

PHÂN LẬP CÁC CHỦNG PROBIOTICS CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH TRÊN TÔM

ISOLATION AND SCREENING OF PROBIOTICS RESISTANT TO *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* - CAUSING ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS IN FARMED SHRIMP

Nguyễn Thị Thúy¹, Nguyễn Thị Minh Xuân^{1*}

¹Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng

*Tác giả liên hệ: ntmxuanbk@gmail.com

(Nhận bài: 04/9/2020; Chấp nhận đăng: 15/11/2020)

Tóm tắt - Hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (AHPNS) do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra trên tôm có thể dẫn đến việc tôm chết hàng loạt một cách nhanh chóng. Đây là nguyên nhân hàng đầu gây thiệt hại nặng nề cho nuôi trồng thủy sản. Hiện nay, sử dụng lợi khuẩn - probiotics để thay thế kháng sinh trong việc kiểm soát, tiêu diệt các chủng vi sinh vật gây bệnh ở nuôi trồng thủy sản là hướng nghiên cứu có giá trị thực tiễn cao. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã phân lập và sàng lọc được 5 chủng từ dưa cải và dịch tôm chua có khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và đối kháng trực tiếp. Từ những đặc tính sinh lý, sinh hóa cho thấy các chủng thu được có khả năng là vi khuẩn lactic, một đại diện đặc trưng của probiotics. Tuy nhiên, những nghiên cứu, thí nghiệm đánh giá sâu hơn về các chủng vi khuẩn này cần được tiến hành trước sử dụng chúng để sản xuất làm chế phẩm bổ sung vào thức ăn nuôi tôm.

Từ khóa – Probiotics; tôm chua; *Vibrio parahaemolyticus*; hoại tử gan tụy cấp tính; hội chứng chết sớm.

1. Đặt vấn đề

Nuôi tôm là một trong những ngành công nghiệp lớn, đóng góp vào sự phát triển kinh tế của khu vực ven biển Việt Nam, với giá trị xuất khẩu 3,4 tỉ đô la vào năm 2019. Ngành công nghiệp này đạt được sự phát triển mạnh mẽ, chỉ trong vòng 10 năm từ năm 2005, đến nay nó đã vươn lên đứng hàng thứ 3 trong thị trường xuất khẩu tôm của thế giới, chỉ sau Thái Lan và Ấn Độ. Chính phủ Việt Nam đã đề xuất một chiến lược tham vọng nhằm đưa tổng giá trị xuất khẩu tôm lên 10 tỉ đô la vào năm 2025 [1]. Tuy nhiên, ngành nuôi tôm là một ngành nhiều rủi ro do hạn hán, thiếu sự điều hành và dịch bệnh.

Bệnh do vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra là một dịch bệnh nguy hiểm ở tôm, có thể gây chết hàng loạt và là nguyên nhân chính gây thiệt hại về kinh tế cho các nông trại tôm trên toàn thế giới. Trong đó nguy hiểm nhất là bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (viết tắt là AHPNS) do *Vibrio parahaemolyticus* gây nên. Sử dụng kháng sinh để ngăn ngừa và điều trị nhiễm khuẩn *Vibrio* đã được áp dụng ở nhiều nơi trên thế giới, trong đó có cả Việt Nam [2]. Việc lạm dụng kháng sinh đã dẫn tới sự xuất hiện của các chủng kháng kháng sinh với tỉ lệ cao ở nhiều nơi trên thế giới như Thái Lan, Ấn Độ [3]. Sự xuất hiện ngày càng nhiều các chủng kháng sinh đã phát sinh một nhu cầu cấp

Abstract - Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS), caused by *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp can lead to the rapid mass death of farmed shrimps. This outbreak of disease is the leading cause of heavy losses in aquaculture. Using probiotics, as 'bio-friendly agents' in place of antibiotics for disease prevention in shrimp aquaculture has been developed recently. In this study, we have successfully isolated 5 species from pickled mustard green juice, fermented shrimp paste which have displayed the antagonistic ability against *Vibrio parahaemolyticus* by disk diffusion technique. These isolated species showed similar biochemical and biophysical characteristics to lactic acid bacteria as one of three common known probiotics. Nevertheless, a deeper investigation needs to be done before applying these species as a supplement of shrimp food.

Key words – Probiotics; shrimp paste; *V. parahaemolyticus*; AHPNS; EMS.

thiết trong việc tìm kiếm giải pháp thay thế cho việc ngăn ngừa và điều trị bệnh ở tôm.

Sử dụng probiotics, một nhân tố thân thiện với môi trường ví dụ như vi khuẩn lactic và *Bacillus* spp. để thay thế kháng sinh trong việc ngăn ngừa bệnh ở các hồ nuôi tôm đã được phát triển gần đây [4]. Probiotics là vi sinh vật không gây bệnh và không gây độc khi được nuôi cấy chung với các vật nuôi trong hồ thủy sản. Chúng có thể cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh và ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh này trong khi đó lại kích thích sự tăng trưởng của tôm mà không có tác dụng phụ không mong muốn nào [5].

Việc nghiên cứu và phát triển các sản phẩm có chứa các vi sinh vật có lợi, probiotics có khả năng ức chế sự phát triển và tiêu diệt các loài vi sinh vật gây bệnh và giúp cân bằng hệ vi sinh trong môi trường chăn nuôi thủy sản ngày càng được quan tâm chú ý. Tuy nhiên, số lượng chế phẩm probiotics ở nước ta còn hạn chế, đa phần được nhập ngoại và giá thành tương đối cao, việc thích ứng với điều kiện khí hậu ở Việt Nam của các chủng probiotics ngoại nhập còn chưa đảm bảo. Cho đến nay đã có nhiều nghiên cứu trong nước đã cho thấy, việc sử dụng các vi sinh vật có lợi đem lại hiệu quả xử lý cao, nhưng chưa tạo ra được nhiều chế phẩm giúp tôm kháng lại bệnh hoại tử

¹ The University of Danang - University of Sciences and Technology (Nguyen Thi Thuy, Nguyen Thi Minh Xuan)

gan tụy cấp tính tốt nhất. Vì thế việc phân lập và lựa chọn các chủng probiotics có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh AHPNS trên tôm và sản xuất thành chế phẩm vẫn còn là một vấn đề cấp thiết.

Thêm vào đó, nghiên cứu của nhóm tác giả cho thấy, bên cạnh những nguồn phân lập thường được quan tâm như hệ tiêu hóa hay nước hồ nuôi tôm [6, 7], sản phẩm truyền thống tôm chua Huế là một nguồn giống tiềm năng trong việc phân lập các chủng probiotics cho tôm. Đây là những nghiên cứu bước đầu trong việc tạo ra chế phẩm probiotics nhằm thay thế kháng sinh trong việc phòng bệnh gây ra bởi *Vibrio parahaemolyticus* cho tôm.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (*V.parahaemolyticus*) gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Các chủng vi sinh vật phân lập được từ dịch tiêu hóa của các loại tôm thẻ, dịch nước muối dưa cải, dịch nước tôm muối chua và nước hồ nuôi tôm tại Đà Nẵng.

2.1.2. Môi trường sử dụng nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy *V.parahaemolyticus*: pepton-kiềm: Cao thịt pepton 10g, NaCl 5g, nước cất vừa đủ 1000 mL, pH 8-8.5; Môi trường thạch thử kháng khuẩn sử dụng môi trường pepton-kiềm có bổ sung 2% agar [8].

Môi trường phân lập và nuôi cấy các chủng vi sinh vật: MRS (Man, Rogosa và Sharpe): Cao thịt 10g, cao nấm men 5g, cao thịt pepton 10g, D-glucose 20g, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 8.3g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.06g, Tween80 1ml, NaCl 15g, nước cất vừa đủ 1000 ml; Môi trường MRS-Agar sử dụng môi trường MRS và bổ sung 2% agar [6].

Các môi trường trên được hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút trước khi sử dụng.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập và làm thuần các chủng vi sinh vật.

Với mẫu tôm thẻ: Sử dụng tôm tươi sống thu thập ở chợ Hòa Khánh và hồ nuôi tôm ở thôn Trương Định trên địa bàn Đà Nẵng, sau khi mang về tôm được khử trùng bề mặt bằng cồn 70°, tách lấy hệ tiêu hóa ở phần ruột tôm, nghiền mịn với dung dịch NaCl 0,9%. Pha loãng đến các nồng độ thích hợp bằng dung dịch NaCl 0,9%. Ở mỗi nồng độ khác nhau hút 100µl dịch nổi cấy trải lên đĩa môi trường MRS-agar, nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ.

Với các mẫu từ môi trường nước hồ nuôi tôm, dịch dưa cải muối, dịch tôm muối chua: Pha loãng các dung dịch mẫu bằng dung dịch NaCl 0,9% đến nồng độ thích hợp. Tại mỗi nồng độ hút 100µl dịch nổi cấy trải lên đĩa môi trường MRS-agar, nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ.

Sau 24 giờ nuôi cấy, chọn các khuẩn lạc riêng lẻ có đặc điểm khác nhau, sau đó làm thuần trên môi trường MRS-agar. Sau khi làm thuần, tăng sinh các chủng thu được trong môi trường MRS lỏng, nuôi lắc ở 180v/p, 37°C trong 18 giờ. Các chủng sau khi nuôi cấy được bảo quản với Glycerol ở -20°C.

2.2.2. Khảo sát khả năng đối kháng của các chủng vi sinh thu được với *V. parahaemolyticus*

Sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch với một số thay đổi nhỏ để khảo sát khả năng đối kháng của canh trường sau nuôi cấy và đối kháng trực tiếp khuẩn lạc giữa các chủng vi sinh vật phân lập được với vi khuẩn *V.parahaemolyticus* [6].

Khảo sát khả năng đối kháng của canh trường: Sử dụng canh trường của vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường MRS lỏng sau 18 giờ. Hút 1 mL dịch canh trường vào ống eppendorf 1.5ml ly tâm 10.000 v/p, 5 phút, thu dịch nổi. Sử dụng dịch nổi để khảo sát khả năng đối kháng. Khả năng đối kháng giữa các chủng vi sinh thu được với vi khuẩn *V.parahaemolyticus* được xác định thông qua sự xuất hiện của các vòng đối kháng (vòng vô khuẩn) tại các vị trí được đánh dấu trên đĩa thạch.

Khảo sát khả năng đối kháng trực tiếp của khuẩn lạc: Sử dụng khuẩn lạc đã được thuần chủng để khảo sát. Sau 24 giờ cấy trải trên đĩa thạch ở 37°C, tiến hành đục lỗ thu khoan thạch có chứa khuẩn lạc của các chủng lợi khuẩn phân lập được. Khoan thạch có chứa lợi khuẩn này sẽ thay thế cho các lỗ thạch đã được đục ra trên các đĩa chứa vi khuẩn *V.parahaemolyticus* đã qua 24 giờ nuôi cấy ở 37°C. Sau đó, tiến hành đồng nuôi cấy trong 24 giờ ở 37°C. Khả năng đối kháng giữa các chủng vi sinh phân lập được với *V.parahaemolyticus* được thể hiện qua các vòng đối kháng xuất hiện trên đĩa thạch.

Đường kính vòng vô khuẩn được xác định bằng hiệu của đường kính ngoài vòng vô khuẩn trừ cho đường kính lỗ thạch.

Dựa vào sự xuất hiện của các vòng đối kháng trên đĩa thạch để lựa chọn các chủng vi sinh phân lập được có khả năng kháng lại vi khuẩn *V.parahaemolyticus*.

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 2 lần với tất cả các chủng vi sinh vật phân lập được.

2.2.3. Xác định một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi sinh vật được chọn

Xác định một số đặc điểm sinh hóa, sinh lý của các chủng vi sinh được lựa chọn bằng các thí nghiệm sau: Quan sát khuẩn lạc nuôi cấy trên đĩa thạch, nhuộm Gram, nhuộm vô nhầy, phản ứng catalase, phản ứng oxidase, khả năng di động và khả năng sinh bào tử [9].

Quan sát khuẩn lạc sau 24÷48 giờ nuôi cấy trên đĩa thạch. Tiến hành nhuộm Gram trên vi khuẩn sau nuôi cấy trong môi trường lỏng. Nhuộm bào tử của khuẩn lạc sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường MRS-agar. Nhuộm vô nhầy của khuẩn lạc sau 24÷48 giờ nuôi cấy. Sử dụng dung dịch H_2O_2 30% để kiểm tra hoạt tính catalase và dung dịch tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1% để kiểm tra hoạt tính oxidase. Khả năng di động của các chủng vi sinh được xác định bằng các đối chứng 2 phương pháp: Nuôi cấy trên môi trường bán rắn (MRS +0.35% agar) và quan sát sự di động dưới kính hiển vi bằng phương pháp giọt treo ngược.

2.2.4. Khảo sát khả năng đối kháng giữa các chủng được chọn

Sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch để khảo sát khả năng đối kháng giữa các chủng vi sinh được chọn. Kiểm tra sự đối kháng, cạnh tranh giữa các vi khuẩn phân

lập được để lựa chọn những hỗn hợp chủng khi phối trộn với nhau có thể làm tăng hoạt tính kháng khuẩn với vi khuẩn gây bệnh *V.parahaemolyticus*.

2.2.5. Khảo sát khả năng đối kháng của các hỗn hợp chủng sau khi phối trộn với *V.parahaemolyticus*

Sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch để tiến hành khảo sát khả năng đối kháng của các hỗn hợp chủng thu được với vi khuẩn *V.parahaemolyticus*.

Tiến hành phối trộn các hợp hỗn chủng trong môi trường MRS lỏng, nuôi cấy trong 18 giờ ở 37°C, lắc 180v/p. Sau đó, sử dụng dịch nuôi cấy để khảo sát khả năng kháng lại *V.parahaemolyticus* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch tương tự như khảo sát các chủng đơn lẻ ban đầu.

