15%, trọng lượng tôm 120 ngày tuổi tăng khoảng 13% so với đối chứng, các chỉ số môi trường nuôi tôm ổn định.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adnan Tamime and at all (Ed); Probiotic Dairy Products; Blackwell Publishing Ltd, 2005.
2. Bromberg R., Moreno I., Delboni R.R., Cintra H.C and Oliveira P.T.V.; Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. cremoris CTC 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef; *Microbiol & Biotechnol*; 21, pp.351–358, 2005.
3. 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*; Tập 5, số 3: 383-390, 2007.
4. Kozasa M.; Probiotics in animal use in JaPan; *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 8(2).517, 1998.
5. Seppo Salminen and at all (Ed); *Lactic Acid Bacteria*; Marcel Dekker; Inc. 2004.
6. Trần Linh Thuộc; Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm; NXB Giáo dục, 2003

Địa chỉ liên hệ: Khuất Hữu Thanh – Tel: 0913.270.603, Email: thanhkh-ibft@mail.hut.edu.vn  
Viện CNSH & CNTP, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội