

**KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CHỦNG *BACILLUS SUBTILIS* B20.1  
LÀM CƠ SỞ CHO VIỆC SẢN XUẤT PROBIOTIC PHÒNG BỆNH GAN  
THẬN MŨ DO *EDWARDSEILLA ICTALUTI* TRÊN CÁ TRA  
(*PANGASIU HYPOPHTHALMUS*) NUÔI THÂM CANH  
INVESTIGATE SOME CHARACTERISTICS OF *BACILLUS SUBTILIS* B20.1 FOR  
PROBIOTIC PRODUCT TO PREVENT DISEASE CAUSED BY *EDWARDSEILLA*  
*ICTALURI* ON STRIPE CATFISH (*PANGASIU HYPOPHTHALMUS*) CULTURED  
IN INTENSIVE FARMS**

**Hồ Thị Trường Thy<sup>1</sup>, Nguyễn Nữ Trang Thùy<sup>1</sup>, Võ Minh Sơn<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Bộ Môn Bệnh học Thủy Sản, Khoa Thủy Sản Trường Đại học Nông Lâm TP HCM

<sup>2</sup> Viện nghiên cứu Nuôi Trồng Thủy Sản 2

**TÓM TẮT**

Nhằm tạo sản phẩm probiotic tốt nhất cho việc phòng bệnh gan thận mũ trên cá tra một cách hiệu quả, chúng tôi đã chọn chủng *Bacillus subtilis* B20.1 và tiến hành các thí nghiệm như sau: khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), nhiệt độ (25<sup>0</sup>, 30<sup>0</sup>, 35<sup>0</sup>, 40<sup>0</sup>C), nồng độ muối (0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%); khả năng chịu pH thấp của dạ dày (pH= 2, 3), và muối mật (0.5%, 1%, 2%); khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase, lipase, protease, cellulase); khảo sát khả năng phân hủy phân tử tín hiệu HHL; và khả năng ức chế vi khuẩn *Ewardseilla ictaluri* trong điều kiện nuôi chung. Kết quả chúng tôi thu được như sau: chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B 20.1 phát triển tốt nhất và cho đối kháng mạnh nhất trong điều kiện pH=6, nồng độ muối 3%, nhiệt độ 35<sup>0</sup>C; có khả năng chịu pH thấp (2 và 3) ở dạ dày, và nồng độ muối mật 2%; có khả năng sinh các loại enzyme ngoại bào amylase, lipase, và cellulase; có khả năng phân hủy phân tử tín hiệu HHL trong quá trình quorum sensing của vi khuẩn; và cạnh tranh sinh dưỡng mạnh mẽ cũng như ức chế sự phát triển của *E. ictaluri*.

**ABSTRACT**

To produce the best probiotic product for prevention of disease caused by *Ewardseilla ictaluri* on stripe catfish, the investigation was conducted on *Bacillus subtilis* B20.1 with the experiments on pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), temperature (25<sup>0</sup>, 30<sup>0</sup>, 35<sup>0</sup>, 40<sup>0</sup>C), salt concentrations (0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%); low pH in condition of digestion (pH=2, 3), and bile salt (0.5%, 1%, 2%); the ability to produce digestive enzyme (amylase, lipase, protease, and cellulose), destroy the signal molecule HHL; and inhibit the growth of *E. ictaluri* in the shared culture media. For the result, *B. subtilis* B20.1 grew in the best conditions including pH= 6, salt concentration 3%, temperature 35<sup>0</sup>C; resisted in low pH (2, 3) and bile salt concentration 2%; produced digestive enzyme amylase, lipase, and cellulase; destroyed signal molecule HHL in quorum sensing of bacteria; and nutritionally competed to inhibit strongly the growth of *E. ictaluri*.

**ĐẶT VẤN ĐỀ**

Ngày nay, việc nuôi thâm canh cá tra với quy mô lớn ngày càng phát triển tại các tỉnh thành trong cả nước nhằm đáp ứng nhu cầu xuất khẩu ra thị trường thế giới của nước ta hiện nay. Chính vì thế không thể tránh khỏi những rủi ro xảy ra dịch bệnh trong môi trường nuôi. Bên cạnh các loại thuốc kháng sinh dùng để trị bệnh, các nhà khoa học đang tìm ra các sản phẩm thay thế nhằm nâng cao hiệu quả trong việc phòng bệnh với mục đích hạn chế các tác hại môi trường do thuốc và hóa chất gây ra. Sử dụng liệu pháp sinh học và thân thiện với môi trường, probiotic hay cung cấp các vi sinh vật có lợi được xem là giải pháp cần hướng đến để ngăn chặn những nguy cơ dịch bệnh xảy ra và từ đó giảm thiểu thiệt hại cho người nuôi cá tra tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Các vi sinh vật có lợi có khả năng cải thiện môi

trường nước và ức chế vi sinh vật gây bệnh trong đó vi khuẩn *Edwardseilla ictaluri* là một nguyên nhân. Ngoài ra, các vi sinh vật có lợi còn có khả năng phân hủy phân tử tín hiệu của các vi sinh vật gây bệnh nhằm giảm độc lực và khả năng phát triển của chúng. Mục tiêu nghiên cứu nhằm thử nghiệm một số đặc tính của chủng *Bacillus subtilis* B20.1 cho việc chế tạo probiotic trong công tác phòng bệnh gan thận mũ do *Edwardseilla ictaluri* gây ra trên cá tra nuôi thâm canh tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

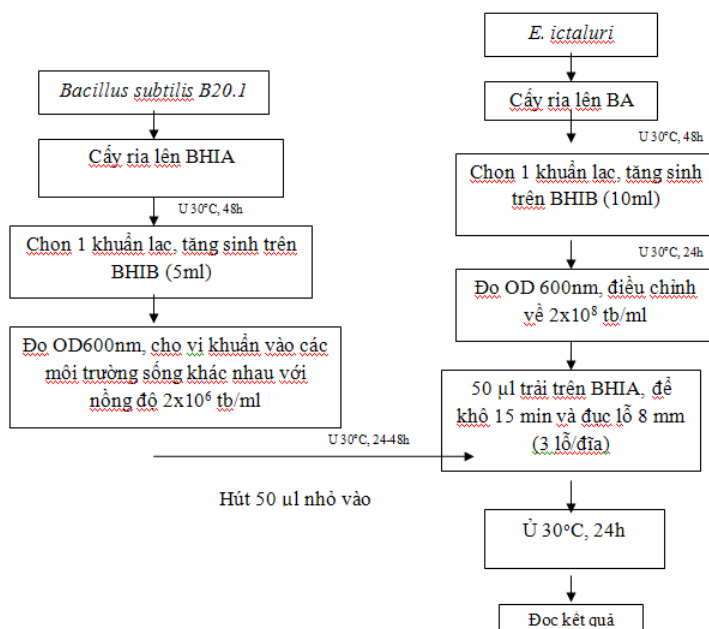
Nghiên cứu được tiến hành tại phòng vi sinh-phòng sinh học thực nghiệm tại Viện Nuôi Trồng Thủy Sản 2 từ tháng 3 đến tháng 5 năm 2011.

Chủng vi khuẩn được chọn gồm *Bacillus subtilis* B20.1 được thu tại ao nuôi cá tra thịt tại Đồng Tháp; *Edwardseilla ictaluri* GLy09 từ phòng lưu giữ mẫu của Trung Tâm Quốc Gia Quan Trắc và Cảnh báo Môi Trường và Phòng Ngừa Dịch Bệnh Thủy Sản khu vực Nam Bộ.

### Các thử nghiệm trên *Bacillus subtilis* B20.1

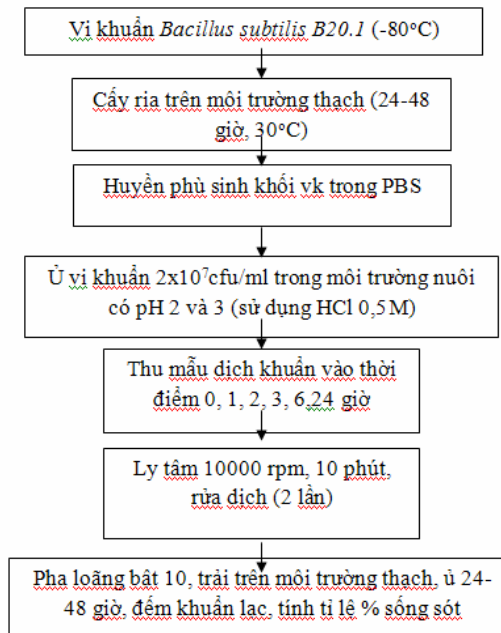
**Khả năng sinh enzyme ngoại bào:** các chủng vi sinh vật được dùng làm probiotic trong thức ăn thủy sản sẽ tiết ra các enzyme ngoại bào giúp hỗ trợ tiêu hóa và phân hủy các thức ăn dư thừa trong môi trường nước. Các enzyme thử nghiệm gồm amylase, lipase, protease, và cellulase. Các phản ứng sẽ được thực hiện bằng một số hóa chất chuyên biệt nhỏ vào môi trường nuôi cấy để nhận biết vi sinh vật có sản sinh ra enzyme hay không sau khi chúng phân giải các hợp chất như tinh bột, chất béo, gelatine, casein, và cellulose.

**Khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp cho đối kháng mạnh với *E. ictaluri*:** *Bacillus subtilis* B20.1 được cho nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng với các điều kiện khác nhau pH (4, 5, 6, 7, 8, 9,10), nhiệt độ (25<sup>0</sup>, 30<sup>0</sup>, 35<sup>0</sup>, 40<sup>0</sup>), và nồng độ muối (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%) trong 24h. Sau đó, dịch vi khuẩn được ly tâm và lấy ra nuôi chung cùng *E. ictaluri* theo phương pháp giéng khuếch tán để khảo sát tính đối kháng.



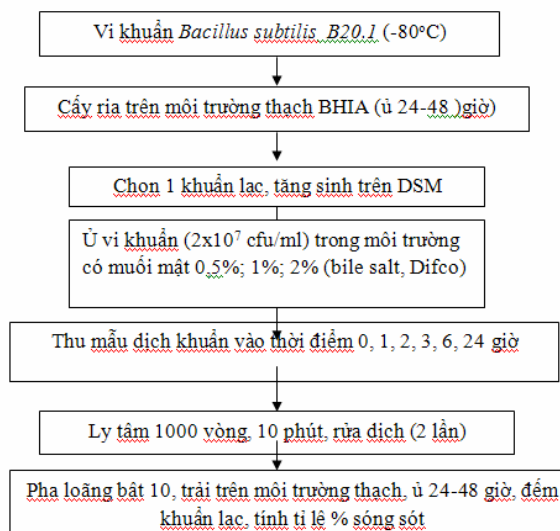
**Sơ đồ 1:** Khái quát phương pháp tiến hành theo giéng khuếch tán (Chythanya et al., 2002)

**Khảo sát khả năng chịu đựng pH thấp** Vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1 nuôi tăng sinh trong môi trường DSM, sau đó chuyển vào nuôi trong môi trường BHIB có pH thấp 2 và 3 được xem như pH acid của dạ dày. Tiếp tục tiến hành thu sinh khối và đếm số vi khuẩn còn sống trên môi trường LB (Jacobsen et al., 1999)



### Sơ đồ 2: Thử nghiệm khả năng chịu pH thấp trong dạ dày

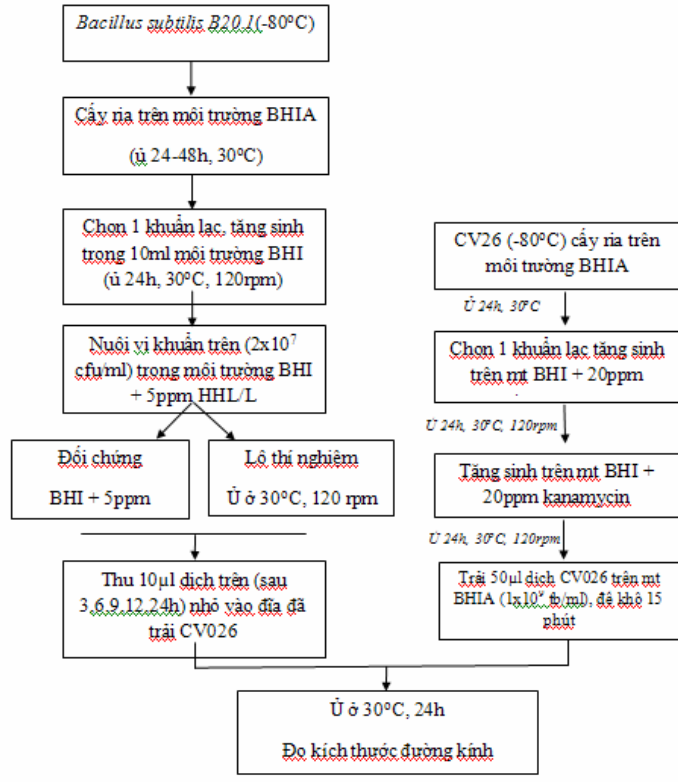
Khảo sát khả năng chịu đựng muối mật Vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1 được nuôi tăng sinh trong môi trường DMS và tương tự chuyển vào môi trường nuôi có pha hàm lượng muối mật 0.5%, 1%, 2%. Sau đó thu sinh khối và đếm số khuẩn lạc còn lại trên môi trường LB (Verdenelli et al., 2006).



### Sơ đồ 3: Thử nghiệm khả năng chịu muối mật

Khảo sát khả năng phân hủy phân tử tín hiệu HHL-Hexanoyl Hemoserine Lactone Sử dụng vi khuẩn chỉ thị cho HHL *Chromobacterium violaceum* và dung dịch C6-HHL để khảo sát khả năng phân hủy Hexanoyl Hemoserine Lactone của vi khuẩn *Bacillus subtilis*

Khảo sát khả năng ức chế của *Bacillus subtilis* với vi khuẩn *Ewardsiella ictaluri* trong môi trường nuôi chung: Tiên hành nuôi chung 2 chủng vi khuẩn trong môi trường dinh dưỡng BHIB với mật độ ban đầu cả hai là  $2 \times 10^7$  cfu/ml trong 24h. Tiếp theo, trải đều đếm số lượng vi khuẩn còn lại trên môi trường BHIA. Đồng thời tiên hành kiểm tra sự hiện diện dịch tiết đối kháng của *Bacillus subtilis* bằng phương pháp giếng khuếch tán.



Sơ đồ 4: Khảo sát khả năng phân hủy phân tử tín hiệu HHL

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Kết quả khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào**

**Bảng 1:** Kết quả khảo sát enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1

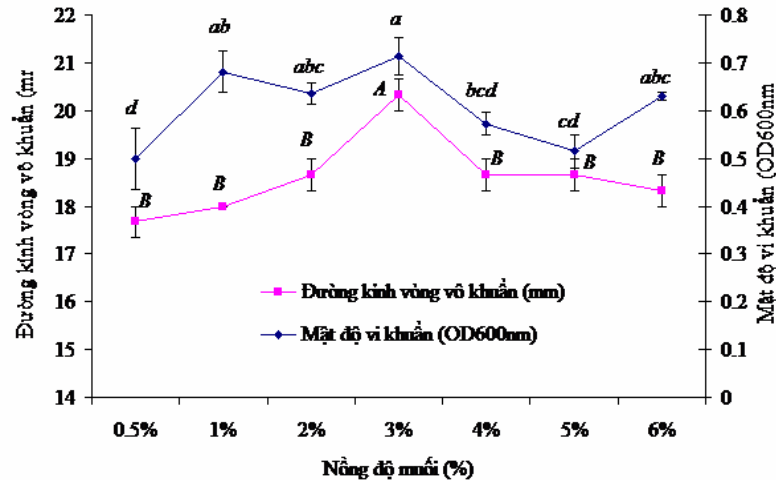
Chủng vi khuẩn	LIPASE	CELLULASE	AMYLASE	GELATINASE	CASEINASE
B20.1	-	+	+	-	+

Từ bảng 1, vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1 có khả năng tiết cellulase, amylase, và caseinase nhằm phân hủy cellulose, tinh bột và đường trong ruột cá giúp tăng cường tiêu hóa thức ăn. So với nghiên cứu của Ngô Tự Thành (2007) trên 236 chủng Bacillus chỉ có 2 chủng T20 và M27 thể hiện đầy đủ các hoạt tính như phân hủy cả gelatine và chất béo trong sữa, điều này *Bacillus subtilis* B20.1 không thể thực hiện được. Các chủng còn lại đều chỉ thể hiện tính năng phân hủy protein và tinh bột. Như vậy, so với đa số chủng *Bacillus* của các nghiên cứu thì *Bacillus subtilis* B20.1 có khả năng tiết enzyme ngoại bào tương đối tốt.

**Kết quả khảo sát các điều kiện nuôi thích hợp ảnh hưởng lên khả năng đối kháng của *Bacillus subtilis* B20.1 lên *E. ictaluri***

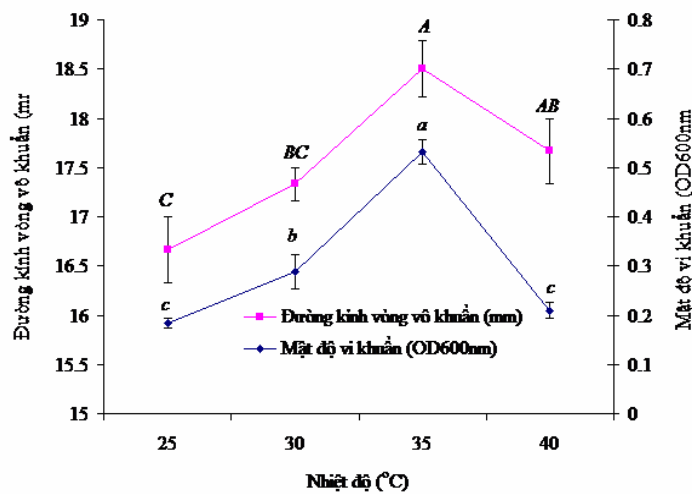
**Kết quả trong điều kiện nuôi với các độ mặn khác nhau**

Kết quả từ biểu đồ 1 cho thấy, vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1 là loài ưa muối, chúng có khả năng chịu đựng và sống sót ở tất cả các nồng độ muối 0.5% và 6% với tỷ lệ mật độ vi khuẩn dao động không đáng kể. Ngoài ra, *Bacillus subtilis* B20.1 phát triển tốt nhất và cho khả năng đối kháng mạnh nhất với *E. ictaluri* ở nồng độ muối 3% trong môi trường nuôi.



**Biểu đồ 1:** Ảnh hưởng của độ mặn lên tăng trưởng và khả năng đối kháng của *Bacillus subtilis* B20.1 với *E. ictaluri*

**Kết quả trong điều kiện nuôi với các nhiệt độ khác nhau**

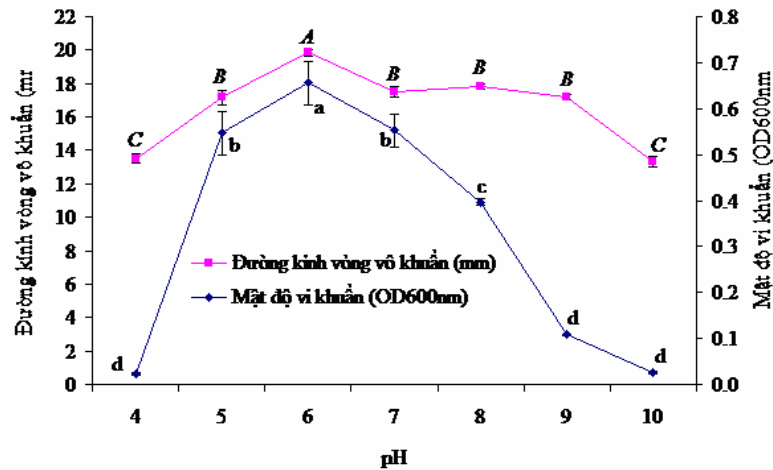


**Biểu đồ 2:** Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng tăng trưởng và đối kháng với *E. ictaluri* của vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1

Qua biểu đồ 2, vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1 thích hợp và phát triển mạnh nhất ở nhiệt độ 35°C đồng thời cho khả năng đối kháng mạnh nhất với *E. ictaluri*, thể hiện qua vòng vô khuẩn lớn nhất 17.5cm so với các điều kiện nhiệt độ còn lại.

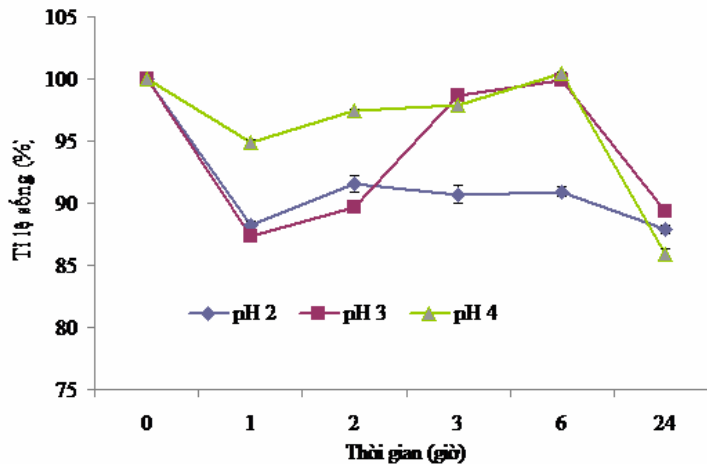
**Kết quả trong điều kiện pH khác nhau**

Từ biểu đồ 3, ở điều kiện pH 4, 9, 10 cho sức sống và khả năng chịu đựng của *Bacillus subtilis* B20.1 là rất thấp và điều kiện tối ưu duy nhất ở pH 6. Trong điều kiện này, vi khuẩn phát triển mạnh và tăng về số lượng đồng thời cho kích thước vòng vô khuẩn lớn nhất về khả năng đối kháng với *E. ictaluri*.



**Biểu đồ 3:** Ảnh hưởng của pH lên khả năng tăng trưởng và đối kháng với *E. ictaluri* của *Bacillus subtilis* B20.1

**Kết quả đánh giá khả năng chịu pH thấp của dạ dày**



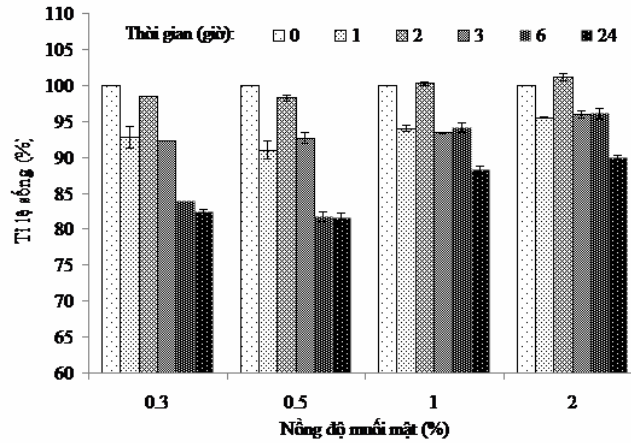
**Biểu đồ 4:** Khả năng chịu pH thấp của vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1

Qua biểu đồ 4, sau khoảng thời gian 24h nuôi ở các giá trị pH 2 3 4, mật độ vi khuẩn dao động trong khoản từ 100% giảm xuống giá trị 85-90%. Như vậy, tuy có giảm nhưng tỷ lệ này vẫn ở mức khá cao. Trong nghiên cứu của B. Hyronimus và ctv (2000), hầu hết các vi khuẩn thuộc nhóm lactic đều nhạy với acid. Chúng *B. laevolacticus* và *B. racemilacticus* nhạy cảm với pH 2 và 3, chỉ có thể sống sót trong khoản 6h thử nghiệm. Các chủng *Sporolactobacillus* được nghiên cứu nhạy cảm với pH thấp cho tỷ lệ sống sót chỉ 11-26% sau 3 giờ, 0.2-15% sau 6 giờ. Như vậy so với các chủng vi khuẩn khác *Bacillus subtilis* B20.1 có khả năng chịu đựng pH thấp khá mạnh, cho tiềm năng sản xuất probiotic trong tương lai.

**Kết quả đánh giá khả năng chịu đựng muối mật**

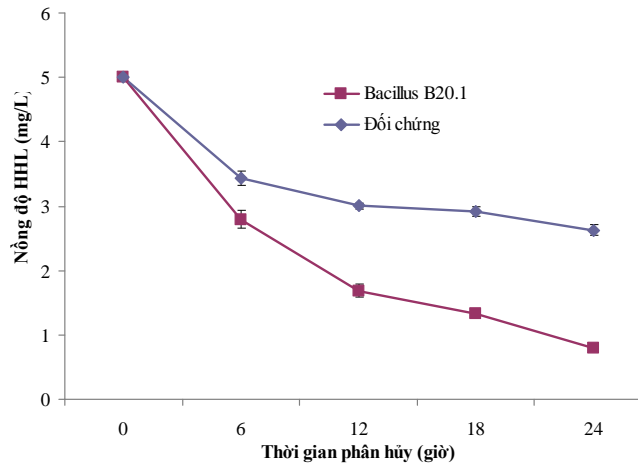
Theo Gilliland và ctv (1984), nồng độ 0.3% được coi là nồng độ quan trọng để sàng lọc các chủng đề kháng. Ở cả 4 nồng độ sau các giờ khảo sát, tỷ lệ sống của vi khuẩn dao động từ 80-100%. Nhìn chung tỷ lệ này vẫn là khá cao so với các chủng *Lactobacillus plantarum* chỉ với 25% sống sót trong nồng độ muối mật 0.3% (Harutoshi Tsuda và ctv, 2000). Theo nghiên cứu của Mariam và Mirlohi và ctv, không một vi khuẩn nào thuộc chủng *L. plantarum* và *L. rhamnosus* tồn tại trong nồng độ muối mật 2%. Như vậy, so với các chủng khác, khả năng

chịu đựng muối mật của *Bacillus subtilis* B20.1 là rất tốt, vì nồng độ muối mật cơ thể tiết ra trong quá trình tiêu hóa ở giờ đầu khoản 1.5-2%. *Bacillus subtilis* B20.1 hoàn toàn có tiềm năng trong việc sản xuất probiotic.



**Biểu đồ 5:** Khả năng chịu đựng muối mật của *Bacillus subtilis* B20.1

#### **Kết quả khảo sát khả năng phân hủy phân tử tín hiệu HHL**



**Biểu đồ 6:** Khả năng phân hủy HHL của *Bacillus subtilis* B20.1

Nhìn vào biểu đồ 6, với sự hiện diện của vi khuẩn thì nồng độ HHL giảm đi một cách rõ rệt. Sau 24h, nồng độ HHL ở lô đối chứng còn 3mg/l, trong khi đó nồng độ HHL ở lô thí nghiệm chứa *Bacillus subtilis* B20.1 thì lượng còn lại thấp hơn 1mg/l. Điều này chứng tỏ, vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1 có khả năng tiết ra enzyme AHL-acylase và AHL-lactonase phân hủy HHL, bẽ gãy quá trình quorum sensing của vi khuẩn. Dựa vào nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh Viện Nghiên Cứu NTTS 2 (2001), *Bacillus subtilis* B20.1 là vi khuẩn có khả năng phân hủy HHL thuộc nhóm trung bình, sau 12h nồng độ HHL còn lại < 2ppm.

#### **Kết quả khảo sát khả năng ức chế của *Bacillus subtilis* B20.1 lên sự phát triển của *E. ictaluri* bằng phương pháp nuôi chung**

Từ bảng 2, ta thấy rằng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1 ức chế hoàn toàn sự phát triển của *E. ictaluri* sau 24h và tăng sinh về số lượng. Ngoài ra, lượng *Bacillus subtilis* khi nuôi riêng tăng rất cao  $1.9 \times 10^9$  cfu/ml so với trường hợp nuôi chung. Điều này chứng tỏ khi nuôi chung giữa hai loài vi khuẩn có sự ức chế lẫn nhau, nhưng *Bacillus subtilis* mạnh hơn nên có khả năng tiêu diệt hoàn toàn *E. ictaluri*.

