

Phân lập và tuyển chọn *Lactobacillus* spp. kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây hội chứng chết sớm trên tôm tại Sóc Trăng

- Đỗ Thị Thanh Dung
- Võ Đình Quang

Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP.HCM

- Phan Thị Phượng Trang

TT Khoa học & CN Sinh học–Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 12 tháng 10 năm 2016, nhận đăng ngày 26 tháng 07 năm 2017)

TÓM TẮT

Bệnh chết sớm trên tôm là một trong những yếu tố chính ảnh hưởng đến sự phát triển của ngành nuôi trồng thủy sản. Việc sử dụng chế phẩm sinh học đối kháng với tác nhân gây bệnh là một chiến lược thay thế thuốc kháng sinh và có tiềm năng ứng dụng để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và sàng lọc được 8 chủng *Lactobacillus* từ 30 mẫu bùn, nước và tôm nuôi tại Sóc Trăng. Qua khảo sát, chúng tôi nhận

thấy các chủng đều có khả năng đối kháng với chủng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh EMS trên tôm. Trong đó, chủng TA7L1 có khả năng đối kháng mạnh nhất và được xác định là thuộc loài *Lactobacillus plantarum* bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA và MALDI-TOF. Chủng vi khuẩn TA7L1 được đánh giá là an toàn và có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh phòng bệnh EMS trên tôm.

Từ khóa: Hội chứng chết sớm - EMS, Hoại tử gan tụy cấp-AHPNS, *Lactobacillus*, *V. parahaemolyticus*

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, một trong những hiện tượng tôm nuôi bị chết hàng loạt được biết đến với tên gọi là hội chứng chết sớm (Early mortality syndrome-EMS) hay còn gọi là hội chứng hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis syndrome-AHPNS), nguyên nhân của hiện tượng này là do một dòng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* đặc biệt gây ra, và gây thiệt hại nặng cho ngành nuôi tôm của Việt Nam [4]. Trong đó Sóc Trăng hiện là một trong những tỉnh bị thiệt hại nặng nề nhất [3]. Cho đến nay, hầu như chưa có thuốc điều trị đặc hiệu cho dịch bệnh này, hầu hết các dòng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* kháng được hoàn toàn với oxytetracyclin, là kháng sinh chủ yếu trộn vào thức ăn nuôi tôm định kỳ. Do đó sử dụng kháng sinh để trị bệnh không có hiệu quả, ngoài ra việc sử dụng kháng sinh còn gây ảnh hưởng đến môi trường nuôi tôm,

đến sự tăng trưởng của tôm và gây ảnh hưởng đến chất lượng tôm.

Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy, việc sử dụng vi khuẩn như *Lactobacillus* để ức chế một số loài *Vibrio* spp. gây bệnh *Vibriosis* trên tôm đã cho thấy tính hiệu quả của nó [1, 8]. Ở nước ta hiện nay, chế phẩm vi sinh dùng trong nuôi trồng thủy hải sản đều nhập ngoại với giá thành cao và chưa thật sự phù hợp với điều kiện khí hậu của Việt Nam. Đặc biệt chưa có nghiên cứu tạo được chế phẩm vi sinh kháng bệnh EMS trên tôm. Việc nghiên cứu chọn lựa những dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS trên tôm giúp sản xuất chế phẩm vi sinh phòng và trị bệnh EMS là một vấn đề cần thiết trong giai đoạn hiện tại.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu

Chủng *Lactobacillus* phân lập từ mẫu bùn đáy ao, mẫu nước và hệ tiêu hóa tôm khỏe được lấy trong khu vực ao nuôi tôm tại tỉnh Sóc Trăng.

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây hội chứng EMS nghiên cứu được phân lập từ tôm bệnh trong các ao tôm đang nhiễm bệnh tại tỉnh Sóc Trăng.

Môi trường sử dụng nghiên cứu

Môi trường phân lập và nuôi cấy *V. parahaemolyticus*: TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose) của Merck, TSB (Tryptic Soy Broth): casein peptone 15 g, soya peptone 5 g, NaCl 15 g, nước cất vừa đủ 1 lít.

Môi trường chọn lọc *V. parahaemolyticus*: CAV (Chrom Agar Vibrio) nhà cung cấp CHROMEAGAR, môi trường KIA (Kligler Iron agar): pepton 10 g, lactose 20 g, glucose 1 g, NaCl 5 g, ferri ammonium citrate 0,5 g, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,5 g, phenol red 0,025 g, Agar 2 %, nước cất vừa đủ 1 lít.

Môi trường phân lập và nuôi cấy *Lactobacillus*: MRS (Man Rogosa Sharpe): peptone 10 g, cao thịt 5 g, cao nấm men 5 g, glucose 10 g, tween 80 1 mL, diammonium hydrogen citrate 2 g, CH_3COONa 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 38 mg, K_2HPO_4 2 g, nước cất vừa đủ 1 lít. Môi trường thạch MRSA: thành phần như trên có bổ sung thêm 2 % agar. Các môi trường trên được hấp khử trùng ở 121 °C, 15 phút trước khi sử dụng.

Phương pháp

Phân lập, làm thuần *V. parahaemolyticus*,

Chọn những con tôm có triệu chứng bệnh tương tự EMS/AHPNS được mô tả bởi Lightner và cs (2012), tiến hành phân lập và làm thuần trên môi trường chọn lọc TCBS. Tôm được khử trùng bề mặt bằng cồn 70° và lau sạch. Dùng kẹp tách bỏ phần giáp đầu ngực, khử trùng bề mặt gan tụy tôm, dùng que cấy tiết trùng lấy một ít mẫu gan tụy tôm cấy lên đĩa thạch có môi trường TCBS. Đĩa cấy được ủ

ở 28 °C trong 24 giờ. Chọn những khuẩn lạc đặc trưng cho *V. parahaemolyticus* (to, màu xanh) để làm thuần bằng cách cấy rìa trên môi trường TCBS–agar. Chủng sau khi làm thuần được bảo quản trong glycerol ở -80 °C.

Phân lập, làm thuần *Lactobacillus*

Pha loãng mẫu tôm, mẫu nước, mẫu bùn đáy ao nuôi tôm đến nồng độ thích hợp bằng nước muối sinh lý 0,85–0,9 ‰, cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường MRSA có bổ sung CaCO_3 , nuôi cấy ở 37 °C trong 24 giờ. Chọn các khuẩn lạc riêng lẻ có vòng phân giải CaCO_3 để tiếp tục làm thuần trên môi trường thạch đĩa, các chủng sau khi làm thuần được bảo quản trong glycerol ở -80 °C [2].

Định danh *V. parahaemolyticus*, *Lactobacillus*

Đối với dòng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*: Hình dạng, kích thước của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram. Các đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định dựa trên khóa phân loại Bergey, 1957. Dựa vào các đặc tính của *V. parahaemolyticus* như oxidase và catalase dương tính, hình que, Gram âm, không sinh bào tử, di động, không lên men đường sucrose, không sinh hơi, không sinh H_2S để xác định chủng *V. parahaemolyticus*, sử dụng chủng *V. parahaemolyticus* được cung cấp tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên làm đối chứng.

Đối với chủng vi khuẩn *Lactobacillus* xác nhận thông qua đặc tính sinh trưởng tốt và chiếm ưu thế trên môi trường MRS, tế bào hình que, Gram dương, catalase (-) và oxydase (-), có khả năng sinh lactic acid, không có khả năng hình thành bào tử, không di động.

Các chủng sau khi định danh sinh hóa được lựa chọn và tiến hành định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA: Tách chiết bộ gen vi khuẩn bằng bộ kit của QIAGEN, khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự như sau: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'). 1492R (5'-

TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Sản phẩm PCR được tinh chế và gửi giải trình tự. Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu gen của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Sau đó các chủng vi khuẩn được lựa chọn định danh bằng phân tích trình tự 16S rDNA được kiểm tra lại bằng phương pháp sử dụng công nghệ khối phổ protein (MALDI-TOF). So sánh sự tương đồng của phổ protein từ mẫu vi sinh vật mục tiêu với cơ sở dữ liệu của gần 6000 chủng vi sinh vật khác nhau.

Nuôi cấy và thử độc lực của V. parahaemolyticus trên tôm nuôi

Tiến hành nuôi cấy các chủng phân lập được trên môi trường bổ sung 2 % NaCl) nuôi 24 giờ ở 28 °C và tái lây nhiễm trên tôm khỏe theo mô tả của Trần Hữu Lộc (2013)[9].