2.2.6. Xử lý số liệu

Các số liệu về kích thước của hình ảnh được đo đạt bằng phần mềm ImageJ 1.52a.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập các chủng vi sinh vật

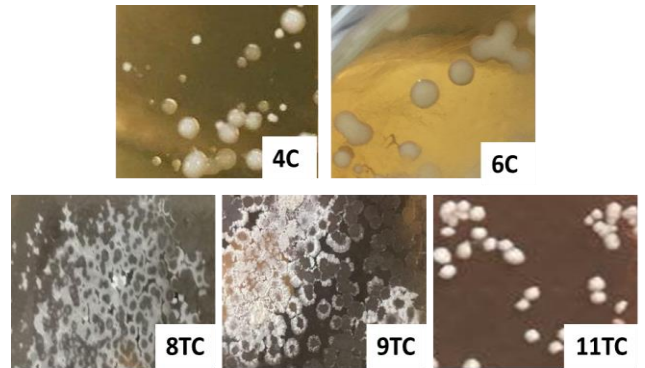
Vi khuẩn probiotics khá phổ biến trong tự nhiên, việc lựa chọn các nguồn phân lập có khả năng thu nhận vi khuẩn probiotics là yếu tố cần nhắc đầu tiên khi tiến hành nghiên cứu. Ở đây, nhóm tác giả sử dụng dịch dưa cải muối lên men, môi trường có tính acid sẽ cho khả năng phân lập ra các vi khuẩn lactic cao; Lựa chọn hệ tiêu hóa của tôm sống thì khả năng sẽ có sự hiện diện của các vi khuẩn có lợi giúp tôm nâng cao sức đề kháng. Ngoài ra, dịch tôm muối chua đã được sử dụng cho việc phân lập probiotics ứng dụng trong các sản phẩm lên men [10], tuy nhiên nhóm tác giả chưa ghi nhận có nghiên cứu nào sử

dụng chúng như nguồn probiotics cho tôm.

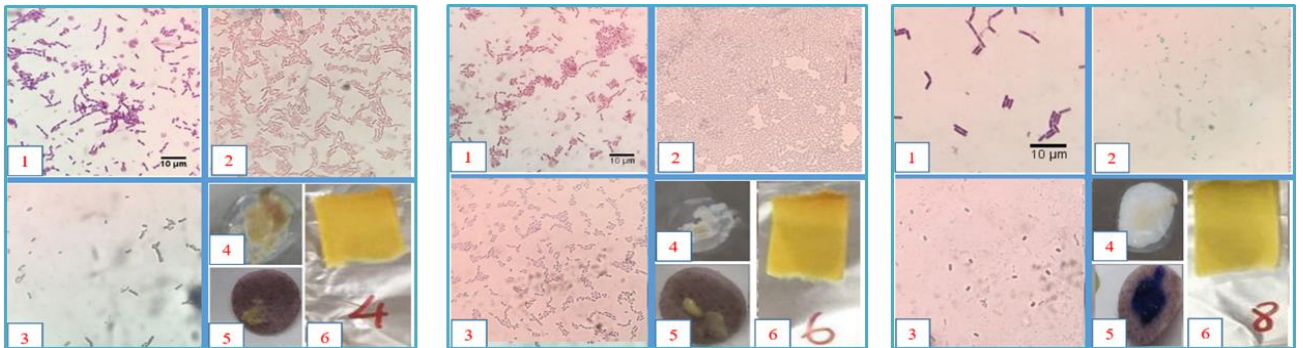
Từ các nguồn mẫu, qua quá trình phân lập thu nhận được 12 chủng vi sinh vật có đặc điểm hình thái khác nhau gồm: 3 chủng 1T, 2T, 3T được phân lập từ hệ tiêu hóa của tôm thẻ; 5 chủng 7TC, 8TC, 9TC, 10TC, 11TC được phân lập từ dịch tôm muối chua; 3 chủng 4C, 5C, 6C được phân lập từ dịch nước dưa cải muối chua; Và chủng 12N từ nước hồ nuôi tôm.

3.2. Lựa chọn các chủng phân lập được có khả năng đối kháng với *V.parahaemolyticus*, vi khuẩn gây bệnh trên tôm

Sau khi phân lập và làm thuần các chủng vi sinh vật, tiến hành tăng sinh và sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch để khảo sát khả năng đối kháng giữa các chủng vi sinh vật phân lập được với vi khuẩn *V.parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm.



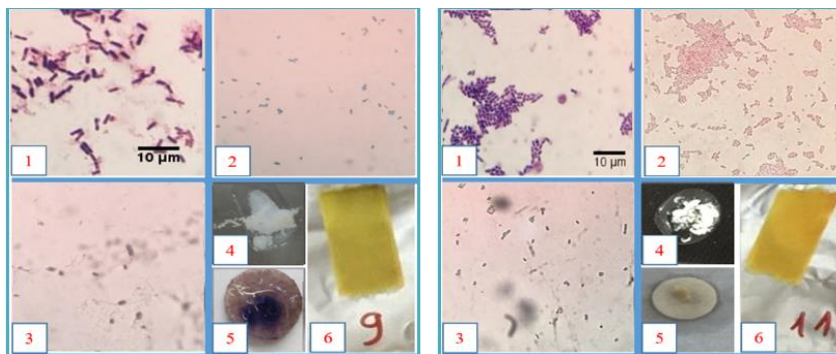
Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc các chủng kháng *V.parahaemolyticus* phân lập được. 4C và 6C phân lập được từ dịch muối chua dưa cải; 8TC, 9TC, 11TC phân lập được từ dịch tôm chua



Hình 2a. Đặc điểm vi khuẩn 4C

Hình 2b. Đặc điểm vi khuẩn 6C

Hình 2c. Đặc điểm vi khuẩn 8TC



Hình 2d. Đặc điểm vi khuẩn 9TC

Hình 2e. Đặc điểm vi khuẩn 11TC

Hình 2. Một số đặc điểm của 5 chủng vi sinh vật được chọn: (1) Nhuộm gram; (2) Nhuộm bào tử; (3) Nhuộm vỏ nhầy; (4) Hoạt tính catalase; (5) Hoạt tính oxidase; (6) pH canh trường sau nuôi cấy

Nhóm tác giả tiến hành khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh cho tôm *V.parahaemolyticus* bằng dịch sau nuôi cấy của các chủng vi khuẩn phân lập được, đã được làm thuần trong môi trường MRS lỏng. Đề loại trừ khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh liên quan đến pH thấp của dịch sau nuôi cấy do sự tạo thành các acid hữu cơ, pH của dịch sau nuôi cấy này được kiểm tra bằng giấy quỳ. Kết quả ở Hình 2 cho thấy, không có sự thay đổi pH đáng kể nào của dịch sau nuôi cấy so với môi trường trước nuôi cấy (pH 6.5-6.8). Vì vậy, nhóm tác giả đã không tiến hành trung hòa dịch sau nuôi cấy trước khi khảo sát sự đối kháng bằng dịch canh trường. Ngoài ra, một vài chủng vi khuẩn có khả năng ức chế hoặc gia tăng khả năng ức chế vi khuẩn đối kháng chỉ khi có sự tồn tại của vi khuẩn đối kháng. Đề gia tăng khả năng phân lập được các chủng lợi khuẩn, nhóm tác giả tiến hành khảo sát sự đối kháng giữa các chủng vi sinh phân lập với *V.parahaemolyticus* bằng khuẩn lạc.

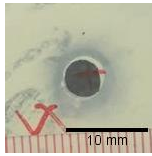
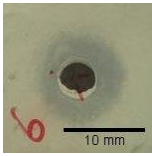
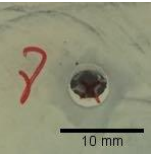
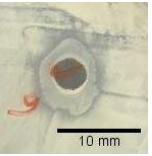
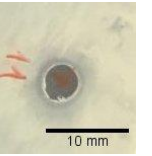
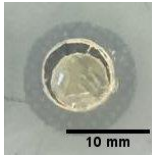
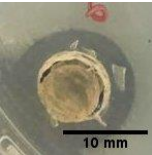
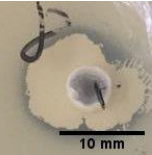
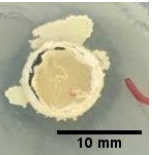
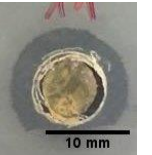
Sau khi làm thuần, ghi nhận có 5/12 chủng có khả năng đối kháng với *V.parahaemolyticus*. Trong đó, 2 chủng 4C, 6C được phân lập từ dịch nước muối dưa cải và 3 chủng 8TC, 9TC, 11TC được phân lập từ dịch tôm muối chua. Hình ảnh và đặc điểm khuẩn lạc các chủng phân lập được thể hiện ở Hình 1, Bảng 1.

Các thí nghiệm cho thấy, khả năng đối kháng của các chủng vi sinh phân lập được với vi khuẩn gây bệnh *V.parahaemolyticus* đều được thể hiện qua các vòng đối

kháng trên đĩa thạch ở cả 2 phương pháp đối kháng bằng canh trường và đối kháng trực tiếp khuẩn lạc. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 1.

Khảo sát sự đối kháng giữa các chủng vi sinh phân lập với *V.parahaemolyticus* bằng dịch nuôi cấy cho kết quả đường kính các vòng đối kháng từ 3,8 mm đến 6,7 mm, và đối kháng bằng khuẩn lạc cho vòng đối kháng từ 5,6 mm đến 6,8 mm. Nhìn chung, các chủng vi khuẩn đều cho đường kính vòng đối kháng bằng khuẩn lạc lớn hơn và trong suốt hơn so với vòng đối kháng bằng canh trường. Kết quả này có thể được giải thích do nồng độ chất ức chế vi khuẩn gây bệnh *V.parahaemolyticus* được tạo thành xung quanh các khoang thạch chứa khuẩn lạc của các lợi khuẩn cao hơn so với nồng độ của chúng trong canh trường sau nuôi cấy. Ngoài ra, đối với các chủng vi khuẩn 8TC và 9TC, do có khả năng tạo bào tử và di động (Bảng 2), chúng sẽ ăn lan ra bề mặt thạch có chứa vi khuẩn gây bệnh, dẫn đến khả năng ức chế sự sinh trưởng của *V.parahaemolyticus* ở diện tích lớn hơn khi được cho đối kháng bằng khuẩn lạc. Tuy nhiên, nhóm tác giả không loại trừ khả năng, nguyên nhân có thể do sự kích thích từ vi khuẩn gây bệnh. Những hạn chế của các phương pháp nghiên cứu hiện có dẫn đến việc không thể kết luận cơ chế tạo nên sự khác biệt này. Mặc dù vậy, những kết quả này là rất quan trọng cho những nghiên cứu tiếp theo của nhóm tác giả, đặc biệt trong việc duy trì và gia tăng hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh ở các chế phẩm từ các chủng lợi khuẩn thu được này.

Bảng 1. Khả năng đối kháng giữa các chủng vi sinh phân lập được với *V.parahaemolyticus*

	4C	6C	8TC	9TC	11TC
Đối kháng bằng canh trường					
D-d	4.0	6.7	5.1	4.5	3.8
Đối kháng bằng khuẩn lạc					
D-d	5.6	6.3	6.8	6.5	6.33

D: đường kính vòng ngoài, d: đường kính lỗ thạch

Bảng 2. Một số đặc điểm của 5 chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng với *V.parahaemolyticus*

Đặc điểm		4C	6C	8TC	9TC	11TC
Khuẩn lạc (quan sát từ 24-48h nuôi cấy)		Hình tròn, màu trắng đục, bề mặt trơn bóng, mép phẳng đều	Hình tròn, màu trắng sữa, bề mặt trơn bóng, mép phẳng đều	Hình tròn, màu trắng đục, bề mặt sần sùi, mép dạng răng cưa	Hình tròn, màu trắng đục, bề mặt nhéo, nhô cao, mép dạng răng cưa	Hình tròn, màu trắng đục, bề mặt trơn bóng, mép phẳng đều
Hình thái vi khuẩn	Hình thái	Hình que, tồn tại đơn lẻ hoặc kết chuỗi ngắn	Hình que, tồn tại đơn lẻ hoặc kết chuỗi ngắn	Hình que, tồn tại đơn lẻ hoặc kết chuỗi ngắn	Hình que, tồn tại đơn lẻ	Hình que, tồn tại đơn lẻ
	Kích thước	(0.73 – 1.2) x (1.5 – 3) μ m	(0.71 – 1.02) x (1.5 – 3.3) μ m	(0.61 – 0.9) x (1.7 – 3.2) μ m	(0.8 – 1.2) x (1.9 – 3.7) μ m	(0.73 – 1.18) x (1.6 – 3.1) μ m
Sinh hóa	Nhuộm Gram	Gram dương	Gram âm	Gram dương	Gram dương	Gram dương
	Nhuộm bào tử	Không sinh bào tử	Không sinh bào tử	Có sinh bào tử	Có sinh bào tử	Không sinh bào tử
	Nhuộm vô nhậy	Có vô nhậy	Không có vô nhậy	Có vô nhậy	Có vô nhậy	Không có vô nhậy
Sinh lý	Hoạt tính Catalase	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Dương tính	Âm tính
	Hoạt tính oxidase	Âm tính	Âm tính	Dương tính	Dương tính	Âm tính
	Khả năng di động	Không di động	Không di động	Di động	Di động	Không di động

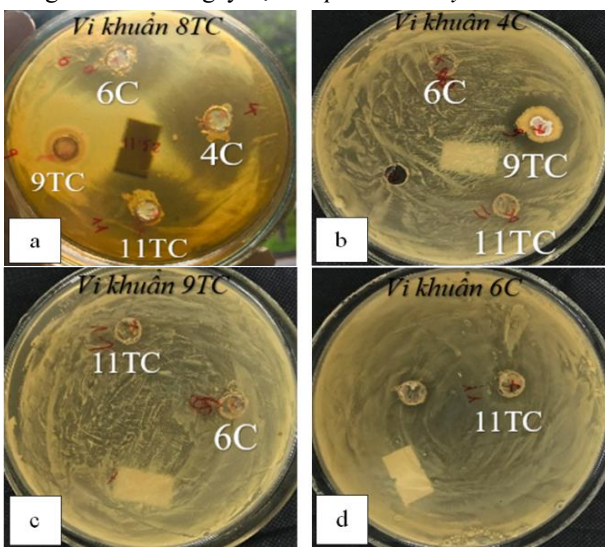
3.3. Xác định một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi sinh vật được chọn

Sau khi lựa chọn được các chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng với *V.parahaemolyticus*. Tiến hành xác định một số đặc điểm sinh hóa gồm các thí nghiệm nhuộm Gram, nhuộm vô nhầy, nhuộm bào tử, thử hoạt tính catalase, hoạt tính oxidase, khảo sát khả năng di động. Kết quả thu nhận được một số đặc điểm của 5 chủng vi sinh vật được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 2 dưới đây. Các kết quả này cho thấy, nhóm tác giả đã thu được 5 chủng vi sinh vật kháng *V.parahaemolyticus* khác nhau. Trong đó, chủng 4C và 11TC được phân lập từ 2 nguồn khác nhau nhưng đều có những đặc điểm tương tự nhau và là các đặc điểm của vi khuẩn lactic [10, 14]. Ngoài ra, các chủng 8TC và 9TC lại mang những đặc điểm sinh hóa và sinh lý tương tự như các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus spp.* [15, 16]. Tuy nhiên, việc định dạng bằng các phương pháp sinh học phân tử sẽ được tiến hành ở các nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định chính xác hơn các vi sinh vật phân lập được.

3.4. Khảo sát khả năng đối kháng lẫn nhau giữa các chủng được chọn

Để gia tăng sự đa dạng cho hệ vi sinh đường ruột cho tôm, tăng tỷ lệ đối kháng với các vi khuẩn gây bệnh và đảm bảo sự cân bằng hệ sinh thái môi trường khi sử dụng chế phẩm, việc phối trộn nhiều chủng vi sinh vật trong cùng một chế phẩm là điều cần thiết. Việc đồng nuôi cấy và sử dụng hỗn hợp các chủng cùng nhau sẽ giúp tăng khả năng đề kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính *V.parahaemolyticus* vừa đảm bảo ổn định hệ sinh thái môi trường [11, 12, 13]. Vì vậy, nhóm tác giả tiến hành đánh giá khả năng đối kháng giữa các chủng vi sinh vật phân lập được trước khi tiến hành đồng nuôi cấy.

Sử dụng phương pháp đối kháng trực tiếp bằng tế bào để khảo sát khả năng đối kháng lẫn nhau giữa các chủng vi sinh được chọn lọc, nhằm tìm ra các hỗn hợp chủng có khả năng chung sống với nhau và có thể gia tăng khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh *V.parahaemolyticus*.



Hình 3. Khả năng đối kháng lẫn nhau giữa các chủng vi sinh vật được lựa chọn

a: Đối kháng giữa 8TC với 4C, 6C, 9TC, 11TC; b: Đối kháng giữa 4C với 6C, 9TC, 11TC; c: Đối kháng giữa 9TC với 6C, 11TC; d: Đối kháng giữa 6C với 11TC

Bảng 3. Khả năng đối kháng lẫn nhau giữa các chủng vi sinh được chọn lọc

1	4C	6C	8TC	9TC	11TC
4C	-	√	x	x	√
6C	√	-	x	√	√
8TC	x	x	-	√	x
9TC	x	√	√	-	√
11TC	√	√	x	√	-

x: đối kháng với nhau (không thể sống chung)

√: Có thể sống chung với nhau

Sự đối kháng giữa các chủng được thể hiện trong Bảng 3 và Hình 3. Kết quả khảo sát cho thấy, chủng 8TC chỉ có thể sống chung với chủng 9TC, những chủng còn lại hầu như có thể chung sống cùng nhau.

3.5. Khảo sát khả năng đối kháng giữa các hỗn hợp chủng với vi khuẩn *V.parahaemolyticus*.

Tương tự các thí nghiệm khảo sát khả năng đối kháng của các chủng vi sinh vật đơn lẻ, các chủng vi khuẩn sau khi đồng nuôi cấy cùng nhau sẽ tiến hành khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính *V.parahaemolyticus* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Để đảm bảo việc so sánh khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh, các hỗn hợp chủng và các chủng đơn lẻ tương ứng được kiểm tra tính đối kháng trên cùng một đĩa thạch đã được nuôi cấy trải *V.parahaemolyticus*. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Đường kính vòng đối kháng của dịch canh trường sau đồng nuôi cấy các hỗn hợp chủng hoặc các chủng đơn lẻ tương ứng với *V.parahaemolyticus*

Hỗn hợp chủng	4C + 6C	4C + 11TC	6C + 9TC	6C + 11TC	8TC + 9TC	9TC + 11TC
	4,1	4,0	7,7	6,2	6,1	5,4
Chủng đơn lẻ	4C	4C	6C	6C	8TC	9TC
	4,2	4,1	6,9	7,0	5,7	4,3
Chủng đơn lẻ	6C	11C	9TC	11C	9TC	11TC
	7,1	3,7	4,6	3,9	4,3	3,6

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, có sự gia tăng khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh ở các hỗn hợp chủng (6C + 9TC), (8TC + 9TC), (9TC + 11TC) so với các chủng đơn lẻ tương ứng. Trong đó, hỗn hợp chủng 6C và 9TC cho ra đường kính vòng đối kháng là vượt trội hơn hẳn so với các chủng riêng lẻ và so với các hỗn hợp chủng khác. Các kết quả này cho thấy, tiềm năng tạo thành chế phẩm với hỗn hợp các chủng nhằm gia tăng khả năng ức chế *V.parahaemolyticus*.

4. Kết luận

Qua quá trình phân lập và sàng lọc nhóm tác giả đã thu nhận được 5 chủng vi sinh vật gồm: 4C, 6C, 8TC, 9TC, 11TC và 3 hỗn hợp chủng vi sinh vật gồm (6C + 9TC), (8TC + 9TC), (9TC + 11TC) có khả năng đối kháng với vi khuẩn *V.parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm.

Trong đó, chủng 4C được phân lập từ dịch dưa cải

muối chua và chủng 11TC phân lập từ dịch tôm muối chua có những đặc điểm sinh hóa tương đồng với chi *Lactobacillus* spp. [10, 14], chủng 8TC, 9TC được phân lập từ dịch tôm muối chua có những đặc điểm sinh hóa tương đồng với chi *Bacillus* spp. [15, 16], chủng 6C được phân lập từ dịch nước dưa cải muối vẫn chưa xác định được chủng loài.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cho việc cung cấp chủng vi khuẩn *V.parahaemolyticus* gây bệnh gan tụy cấp tính cho tôm. Chúng giống vi khuẩn là sản phẩm từ đề tài cấp bộ của Viện.

Bài báo này được tài trợ bởi quỹ Khoa học Công nghệ Murata và Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng với đề tài có mã số: T2020-02-08MSF.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hồ Quốc Lực (2020), Xuất khẩu tôm - Quá khứ, hiện trạng và triển vọng. *Báo cáo trên Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam*, 2020.
- [2] L. Jayasree, P. Janakiram, R. Madhavi (2006), Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of Aquaculture Society*, 37 (4):523-532.
- [3] Thornber, K., Verner-Jeffreys, D., Hinchliffe, S., Rahman, M.M., Bass, D. and Tyler, C.R. (2020), *Evaluating antimicrobial resistance in the global shrimp industry*. *Rev Aquacult*, 12: 966-986. doi:10.1111/raq.12367
- [4] Farzanfar A (2006), The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48(2):149-58.
- [5] M. I. Hossain et al., (2013), Effects of Probiotics on Growth and Survival of Shrimp in Coastal Pond at Khulna, Bangladesh. *Journal of Scientific Research*, 5 (2).
- [6] Lê Thị Tiểu Ngọc, Nguyen Duc Huy (2019), Phân lập và kiểm tra khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của *lactococcus garvieae* từ hệ tiêu hóa tôm. *Tạp chí Khoa học Tự nhiên Đại học Huế*, 128(1E):77.
- [7] Lê Mỹ Phương (2008), Phân lập vi khuẩn *Bacillus subtilis* trong ao nuôi tôm su tại sóc trăng. Luận văn tốt nghiệp trường Đại học Cần Thơ.
- [8] WHO and FAO (2016), Selection and application of methods for the detection and enumeration of human-pathogenic halophilic *Vibrio* spp. in seafood. FAO, Microbiological risk assessment series (22).
- [9] GS.TS.BS. Nguyễn Việt Tiến và cs (2017), *Sách “Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng”*. Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
- [10] Trương Quốc Tắt*, Nguyễn Duy Khánh, Nguyễn Thị Ngọc Thắm, Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Thị Phương Trang (2019), Phân lập, định danh và khảo sát một số tính chất có lợi của vi khuẩn lactic từ tôm chua ở thị xã Gò Công, tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên Vol. 128, No. 1E, 87-98*.
- [11] Bo Ram Beck, Daniel Kim, Jongsu Jeon, Sun-Min Lee (2014) The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Fish & Shellfish Immunology* 42(1):177-183.
- [12] Karla Y. Leyva-Madrigal et all (2011), Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. *Aquaculture* 322-323(1):16-22.
- [13] B.M.A. Hasan, B. Guha, and S. Datta (2012), Efficacy of Probiotics on Growth and Sustainable Production of Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius 1798 in Brackishwater Ponds of West Bengal, India. *Asian Fisheries Science*, 25: 303-316.
- [14] Mishra, V. and Prasad, D.N. (2005), Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics, *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109–115.
- [15] Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. (2003), 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), 83–87.
- [16] Purivirojkul, W., and Areechon, (2007), Application of *Bacillus* spp. isolated from intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from natural habita for control pathogenic bacteria in aquacult, *Kasetsart J. (Nat. Sci)*, 41, pp. 125-132.