



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.035

PHÂN LẬP, SÀNG LỌC VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN KEO TỤ SINH HỌC TRONG AO NUÔI TÔM THẺ CHÂN TRẮNG TẠI TỈNH TRÀ VINH

Phạm Minh Nhựt*, Đinh Ngọc Phương Trinh và Võ Lan Hương

Viện Khoa học Ứng dụng HUTECH, Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: [Phạm Minh Nhựt \(email: pm.nhut@hutech.edu.vn\)](mailto:pm.nhut@hutech.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 19/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Isolation, screening and identification of flocculating bacteria from shrimp ponds at Tra Vinh province

Từ khóa:

Hoạt tính sinh học, hữu cơ lơ lửng, keo tụ sinh học, khí độc, nuôi trồng thủy sản

Keywords:

Aquaculture, bioactivity, bio-flocculant activity, suspended organic matter, toxic gas

ABSTRACT

Aquaculture industry has been developing in Vietnam, however, the water pollution in ponds caused many difficult problems for aquaculture, especially shrimp farming. The use of microbial products to stabilize water quality, reduce the amount of suspended organic matter in the water and reduce the toxic gas in water is essential and bacterial strains with bio-flocculant activity are as solution. From 13 water samples collected from shrimp ponds at Tra Vinh province, 59 isolates were isolated including 39 isolates of Gram positive bacteria and 18 isolates of Gram negative bacteria. After screening these bacteria by Gram staining and spore staining methods, 22 isolates that were Gram positive and spore bacteria were identified. The flocculating rate of 22 Gram positive isolates with kaolin suspension showed that MS 9.4 had the strongest flocculating rate (75,83%). MS 9.4 isolate was identified by the 16S-rRNA sequencing and biological test. Some biological activities including salinity tolerance, acid tolerance, bile salt tolerance were identified. The biochemical characteristics of MS 9.4 were similar to *Bacillus subtilis*, while 16S-rRNA gene sequence of MS 9.4 strain was 100% similar to *Bacillus subtilis* LAM12118, so MS 9.4 was identified as *Bacillus subtilis*. This strain is resistant to salt (7%), tolerate with low pH (pH = 2), bile salt tolerant (2%) but it did not inhibit *Vibrio* spp.

TÓM TẮT

Ngành nuôi trồng thủy sản nước ta đã và đang phát triển mạnh nhưng vấn đề về ô nhiễm nguồn nước cũng đã gây ra rất nhiều khó khăn cho sự phát triển bền vững, đặc biệt là nghề nuôi tôm thẻ chân trắng. Sử dụng các chế phẩm vi sinh giúp ổn định chất lượng nước, giảm lượng hữu cơ lơ lửng đồng thời giảm khí độc trong nước là điều cần thiết. Từ 13 mẫu nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại tỉnh Trà Vinh, đã phân lập được 57 chủng vi khuẩn, trong đó có 39 chủng vi khuẩn Gram dương và 18 chủng vi khuẩn Gram âm. Sau khi sàng lọc sơ bộ bằng phương pháp nhuộm Gram và nhuộm bào tử đã chọn được 22 chủng vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử trong đó có 4 chủng thuộc nhóm cầu khuẩn. Khảo sát hoạt tính keo tụ sinh học của 22 chủng vi khuẩn Gram dương với cơ chất là dịch kaolin cho thấy rằng chủng MS 9.4 có tỷ lệ keo tụ cao nhất (75,83%). Chủng vi khuẩn này được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S-rRNA và các chỉ tiêu sinh hoá. Các đặc điểm sinh học bao gồm khả năng chịu mặn, chịu acid, chịu muối mật cũng được xác định. Các đặc điểm sinh hóa của chủng MS9.4 tương đồng với loài *Bacillus subtilis*, đồng thời chủng MS 9.4 có trình tự gen 16S-rRNA tương đồng 100% với chủng *Bacillus subtilis* LAM12118 nên chủng MS 9.4 được định danh là *Bacillus subtilis* MS 9.4. Chủng này có khả năng chịu mặn (7%), chịu được pH thấp (pH = 2), chịu được muối mật (2%) nhưng không có khả năng kháng với *Vibrio* spp.

Trích dẫn: Phạm Minh Nhựt, Đinh Ngọc Phương Trinh và Võ Lan Hương, 2019. Phân lập, sàng lọc và khảo sát hoạt tính sinh học của vi khuẩn keo tụ sinh học trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại tỉnh Trà Vinh. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 270-276.

1 GIỚI THIỆU

Việt Nam là nước có ngành nuôi trồng thủy sản phát triển mạnh và sản lượng thủy hải sản đã và đang mang lại giá trị kinh tế cao với sản lượng nuôi ngày càng tăng theo các năm (theo số liệu của Tổng cục Thủy sản năm 2017). Chính vì giá trị kinh tế cao của ngành nuôi trồng thủy sản mang lại nên người dân bắt đầu nuôi với mật độ dày hơn và ô ạt hơn, vì thế khả năng xảy ra nguy cơ dịch bệnh cũng tăng cao. Để giảm thiểu những nguy cơ đó, một trong những vấn đề cần quản lý tốt là nguồn nước ao nuôi. Nguyên nhân gây ô nhiễm nguồn nước ao nuôi là do thức ăn dư thừa dẫn đến dễ tạo điều kiện phát sinh các dịch bệnh nguy hiểm như bệnh phát sáng, bệnh đốm trắng, bệnh co thân... (Kasan *et al.*, 2015). Để xử lý các hợp chất hữu cơ trong nước, có rất nhiều các phương pháp như: vật lý (lắng, lọc, siphon, sử dụng tia cực tím,...), hóa học (xử lý bằng phương pháp purolite tốc độ cao, sử dụng ozon, các biện pháp kết tủa, kết bông,...), và sinh học (sử dụng chế phẩm sinh học – probiotic) và một trong những phương pháp mới là sử dụng vi sinh vật keo tụ sinh học (Kasan *et al.*, 2015).

Hợp chất keo tụ là sản phẩm được hình thành trong quá trình phát triển của vi khuẩn, nấm, tảo (Desouky *et al.*, 2008). Vi khuẩn sản xuất chất keo tụ sinh học là những loài vi khuẩn có thể sử dụng chất dinh dưỡng trong môi trường để tổng hợp các hợp chất đa phân tử trong tế bào dưới sự hoạt động của các enzyme đặc biệt, sau đó chúng có thể được bài tiết ra ngoài và tồn tại trong môi trường hoặc trên bề mặt vỏ tế bào vi khuẩn, các hợp chất này có khả năng tạo sự kết tụ với các chất khác nhau và tạo thành một khối nhầy lắng xuống đáy. Chính vì thế, vi khuẩn keo tụ giúp giảm các hợp chất hữu cơ lơ lửng trong nước một cách đáng kể, giúp ổn định chất lượng nước ao nuôi (Luo *et al.*, 2016).

Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính keo tụ sinh học cao sẽ mở ra một giải pháp mới để xử lý nguồn chất hữu cơ lơ lửng trong nước đồng thời xử lý một số khí độc trong ao nuôi là điều hết sức cần thiết. Mục tiêu của nghiên cứu này là tiến hành phân lập, sàng lọc và xác định một số yếu tố ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn keo tụ sinh học từ nguồn nước ao nuôi tôm.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Mẫu nước ao nuôi

Thu 13 mẫu nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng từ 13 mẫu nước ao nuôi được thi tại ấp Hoà Minh, xã Long Hưng I, huyện Châu Thành, tỉnh Trà Vinh, gồm có nhóm 1 với 4 mẫu nước ao đang trong quá trình nuôi (ao số 2, 3, 10 và 11) và nhóm 2 với 9 mẫu nước ao sau khi thu hoạch 2 tuần.

2.2 Phương pháp thu mẫu

Các mẫu được thu ở vị trí gần đáy ao bằng cách sử dụng một gàu để múc nước. Mẫu nước sẽ bao gồm 2 phần nước và bùn. Các mẫu sau khi thu được bảo quản lạnh và vận chuyển về phòng thí nghiệm.

2.3 Phân lập vi khuẩn

Các mẫu nước sau khi thu sẽ được phân lập theo phương pháp cải tiến của Luo *et al.* (2016). Các mẫu nước được để lắng trong phễu chiết quả lê trong vòng 48 giờ rồi thu phần mẫu lắng. Pha loãng và cấy trải mẫu ở các nồng độ pha loãng 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} trải trên môi trường nuôi cấy (meat extract 3g/L, peptone 10g/L, NaCl 5g/L, agar 18 g/l). Mẫu được ủ ở 30°C trong thời gian 72 giờ, chọn khuẩn lạc đặc trưng và tiến hành làm thuần rồi bảo quản trong glycerol. Các chủng vi khuẩn này được định danh sơ bộ bằng nhuộm Gram và bào tử.

Các chủng vi khuẩn được nhuộm Gram như sau: tiến hành tạo vết bôi trên lame, để khô vết bôi trong không khí hoặc hơi nhẹ trên đèn cồn. Tiêu bản được nhuộm bằng crystal violet trong 30 giây rồi rửa nước. Nhuộm lugol trong 1 phút, rửa nước, rồi tẩy cồn trong 30 giây và rửa nước. Nhuộm bổ sung fuchsin trong 20 giây, rửa nước. Làm khô và soi tiêu bản ở vật kính 100X.

Các chủng được nhuộm bào tử như sau: tạo vết bôi vi khuẩn trên lame rồi đặt lame lên miếng giấy lọc trên cốc nước đun sôi. Cho dung dịch malachite green 5% vào vết bôi và đặt lame có sinh khối của vi khuẩn lên miếng giấy lọc trên cốc và để trong thời gian 5 phút, sau đó, vết bôi được rửa bằng nước cất trong khoảng thời gian 30 giây. Nhuộm bổ sung với thuốc nhuộm fuchsin trong 75 giây; rửa lại bằng nước rồi thấm khô; quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X

2.4 Sàng lọc các chủng vi khuẩn có hoạt tính keo tụ sinh học

Đánh giá khả năng sinh các hợp chất keo tụ sinh học theo phương pháp của Luo *et al.* (2016). Vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường Trypticase soya broth (TSB) bổ sung NaCl nồng độ 15 g/l ở nhiệt độ phòng trong điều kiện lắc (150 vòng/phút) trong 24 giờ. Sau đó cấy vi khuẩn đã hoạt hóa vào môi trường lên men (glucose 20g/L, KH_2PO_4 2g/L, K_2HPO_4 5g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2g/L, NaCl 0,1g/L, urea 0,5g/L, yeast extract 0,5g/L). Lắc ở tốc độ 150 vòng/phút trong 96 giờ.

Đánh giá khả năng sinh hợp chất keo tụ sinh học của các dòng vi khuẩn bằng hỗn hợp gồm 93 ml dung dịch kaolin (5 g/l); 5 ml dung dịch CaCl_2 1%, pH = 7; 2 ml dịch vi khuẩn ở mật độ 10^8 cfu/ml. Hỗn hợp được lắc trên máy lắc xoay vòng ở tốc độ 180 vòng/phút trong 1,5 phút rồi 80 vòng/phút trong 3

phút, để lắng 10 phút, sau đó hút dịch trong đo OD ở bước sóng 550 nm. Mẫu đối chứng thực hiện tương tự nhưng thay chủng vi khuẩn bằng nước cất vô trùng, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Tỷ lệ kết tụ được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ keo tụ (\%)} = \frac{\text{OD đối chứng} - \text{OD mẫu}}{\text{OD đối chứng}} \times 100\%$$

(Luo et al., 2016)

2.5 Định danh vi khuẩn

Chủng vi khuẩn có hoạt tính keo tụ mạnh sẽ được định danh bằng các thử nghiệm sinh hoá bao gồm: thử nghiệm catalase, Voges – Proskauer, khả năng tăng trưởng trong môi trường Nutrient broth (NB) ở nhiệt độ 50^oC và 60^oC, tăng trưởng trong môi trường 7% NaCl, thử nghiệm nitrate hoá, khả năng thủy phân tinh bột và phân huỷ casein. Sau đó, được giải trình tự 16S-rRNA tại Công ty Nam Khoa Biotek.

2.6 Đánh giá khả năng chịu mặn, chịu pH và chịu muối mật của chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường TSB + 1,5% NaCl ở 30^oC trong 24 giờ. Sau đó đo OD ở bước sóng 600 nm để xác định mật độ và pha loãng để được mật độ 10⁶ cfu/ml và sử dụng mật độ này để tiến hành thí nghiệm.

Tiến hành đánh giá khả năng chịu mặn của vi khuẩn trong môi trường TSB có bổ sung NaCl với nồng độ từ 0%, 2%, 4%, 6% và 8% trong các thời điểm 0, 24, 48, 72, 96 và 120 giờ; khả năng chịu pH của vi khuẩn trong môi trường TSB có pH 1, 2, 3, 4

trong thời gian 0, 1, 2, 3, 4 giờ; khả năng chịu muối mật trong môi trường TSB có bổ sung muối mật ở các nồng độ 0%, 0,5%, 1%, 1,5% và 2% trong thời gian 0, 1, 2, 3, 4 giờ. Tại mỗi thời điểm khảo sát tiến hành đo OD ở bước sóng 600 nm để xác định mật độ vi khuẩn.

2.7 Xử lý kết quả:

Thí nghiệm được lặp lại ba lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn từ nguồn nước ao nuôi

Từ 13 mẫu nước ao nuôi tôm, sau khi phân lập và tuyển chọn trên môi trường Trypticase soya agar (TSA) có bổ sung NaCl 1,5% đã thu được 57 chủng vi khuẩn. Trong 57 chủng vi khuẩn được phân lập có 18 chủng phân lập được từ 4 nguồn nước các ao đang trong quá trình nuôi và 39 chủng được phân lập từ 9 ao nuôi sau quá trình nuôi. Tiến hành định danh sơ bộ của các chủng vi khuẩn được phân lập, nhận thấy rằng trong 57 chủng có 22 chủng vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử, 17 chủng Gram dương, không sinh bào tử và 18 Gram âm.

Mục tiêu của nghiên cứu là tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính keo tụ sinh học thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương và sinh bào tử, vì thế 22 chủng vi khuẩn Gram dương sinh bào tử được sử dụng để tuyển chọn hoạt tính keo tụ sinh học, được trình bày ở Bảng 1.

Bảng1: Hình thái khuẩn lạc của 22 chủng vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử

Ao nuôi	Chủng	Hình thái khuẩn lạc	Ao nuôi	Chủng	Hình thái khuẩn lạc	
Ao số 1 – sau thu hoạch 2 tuần	MS 1.1	Tròn, lồi, trong suốt, rìa đều, bóng, đường kính < 0,5mm Hình cầu	Ao số 6 – sau thu hoạch 2 tuần	MS 6.2	Tròn, lồi, bóng, rìa đều, trắng trong, tâm hồng, đường kính > 0,5 mm Hình que	
	MS 1.2	Tròn, dẹt, trắng đục, rìa đều, bóng, đường kính ≥ 2mm Hình que		Ao số 7 – sau thu hoạch 2 tuần	MS 7.1	Tròn, lồi, bóng, trắng đục, tâm màu da, rìa đều, đường kính > 0,5mm Hình que
	MS 1.4	Tròn, lồi, bóng, vàng, rìa đều, đường kính ≥ 0,5 mm Hình que			MS 7.2	Tròn, dẹt, trắng đục, rìa phân thùy, đường kính > 2mm Hình que
Ao số 2 – đang giai đoạn nuôi	MS 2.1	Tròn, dẹt, trắng đục, rìa đều, tâm vàng nhạt, đường kính ≥ 2mm Hình que	Ao số 8 – sau thu hoạch 2 tuần	MS 8.2	Tròn, dẹt, không bóng, trắng trong, rìa răng cưa, đường kính ≈ 0,5mm Hình que	
	MS 2.2	Tròn, lồi, bóng, trắng trong, rìa đều, đường kính ≤ 0,5mm Hình cầu		Ao số 9 – sau thu hoạch 2 tuần	MS 9.2	Tròn, dẹt, rìa răng cưa, trắng trong, nhám có tâm trắng hồng, đường kính > 0.5 mm Hình que
Ao số 4 – sau thu hoạch 2 tuần	MS 4.1	Tròn, lồi, bóng, trắng đục, rìa đều, đường kính > 0,5mm Hình que	Ao số 10 – đang giai đoạn nuôi		MS 10.1	Tròn, rìa đều, trắng trong, lồi, tâm trắng đục, đường kính ≈ 5mm Hình que
	MS 4.2	Tròn, lồi, bóng, trắng trong, rìa đều, đường kính > 0,5mm Hình que		Ao số 11 – đang giai đoạn nuôi	MS 11.1	Tròn, nhám, dẹt, rìa răng cưa, tâm lồi, trắng đục, đường kính ≈ 5mm Hình que
	MS 4.3	Tròn, rìa phân thùy, dẹt, trắng đục, đường kính > 2mm Hình que			Ao số 12 – sau thu hoạch 2 tuần	MS 12.2
Ao số 5 – sau thu hoạch 2 tuần	MS 5.1	Tròn, rìa đều, trắng đục, lồi, đường kính ≈ 0,5mm Hình que	MS 13.1	MS 13.1		Tròn, dẹt, tâm lồi trắng đục, rìa phân thùy, đường kính > 2mm Hình que
	MS 5.4	Tròn, dẹt, đen, rìa răng cưa, trắng đục, đường kính > 0,5mm Hình cầu		Ao số 13 – sau thu hoạch 2 tuần		MS 13.2
	MS 5.6	Tròn, dẹt, trắng đục, rìa răng cưa, đường kính ≥ 2mm Hình cầu	MS 13.3		MS 13.3	Tròn, lồi, rìa đều, bóng, vàng, đường kính ≥ 2mm Hình que
Ao số 6 – sau thu hoạch 2 tuần	MS 6.1	Tròn, lồi, bóng, rìa răng cưa, trắng sữa, đường kính > 2mm Hình que				