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với từng chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được. Lượng tôm thí nghiệm là 10 con cho mỗi bể 10 lít được chuẩn bị với nồng độ muối 10 ± 1 ‰. Bổ sung *V. parahaemolyticus* gây bệnh để đạt nồng độ trong nước nuôi tôm 10^6 CFU/mL. Tôm được cho ăn 2 lần mỗi ngày và quan sát 4 lần mỗi ngày. Tiến hành chẩn đoán tôm bị nhiễm EMS/AHPNS bằng biểu hiện bên ngoài và phân tích mô học [9]. Đánh giá và lựa chọn dòng có độc lực mạnh nhất gây hội chứng chết sớm trên tôm với biểu hiện bên ngoài và phân tích mô học tương tự như mô tả của Lighter và cộng sự 2013 [9].

Khảo sát khả năng đối kháng với V. parahaemolyticus

Sử dụng phương pháp đĩa thạch 2 lớp của Dopazo và cộng sự (1988) với một số thay đổi nhỏ [1] và phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch [6, 7] để khảo sát đặc tính đối kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi chủng vi khuẩn cần chọn lọc, kết quả là giá trị trung bình cộng của các lần lặp lại.

Mức độ đối kháng được đánh giá dựa vào kích thước vòng đối kháng (x): Không đối kháng (-): $x = 0$ mm; Đối kháng yếu (+): $0 < x < 2$ mm ; Đối kháng trung bình (++) : $2 < x < 4$ mm; Đối kháng mạnh (+++) : $x \geq 4$ mm

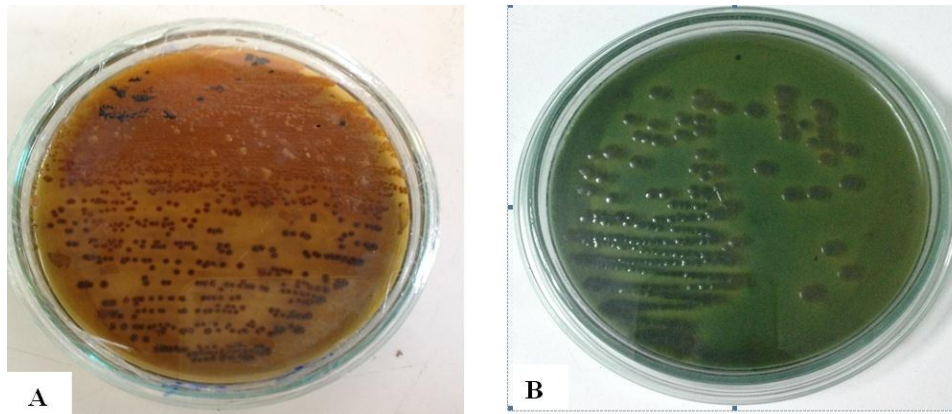
Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được đánh giá bằng các phương pháp thống kê phân tích biến lượng (Analysis of Variance, ANOVA), so sánh trung bình theo phương pháp trắc nghiệm Duncan. Các số liệu ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS) phiên bản 19.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và sàng lọc chủng *V. parahaemolyticus*

Từ 20 mẫu tôm bệnh thu được tiến hành phân lập *V. parahaemolyticus* trên môi trường TCBS (Hình 1A) và lựa chọn các khuẩn lạc màu xanh (do không lên men đường sucrose) (Hình 1B), bước đầu đã phân lập được 27 chủng có khả năng là *V. parahaemolyticus*.

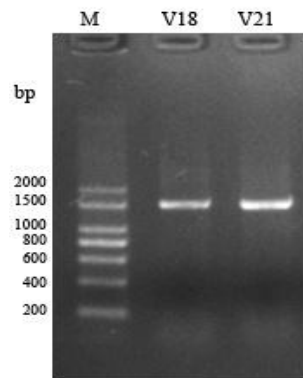


Hình 1. Kết quả phân lập và làm thuần *V. parahaemolyticus* trên môi trường TCBS (A): phân lập; (B): làm thuần

Từ 27 chủng có hình dạng đặc trưng của *V. parahaemolyticus* tiếp tục tiến hành một số thử nghiệm để sàng lọc sơ bộ thông qua các đặc điểm của *V. parahaemolyticus* như: Gram âm, hình que, di động, oxidase và catalase dương tính; trên môi trường KIA *V. parahaemolyticus* lên men đường glucose, không sinh hơi, không sinh H_2S ; trên môi trường chuyên biệt CAV cho khuẩn lạc màu tím hoa cà. Kết quả đã chọn được 2 chủng là V18 và V21 mang các đặc điểm của *V. parahaemolyticus*.