**Bảng 2:** Khảo sát khả năng ức chế của *Bacillus subtilis* B20.1 đối với sự phát triển của *E. ictaluri* bằng phương pháp nuôi chung

Chủng	<i>Bacillus subtilis</i> B20.1	<i>Bacillus subtilis</i> B20.1 + <i>E. ictaluri</i>	
		<i>E. ictaluri</i>	<i>Bacillus subtilis</i> B20.1
Mật độ ban đầu (cfu/ml)	2x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>7</sup>
Mật độ sau 24h (cfu/ml)	1.9x10 <sup>9</sup>	0	4.45x10 <sup>8</sup>

Kết quả bảng 3, sau khi nuôi chung, thu dịch treo và thực hiện phương pháp giềng khuếch tán, ta thấy hoàn toàn không có sự xuất hiện vòng vô khuẩn. Điều đó, chứng tỏ vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1 không hề tiết ra chất đối kháng với *E. ictaluri*. Như vậy, sự ức chế lẫn nhau diễn ra là do cạnh tranh dinh dưỡng với sự tăng sinh mạnh hơn của *Bacillus subtilis* B20.1 so với *E. ictaluri*.

**Bảng 3:** Khảo sát tính đối kháng của *Bacillus subtilis* B20.1 đối với *E. ictaluri*

Phương pháp nuôi	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	
	Dịch treo	Dịch khuẩn
<i>Bacillus subtilis</i> B20.1 + <i>E. ictaluri</i> (nuôi chung)	0	22.0 ± 1.3

## KẾT LUẬN

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* B20.1 rất có tiềm năng trong việc sử dụng để sản xuất probiotic, vì chúng có thể tiết ra các enzyme ngoại bào như cellulase, amylase, caseniase giúp cải thiện tiêu hóa cho cá nuôi. Để nuôi sinh khối *Bacillus subtilis* dùng cho việc sản xuất probiotic phòng bệnh do *E. ictaluri* gây ra, ta nên nuôi trong điều kiện pH 6, nhiệt độ 35<sup>0</sup>C, nồng độ muối 3%. Ngoài ra, *Bacillus subtilis* B20.1 có khả năng chịu được pH thấp của dạ dày, và nồng độ muối mật cao. Khi gặp các vi sinh vật khác trong cùng một môi trường sống, chúng tham gia vào việc bẻ gãy phân tử tín hiệu HHL, và thuộc nhóm vi khuẩn có độ phân hủy HHL trung bình. Giữa *Bacillus subtilis* B20.1 có thể tiêu diệt được *E. ictaluri* thông qua sự cạnh tranh sinh dưỡng và ức chế lẫn nhau.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tài liệu tiếng Việt

Ngô Tự Thành, Bùi Thị Việt Hà (2007). *Nghiên cứu hoạt tính enzyme ngoại bào của một số chủng Bacillus mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải*. Tạp chí khoa học ĐHQGHN, Khoa tự nhiên và công nghệ **25**(2009) 101-106.

### Tài liệu tiếng Anh

Andrew E. Goodwin, J. Spencer Roy, Jr, John M. Grizzle, M. Terrell Goldsby, Jr (1994), *Bacillus mycoides: a bacterial pathogen of channel catfish*, Diseases of Aquatic Organisms, Vol. **18**, pp 173-179.

Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Vendrell, D., Muzquiz, J.L., 2004. *Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management*. J. Aquacult. Trop. **19**, 239–242

Bengmark, S. (1998) *Immunonutrition: role of biosurfactants, fiber, and probiotic bacteria*. Nutrition **14**:585-594.

Bergey's manual determinative bacteriology



- Brown, M.R., S.M. Barrett, J.K. Volkman, S.P. Nearhos, J.A. Nell, and G.L. Allan (1996) *Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture*. *Aquaculture* **143**:341-360
- Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Nielsen, K.F., Buchholtz, C., Larsen, J.L., Gram, L. (2005). *Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram-negative fish pathogenic bacteria*. *Dis Aquat Org* **65**: 43-52.
- Chythanya, R., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2002. *Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine Pseudomonas I-2 strain*. *Aquaculture* **208**, 1–10
- Dalmo, R.A., K. Ingebrigtsen, and J. Gwald (1997) *Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES)*. *Journal of Fish Diseases* **20**:241-273
- Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L., Zhang, L.H. (2002). *Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from Bacillus species*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1754-1759.