3.2 Kết quả đánh giá hoạt tính keo tụ sinh học của các chủng vi khuẩn phân lập

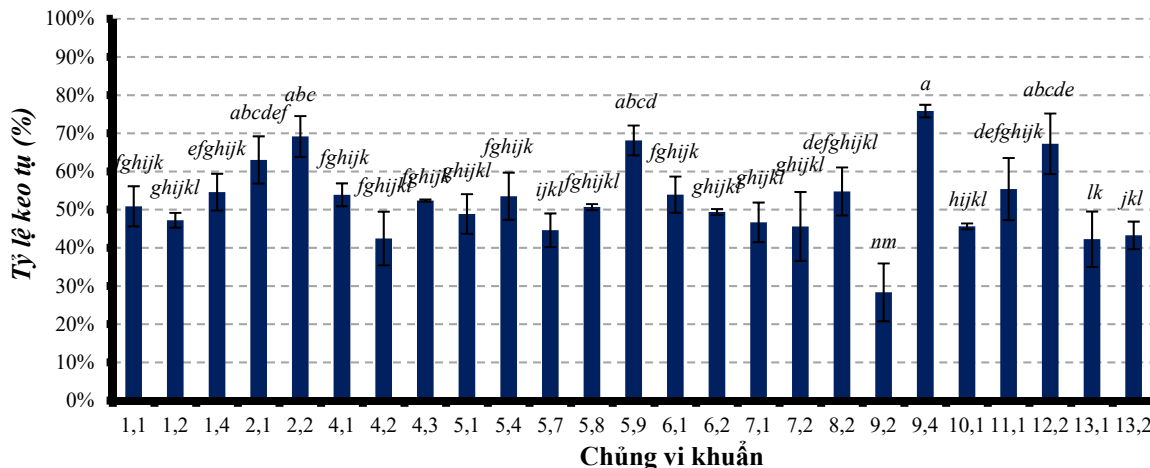
Kết quả đánh giá hoạt tính keo tụ sinh học của 22 chủng vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử được trình bày ở Hình 1.

Kết quả sàng lọc hoạt tính keo tụ sàng lọc của 22 chủng vi khuẩn Gram dương sinh bào tử đã phân lập

được thể hiện trên Hình 1. Tất cả 22 chủng vi khuẩn này đều có hoạt tính keo tụ sinh học nhưng hoạt tính keo tụ sinh học không đồng đều và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05). 22 chủng vi khuẩn khảo sát thuộc Gram dương, sinh bào tử thuộc 2 nhóm mẫu. Nhóm 1 có 4 chủng gồm MS 2.1; MS 2.2; MS 10.1 và MS11.1 được phân lập từ 4 ao đang trong quá trình nuôi có tỷ lệ keo tụ sinh học từ

45,61% đến 69,15%, và tỷ lệ keo tụ cao nhất thuộc về chủng MS 2.2. Nhóm 2 gồm 18 chủng được phân lập từ 9 ao đang trong quá trình nghi có tỷ lệ keo tụ từ 23,67% đến 75,82% và tỷ lệ keo tụ cao nhất thuộc về chủng MS 9.4. Hình dạng tế bào vi khuẩn, 4 chủng vi khuẩn hình cầu (MS 1.1; MS 2.2; MS 5.4; MS 10.1) có tỷ lệ keo tụ từ 45,61% đến 69,15% (tỷ lệ keo tụ cao nhất là chủng MS 2.2) trong khi đó 18 chủng vi khuẩn hình que có tỷ lệ keo tụ sinh học từ 28,33% đến 75,82% (tỷ lệ keo tụ cao nhất là chủng

MS 9.4). Như vậy, từ kết quả khảo sát hoạt tính keo tụ sinh học của 22 chủng vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử, chủng MS 9.4 có tỷ lệ keo tụ cao nhất là 75,82%. Chủng MS 9.4 có những đặc điểm khuẩn lạc được nuôi cấy trên môi trường Nutrient agar (NA) trong thời gian 48 giờ ở nhiệt độ phòng như sau: tròn, rìa đều, trắng trong tâm trắng đục, có đường kính xấp xỉ 5mm thuộc nhóm trực khuẩn Gram dương, sinh bào tử và được phân lập từ ao nuôi đang trong giai đoạn nghi.



Hình 1: Kết quả sàng lọc hoạt tính keo tụ của 22 chủng vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử

Kết quả nghiên cứu của Luo *et al.* (2016) thì có 48 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ mẫu nước ao nuôi cá chép tại tỉnh Hắc Long Giang, Trung Quốc, trong đó chủng *Bacillus megaterium* SP1 cho tỷ lệ keo tụ sinh học cao nhất trong số 48 chủng khảo sát là 91%. SP1 có các đặc điểm là tròn, trắng trong, bóng, thuộc nhóm trực khuẩn Gram dương. So với đặc điểm hình dạng khuẩn lạc và hình thái tế bào của *Bacillus megaterium* SP1, chủng MS 9.4 có những đặc điểm tương đồng, vì thế, chủng MS 9.4 đã được tiến hành định danh.

3.3 Kết quả định danh chủng vi khuẩn MS 9.4

Chủng vi khuẩn MS 9.4 được định danh bằng các thử nghiệm sinh hoá và giải trình tự 16s-rRNA. Các đặc điểm sinh hoá của MS 9.4 được trình bày ở Bảng 2.

Kết quả định danh sinh hóa của chủng MS 9.4 cho thấy chủng này thuộc loài *Bacillus subtilis*. Theo kết quả định danh sinh hoá được trình bày trong The Prokaryote (Slebecky and Hemphill, 2006), *Bacillus subtilis* thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử, có hình dạng khuẩn lạc tròn, nhẵn, trắng đục được nuôi cấy trong môi trường TSA (hoặc NA), có khả năng sinh enzyme catalase, tạo ra acetoin trong môi trường glucose – phosphate (thử nghiệm Voges – Proskauer), tăng trưởng tốt ở

nhệt độ 50°C nhưng lại bị kim hãm ở 65°C. *B. subtilis* chịu được nồng độ muối 7%, nhưng không sinh hơi và acid trong môi trường glucose. *B. subtilis* có thử nghiệm nitrate và citrate dương tính đồng thời có khả năng phân hủy casein và tinh bột.

Bảng 2: Các đặc điểm sinh hoá của *Bacillus subtilis* (Slebecky and Hemphill, 2006) và chủng MS 9.4.

Thử nghiệm	Vi khuẩn	
	<i>Bacillus subtilis</i>	Chủng MS 9.4
Hình thái khuẩn lạc	Tròn, nhẵn, trắng đục	Tròn, nhẵn, trắng đục
Gram	+	+
Sinh bào tử	+	+
Catalase	+	+
Voges – Proskauer	+	+
Tăng trưởng ở 50°C	+	+
Tăng trưởng ở 65°C	-	-
Tăng trưởng trong môi trường 7% NaCl	+	+
Sinh acid và hơi trong môi trường glucose	-	-
Nitrate	+	+
Citrate	+	+
Phân hủy tinh bột	+	+
Phân hủy casein	+	+

(+): dương tính; (-): âm tính

Các thử nghiệm sinh hóa cho thấy chủng vi khuẩn MS 9.4 có các kết quả sinh hóa tương đồng với *B. subtilis* (Slebecky and Hemphill, 2006). Đồng thời, kết quả giải trình tự 16S-rRNA cho thấy chủng MS 9.4 tương đồng 100% với chủng *Bacillus subtilis* IAMI2118 nên chủng MS 9.4 được định danh là *Bacillus subtilis* MS 9.4.

3.4 Kết quả khảo sát khả năng chịu mặn, chịu pH và chịu muối mật của *B. subtilis* MS 9.4

Kết quả khảo sát khả năng chịu mặn, chịu pH và chịu muối mật của *B. subtilis* MS 9.4 được trình bày ở Bảng 3; Bảng 4 và Bảng 5.

Kết quả khảo sát này cho thấy rằng *B. subtilis* MS 9.4 không chịu được pH 1,0 do mật độ của tế bào đã giảm đáng kể sau 4 giờ nuôi cấy. Ở pH 2,0, vi khuẩn *B. subtilis* MS 9.4 chỉ có thể chịu được tới 2 giờ, nhưng sau đó mật độ tế bào lại giảm. Ở giá trị pH 3,0 và 4,0 *B. subtilis* MS 9.4 có khả năng chịu được và duy trì tốt mật độ sau 4 giờ nuôi cấy. Khi so sánh với nghiên cứu của Hồ Thị Trường Thy và ctv (2011) về khảo sát một số đặc tính chủng *Bacillus subtilis* B20.1 là cơ sở cho việc sản xuất probiotic. Trong thí nghiệm chủng *Bacillus subtilis* B20.1 có thể chịu được pH 4,0 trong 24 giờ. Như

vậy so với chủng *B. subtilis* B20.1 thì khả năng chịu pH của chủng *Bacillus subtilis* MS 9.4 tốt hơn.

Bảng 3: Kết quả đo OD600nm của vi khuẩn *B. subtilis* MS 9.4 ở các giá trị pH khác nhau

Giá trị pH				
Thời gian	1	2	3	4
0 giờ	0,54	0,57	0,60	0,54
1 giờ	0,59	0,59	0,84	0,63
2 giờ	0,60	0,61	0,64	0,66
3 giờ	0,54	0,60	0,63	0,58
4 giờ	0,43	0,55	0,69	0,60

Bảng 4: Kết quả đo OD600nm của vi khuẩn *B. subtilis* MS 9.4 ở các nồng độ muối mật khác nhau

Nồng độ muối mật				
Thời gian	0,3%	0,5%	1%	2%
0 giờ	0,41	0,38	0,37	0,37
1 giờ	0,23	0,21	0,23	0,24
2 giờ	0,18	0,18	0,18	0,17
3 giờ	0,26	0,19	0,21	0,18
4 giờ	0,49	0,38	0,35	0,30

Bảng 5: Kết quả đo OD600nm của vi khuẩn *B. subtilis* MS 9.4 ở các nồng độ NaCl khác nhau

Nồng độ NaCl								
Thời gian	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%
0 giờ	0,34	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,33
24 giờ	1,30	1,50	1,36	1,31	1,22	1,37	1,35	1,37
48 giờ	1,76	1,73	1,68	1,54	1,37	1,60	1,52	1,46
72 giờ	1,86	1,89	1,82	1,81	1,53	1,82	1,67	1,66
96 giờ	2,01	2,03	2,02	2,04	1,98	2,05	1,73	1,65
120 giờ	2,30	2,21	2,18	2,15	2,27	2,28	2,00	0,21

Kết quả khảo sát khả năng chịu muối mật cho thấy chủng *Bacillus subtilis* MS 9.4 có khả năng chịu được muối mật trong các nghiệm thức khảo sát. Mặc dù ở thời điểm 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ mật độ vi khuẩn có giảm nhưng lại tăng lên vào thời điểm 4 giờ, điều này có thể do muối mật là tác nhân ức chế rất mạnh đối với vi khuẩn Gram dương nên trong thời gian đầu nuôi cấy thì vi khuẩn *Bacillus subtilis* MS 9.4 bị kiềm hãm. Thời điểm 4 giờ thì vi khuẩn thích nghi và bắt đầu tăng trưởng trở lại. Theo Gilliland *et al.* (1984), nồng độ 0,3% được coi là nồng độ quan trọng để sàng lọc các chủng chịu được muối mật. So với nghiên cứu của Hồ Thị Trường Thy và ctv (2011) chủng *B. subtilis* B20.1 có thể chịu được nồng độ muối mật 2%. Như vậy, so với chủng *Bacillus subtilis* B20.1 thì khả năng chịu muối mật của chủng *Bacillus subtilis* MS 9.4 tương đương.