Định danh *V. parahaemolyticus* bằng giải trình tự 16S rDNA và MALDI-TOF

Bộ gene của hai chủng tuyển chọn V18 và V21 được tách chiết. Trình tự 16S rDNA trên bộ gene được nhân bản bằng kỹ thuật PCR và chạy điện di trên gel agarose 1 % để kiểm tra kết quả. Trên Hình 2 cho thấy ở giếng V18 và V21 đã thu nhận được các đoạn trình tự DNA (~ 1500 bp) mã hóa cho 16S của 2 chủng tuyển chọn. Trình tự 16S rDNA sau khi khuếch đại được gửi giải trình tự tại công ty Macrogen và so sánh độ tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST. Dựa trên kết quả phân tích trình tự 16S rDNA của 2 chủng tuyển chọn xác định được chủng có khả năng gây bệnh EMS trên tôm đều là *V. parahaemolyticus*.



Hình 2. Kết quả PCR thu nhận 16S rDNA của các chủng *V. parahaemolyticus* mục tiêu

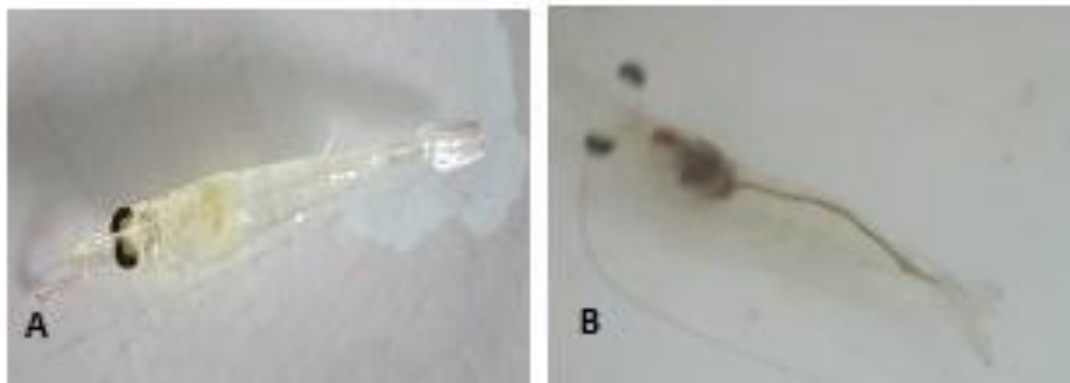
Bảng 1. Tóm tắt kết quả định danh bằng MALDI – TOF của hai chủng V18 và V21

Chủng	Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
V18	1 (+)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> DSM 15477 DSM	1,91	<u>670</u>
V21	1 (+)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 4a IBS	1,831	<u>670</u>

Hai chủng này cũng được định danh tái xác định lại bằng phương pháp MALDI–TOF. Kết quả định danh cho thấy sau khi so sánh sự tương đồng của phổ protein từ mẫu V18 và V21 với ngân hàng có sẵn, kết quả thu được cả hai chủng đều là *V. parahaemolyticus* (Bảng 1).

Kết quả nuôi cấy và thử độc lực của *V. parahaemolyticus* trên tôm nuôi. Sau khi cảm nhiễm V18 và V21 qua các thời điểm quan sát cho thấy: tôm

ở nghiệm thức đối chứng âm vẫn bơi khỏe, gan tụy sậm, bình thường, ruột đầy thức ăn (Hình 3B). Đối với tôm cảm nhiễm V18 và V21 chỉ sau 6 giờ tôm có dấu hiệu lơ dờ, bơi yếu tấp vào thành bể, quan sát bên ngoài thấy gan tụy nhạt màu, ruột rỗng (Hình 3A), và tôm đã bắt đầu chết. Tiến hành xác định tỷ lệ tôm chết đối với từng nghiệm thức qua các thời điểm theo dõi 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 60 giờ, 84 giờ thu được kết quả Bảng 2.

**Hình 3.** Tôm sau khi cảm nhiễm. A: Tôm cảm nhiễm V18; B: Tôm ở nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn**Bảng 2.** Tỷ lệ tôm chết theo thời gian sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*

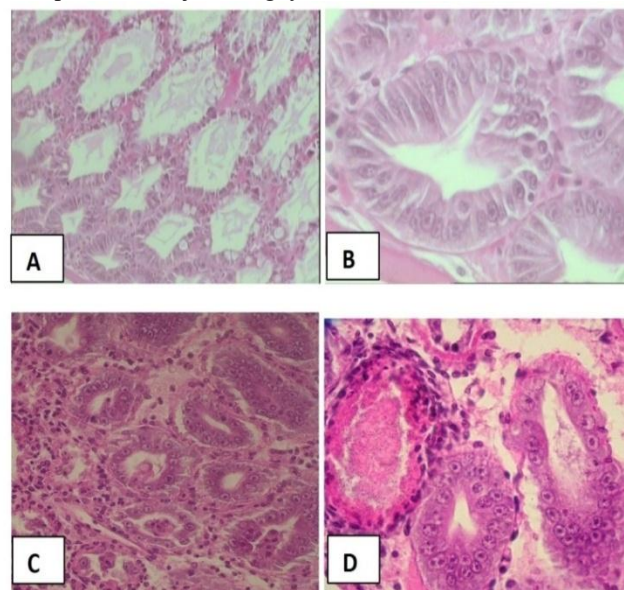
Nghiệm thức	Tỷ lệ tôm chết theo thời gian (%)				
	Sau 12 giờ	Sau 24 giờ	Sau 48 giờ	Sau 60 giờ	Sau 84 giờ
Đối chứng	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c
V18	20,00 ^a	56,67 ^a	66,67 ^a	83,33 ^a	83,33 ^a
V21	13,33 ^b	36,67 ^a	46,67 ^b	56,67 ^b	56,67 ^b

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả Bảng 2 cho thấy, tỷ lệ tôm chết tăng dần theo thời gian theo dõi sau khi cảm nhiễm. Tại thời điểm 12 giờ sau khi chủng *V. parahaemolyticus* ở các bể thí nghiệm đã bắt đầu có tôm chết với tỷ lệ dao động 13,33–20,00 %; ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung *V. parahaemolyticus* thì không cho hiện tượng tôm chết trong suốt thời gian theo dõi. Tại thời điểm 48 giờ, tỷ lệ tôm chết ở nghiệm thức chủng V18 cao hơn và khác biệt về mặt thống kê so với V21 và duy trì cho đến 84 giờ.

Thời điểm bắt đầu nhận thấy các hiện tượng của bệnh (sau 6 giờ chủng *V. parahaemolyticus* gây

bệnh), tiến hành cố định tôm trong dung dịch Davison, sau đó gửi mẫu phân tích mô học tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II. Kết quả kiểm tra mô học cho thấy, ở mẫu đối chứng không có dấu hiệu bệnh tích điển hình của bệnh EMS (Hình 4A, B), ở hai mẫu tôm được cảm nhiễm chủng V18 và V21 đều cho dấu hiệu bệnh EMS, phân tích mô học cho thấy biểu hiện bong tróc, co cụm tế bào và hoại tử tế bào biểu mô thành ống lượn gan tụy, các tế bào hồng cầu tập trung nhiều ngoài ống gan (Hình 4C, D).

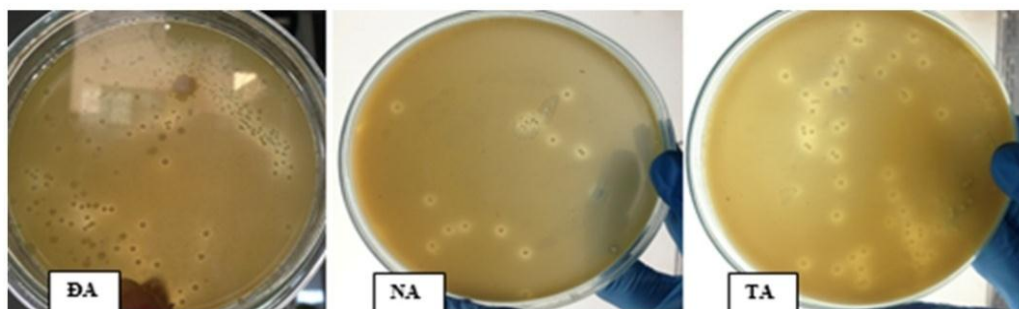


Hình 4. Tiêu bản cắt lát mô học bộ phận gan tụy trên tôm nhuộm bằng Giemsa. A: Mô tôm ở mẫu đối chứng (-), 20X; B: Mô tôm ở mẫu đối chứng (-), 100X; C: Mô tôm ở mẫu cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*, 20X; D: Mô tôm ở mẫu cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*, 100X

Từ kết quả đánh giá mức độ gây độc của các dòng *V. parahaemolyticus* phân lập được và kết quả kiểm tra mô học có thể lựa chọn dòng V18 là dòng có độc lực tốt nhất gây hội chứng chết sớm trên tôm để tiếp tục tiến hành nghiên cứu tiếp theo.

Phân lập và sàng lọc sơ bộ chủng *Lactobacillus*

Từ các mẫu đất, mẫu nước, mẫu tôm có ký hiệu là ĐA, NA, TA phân lập được 16 chủng với các đặc điểm nhận dạng như: hình dạng tròn, kích thước 1–2 mm, màu trắng sữa, không sinh sắc tố, bề mặt bóng, mặt cắt ngang lồi cong, mép khuẩn lạc trơn, cấu trúc đồng nhất và có xuất hiện vòng phân giải CaCO_3 xung quanh khuẩn lạc. Hình 5 và 6 phù hợp với đặc điểm nhận dạng khuẩn *Lactobacillus*.



Hình 5. Một số hình dạng khuẩn lạc phân lập được trên môi trường MRSA (có CaCO_3) sau 48 giờ nuôi cấy. (ĐA): Đất ao, (NA): Nước ao, (TA): Tôm ao



Hình 6. Hình dạng khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn được làm thuần trên môi trường MRSA sau 24 giờ

Với 16 chủng vi khuẩn phân lập được, tiến hành sàng lọc sơ bộ nhằm xác định sự hiện diện của chủng vi khuẩn *Lactobacillus*. Đã chọn được 8 chủng có đặc tính tương ứng với *Lactobacillus*: Trực khuẩn hình que, Gram dương, catalase và oxidase âm tính, không sinh bào tử, không di động, sinh lactic acid. Trong tổng số 8 chủng phân lập được có 6 chủng phân lập được từ mẫu tôm, 1 chủng phân lập từ đất ao và 1 chủng phân lập từ nước ao. Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS của các chủng

Lactobacillus phân lập. Sử dụng phương pháp đối kháng trực tiếp trên hai lớp thạch và khuếch tán trên lỗ thạch để kiểm tra khả năng đối kháng của các chủng *Lactobacillus* phân lập được với chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh đã lựa chọn. Việc khảo sát khả năng kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS của các chủng *Lactobacillus* được xác định thông qua đường kính vòng kháng khuẩn (Hình 7, Hình 8). Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 3.

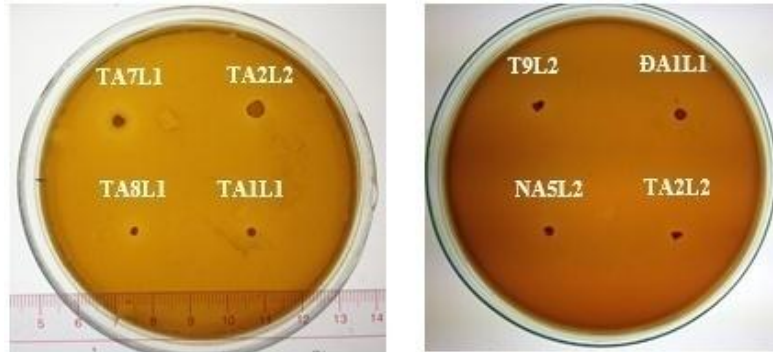
Bảng 3. Đường kính vòng kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus* kiểm tra đối kháng bằng 2 phương pháp

STT	Phương pháp đối kháng trực tiếp		Phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch	
	Tên chủng	$(D - d)$ mm	Tên chủng	$(D - d)$ mm
1	TA7L1	5,00 ^a	TA7L1	4,17 ^a
2	TA8L1	3,33 ^b	TA1L1	3,83 ^b
3	TA2L2	3,17 ^b	TA2L1	3,00 ^b
4	TA1L1	3,00 ^b	TA2L2	3,00 ^b
5	NA5L2	2,83 ^b	TA9L2	2,83 ^b
6	TA2L1	2,17 ^b	NA5L2	2,8 ^b
7	TA9L2	2,17 ^b	ĐA1L1	2,6 ^b
8	ĐA1L1	2,00 ^b	TA8L1	2,6 ^b

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Từ kết quả Bảng 3 cho thấy với phương pháp đối kháng trực tiếp trên 2 lớp thạch, tất cả các chủng thí nghiệm đều có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*, các chủng khảo sát có đường kính vòng phân giải giao động từ 2 đến 5 mm. Nếu lấy

$(\overline{D-d}) \geq 4$ mm làm chuẩn đối kháng mạnh thì chỉ ghi nhận được chủng TA7L1 có khả năng đối kháng mạnh nhất ($(\overline{D-d}) = 5$ mm) và có sự khác biệt thống kê so với các chủng còn lại.



Hình 7. Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của các chủng *Lactobacillus* bằng phương pháp đối kháng trực tiếp



Hình 8. Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của các chủng *Lactobacillus* bằng phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch

Đối với dòng vi khuẩn *Lactobacillus* cơ chế kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus* có thể là do sinh lactic acid hoặc sinh các chất kháng khuẩn (bacteriocin...) do đó với phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch cho biết được các chủng có khả năng sinh chất kháng khuẩn hay không. Vòng vô khuẩn xung quanh lỗ thạch chứng tỏ chủng có tiết chất kháng khuẩn ức chế khả năng sinh trưởng của *V. parahaemolyticus* (Hình 8). Từ kết quả thí nghiệm Bảng 3 cho thấy tất cả các chủng thử nghiệm đều có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*. Trong đó TA7L1 có khả năng đối kháng mạnh nhất ($(\overline{D-d}) = 4,17$ mm > 4).

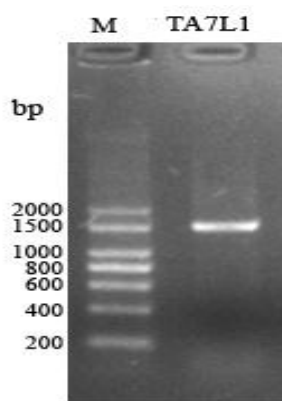
Qua thí nghiệm khảo sát khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* gây bệnh EMS bằng hai phương pháp đối kháng trực tiếp trên hai lớp thạch và khuếch tán trên lỗ thạch cho thấy tất cả 8 chủng *Lactobacillus* đều có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*. Trong đó, chủng cho kết quả đối kháng mạnh nhất với *V. parahaemolyticus* trên cả hai phương pháp là TA7L1. Chủng TA7L1 là chủng được phân lập từ ruột tôm nên được đánh giá là an toàn và có khả năng tồn tại trong đường tiêu hóa của tôm nên có thể sử dụng trong chế phẩm probiotic phòng trừ bệnh EMS trên tôm.

Định danh *Lactobacillus* bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA và MALDI-TOF

Bộ gene của các chủng tuyển chọn TA7L1 được tách chiết. Trình tự 16S rDNA trên bộ gen được nhân bản bằng phương pháp PCR và chạy điện di trên gel agarose 1 % để kiểm tra kết quả. Trên Hình 9 cho thấy đã thu nhận được đoạn trình tự DNA (~ 1500 bp) mã hóa cho 16S rDNA của chủng TA7L1.

Kết quả so sánh độ tương đồng di truyền vùng 16S rDNA của chủng TA7L1 với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST, cho thấy vùng

có độ tương đồng với chủng *Lactobacillus plantarum* đến 99 %. Chủng TA7L1 được định danh khẳng định lại bằng phương pháp MALDI – TOF cho kết quả tương tự phương pháp phân tích trình tự 16S – rDNA là *Lactobacillus plantarum* (Bảng 4). Chủng TA7L1 có khả năng đối kháng mạnh với *V. parahaemolyticus* và là chủng *Lactobacillus plantarum* đã được khoa học chứng minh là chủng an toàn [5, 10, 11]. Chủng được phân lập từ ruột tôm nên có tiềm năng ứng dụng trong việc làm chế phẩm hoặc thức ăn cho tôm nhằm giúp tôm phòng và chống lại bệnh EMS.



Hình 9. Kết quả điện di trên gel agarose sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen 16S-rDNA của chủng TA7L1
M: thang chuẩn DNA T1 (CBB); TA7L1: sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen 16S-rDNA của chủng TA7L1

Bảng 4. Tóm tắt kết quả định danh bằng MALDI – TOF của chủng TA7L1

Chủng	Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
TA7L1	1 (++)	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 2601 DSM	2.28	<u>1590</u>

KẾT LUẬN

Từ các mẫu tôm bệnh được lấy tại Sóc Trăng đã phân lập, làm thuần và sàng lọc được 2 chủng *V. parahaemolyticus* là V18 và V21. Cả hai chủng đều có khả năng gây hội chứng EMS trên tôm, trong đó chủng V18 được đánh giá có khả năng gây độc mạnh hơn so với chủng V21.

Từ 30 mẫu đất, nước, tôm thu nhận tại các ao nuôi tôm tại Sóc Trăng đã phân lập và sàng lọc được 8 chủng vi khuẩn *Lactobacillus*, hầu hết các chủng

đều có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* trên môi trường thạch đĩa, trong đó chủng TA7L1 có khả năng đối kháng mạnh nhất với *V. parahaemolyticus*. Kết quả định danh dựa trên phân tích trình tự 16S rDNA và MALDI – TOF cho thấy TA7L1 thuộc loài *Lactobacillus plantarum*, có tiềm năng sử dụng trong chế phẩm phòng trừ bệnh EMS trên tôm.

Isolation and selection of *Lactobacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* causing the (Early Mortality Syndrome) shrimp disease in Soc Trang province

• Do Thi Thanh Dung

• Vo Dinh Quang

Branch of National Center for Technological Progress in Ho Chi Minh City

• Phan Thi Phuong Trang

Center for Bioscience and Biotechnology –University of Science, Vietnam National University-Ho Chi Minh City

ABSTRACT

Early mortality syndrome (EMS) caused by pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* is one of the most major factors affecting the development of aquaculture. Using the antagonism of probiotics against pathogens is an alternative strategy to antibiotics and has lots of potential to control pathogenic bacteria. In this study, we isolated and screened total of 8 *Lactobacillus* strains from 30 mud, water and shrimp samples at shrimp ponds in Soc Trang province. All of them

Keywords: Early mortality syndrome, *Lactobacillus*, *V. parahaemolyticus*.

were be able resistant with *Vibrio parahaemolyticus* strains causing the EMS shrimp disease in vitro. In which, TA7L1 strain showed the strongest resistance and was identified as *Lactobacillus plantarum* by analysing 16S rDNA sequence and MALDI-TOF. TA7L1 strain was determined safety and has potential application in the production of biological products to prevent EMS shrimp disease.

Acute hepatopancreatic necrosis syndrome,

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. N.T.T. Châu, N.H.S. Uyên, Phân lập và đặc tính hóa vi khuẩn lactic đối kháng với *Vibrio* spp. gây bệnh từ ao nuôi tôm ở Thừa Thiên Huế, Báo cáo Khoa học về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, 00: 1224–1227 (2009).
- [2]. N.L. Dũng, Thực tập vi sinh vật học, NXB Đại Học và Trung Học Chuyên Nghiệp, Hà Nội (1983).
- [3]. N.T. Hiền, Q.V. Tây, B.Q. Tề, Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi tại tỉnh Sóc Trăng trong năm 2011, Khoa học Kỹ thuật Thú y, 21, 1, (2014).
- [4]. L. Tran, P. Hoang, T. Nguyen, D.V. Lightner, Thí nghiệm xác định đường lây của tác nhân gây

bệnh của hội chứng hoại tử gan tụy cấp (AHPNS) hay hội chứng tôm chết sớm (EMS), Aquaculture Pathology Laboratory, School of Comparative Animal and Biomedical (2012).

- [5]. D. Adawi, G. Molin, S. Ahrne', B. Jeppsson, Safety of the Probiotic Strain *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 ($\frac{3}{4}$ strain 299v) in an Endocarditis Animal Model, Microbial ecology in Health and Disease, 14, 1 (2002).
- [6]. J.L. Balcázar, I. de Blas, I.R. Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell, J.L. Múzquiz, The role of probiotics in aquaculture, *Veterinary Microbiology*, 114, 3–4, 173–186 (2006).

- [7]. W. Purivirojkul, Areechon, Application of *Bacillus* spp. isolated from intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*) from natural habita for control pathogenic bacteria in aquaculture. *Kasetsart J. Nat. Sci*, 41, 125–132 (2007).
- [8]. B. Kosin, S.K. Rakshit, Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonous thermotolerant probiotics for application to white shrimp feed, *Aquaculture*, 306, 1–4, 302–309 (2010).
- [9]. L.Trần, L. Nunan, R.M. Redman, L.L. Mohney, C.R. Pantoja, K. Fitzsimmons, D.V. Lightner, Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp, *Diseases of aquatic organisms*, 105: 45–55 (2013).
- [10]. N.P. Shah, Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods, *Journal of Dairy Science*, 83: 894–907 (2000).
- [11]. S.E. Hütt, P.M. Rätsep, E. Shkut, S. Kõljalg, K. Truusalu, J. Stsepetova, I. Smidt, H. Kolk, M. Zagura, M. Mikelsaar, Safety of a probiotic cheese containing *Lactobacillus plantarum* Tensia according to a variety of health indices in different age groups, *Journal of Dairy Science*, 95(10): 5495–509 (2012).