Kết quả khảo sát khả năng chịu mặn cho thấy, chủng *Bacillus subtilis* MS 9.4 có thể sống sót và phát triển mạnh ở tất cả các nồng độ muối khảo sát để thời điểm 96 giờ. Sau 120 giờ thì mật độ *Bacillus subtilis* MS 9.4 ở nồng độ 8% đã giảm đáng kể. So với nghiên cứu của Hồ Thị Trường Thy và ctv (2011) về khả năng chịu mặn của chủng *B. subtilis* B20.1, chủng này có thể chịu được nồng độ mặn từ 0,5% cho tới 6% trong khi chủng *B. subtilis* MS 9.4 lại có thể chịu được nồng độ muối tới 8%.

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *B. subtilis* MS 9.4 được phân lập từ nguồn nước ao nuôi tôm có hoạt tính keo tụ mạnh đồng thời có khả năng chịu được giá trị pH thấp, nồng độ muối mật cao cũng như khả năng chịu mặn tốt. Kết quả này cho thấy khả năng ứng dụng của *B. subtilis* MS 9.4 trong điều kiện nuôi tôm để xử lý các hợp chất hữu cơ lơ lửng trong ao nuôi là rất tốt. Đồng thời, chủng *B. subtilis* MS 9.4 cũng có khả năng sản sinh khá nhiều các enzyme ngoại bào như amylase, cellulase,

proteinase (số liệu chưa công bố) nên chủng này có thể sử dụng như dạng chế phẩm kết hợp giữa ổn định chất lượng nước ao nuôi và probiotic trong việc nâng cao hiệu quả tăng trưởng ở tôm.

4 KẾT LUẬN

Từ 13 mẫu nước ao nuôi tôm thu từ Trà Vinh đã phân lập được 57 chủng vi khuẩn, sau khi sàng lọc hoạt tính keo tụ sinh học và định danh đã xác định đó là vi khuẩn *B. subtilis* MS 9.4. Chủng này có hoạt tính keo tụ sinh học tốt nhất đồng thời có khả năng chịu pH thấp, muối mật và chịu mặn cao. Chủng này sẽ được bảo quản và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Hồ Thị Trường Thy, Nguyễn Nữ Trang Thùy, Võ Minh Sơn, 2011. Khảo sát một số đặc tính chủng *Bacillus subtilis* 20.1 làm cơ sở cho việc sản xuất probiotic phòng bệnh gan thận mũ do *Edwardsiella ictaluri* trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) nuôi thâm canh. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Thủy sản Toàn quốc. 226 – 233.

Desouky, A., Roda, F.A., Thourya, A., Sidra, A., Fatima, H., 2008. Isolation and characterization of extracellular biofloculant produced by

bacteria isolated from Qatari Ecosystems. Polish Journal of Microbiology. 57: 231-239.

Gilliland S.E., Staley T.E., Bush L.J., 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. Journal of Dairy Science. 67: 3045 – 3051.

Kasan, N.A., Said, S.M., Ghazali, N.A., Hashim, N.F.C., Ibrahim, Z., Amin, N.M., 2015. Application biofloc in Aquaculture: An Evaluation of Flocculating activity of selected bacteria from Biofloc. In: Liang, M.T. (Eds). Beneficial Microorganisms in Agriculture, aquaculture and other areas. Springer International Publishing, Switzerland, 165 – 182.

Luo, L., Zhao, Z., Huang, X., Du, X., Wang, C., Li, J., Wang, L., Xu, T., 2016. Isolation, Identification, and Optimization of Culture Conditions of a Biofloculant-Producing Bacterium *Bacillus megaterium* SP1 and Its Application in Aquaculture Wastewater Treatment. Biomed Research International. 4:1-9.

Slebecky, R.A., Hemphill H.E., 2006. The Genus *Bacillus* – Nonmedical. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrand, E. (Eds.). The Prokaryote: A handbook on the Biology of Bacteria: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer, New York, 530 – 563.