

KHẢO SÁT BƯỚC ĐẦU VI SINH VẬT PHÂN GIẢI TINH BỘT Ở MỘT SỐ AO NUÔI TÔM THUỘC ĐÀM SAM-CHUỒN, PHÚ VANG, THỪA THIÊN HUẾ

PHẠM THỊ NGỌC LAN, NGUYỄN HỮU HOÀNG

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

NGÔ THỊ TƯỜNG CHÂU

Trường Đại học Khoa học tự nhiên,

Đại học Quốc gia Hà Nội

Trong những năm gần đây, nghề nuôi tôm ở đầm phá Tam Giang-Cầu Hai phát triển mạnh mẽ, đặc biệt là các vùng ao nuôi thuộc đầm Sam-Chuồn, huyện Phú Vang, Thừa Thiên Huế. Tuy nhiên, sự phát triển thiếu kiểm soát dẫn đến tình trạng môi trường nước trong các ao nuôi này ngày càng ô nhiễm nặng do lượng thức ăn dư thừa quá nhiều, thời gian thay nước không hợp lý và tôm chết do dịch bệnh. Điều này không những tác động tiêu cực đến năng suất thu hoạch mà còn gây ra những ảnh hưởng xấu cho môi trường sinh thái. Do đó phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng sử dụng và chuyển hóa các hợp chất hữu cơ gây ô nhiễm trong nguồn nước có ý nghĩa rất lớn trong hướng nghiên cứu về môi trường và phát triển bền vững. Đây là cơ sở cho việc sản xuất các chế phẩm vi sinh bản địa làm sạch ao nuôi, góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng phân giải tinh bột được phân lập từ bùn ao nuôi tôm ở đầm Sam-Chuồn, huyện Phú Vang, Thừa Thiên Huế.

Các vi sinh vật kiểm định: *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio* sp.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác định hoạt tính enzyme amylase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch:

Nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường dịch thể để thu dịch lọc enzyme. Chuẩn bị môi trường thạch-tinh bột để tạo giếng enzyme. Sau khi ủ dịch enzyme ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 72 giờ, tiến hành nhuộm màu bằng thuốc thử Lugol để xác định vòng phân giải tinh bột.

- Xác định hoạt tính của amylase và sự tích lũy sinh khối của các chủng vi sinh vật:

Tiến hành nuôi cấy các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn đã được tuyển chọn trong môi trường dịch thể tương ứng (môi trường Vinogradski đối với chủng V94 và môi trường Gause I đối với chủng X65) với nguồn carbon được thay bằng tinh bột trong các điều kiện thời gian, pH môi trường, nhiệt độ và nồng độ muối NaCl khác nhau. Sau khi nuôi cấy, ly tâm tách riêng phần dịch lọc và sinh khối. Xác định hoạt tính amylase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch và xác định sinh khối theo phương pháp cân.

- Nghiên cứu đặc tính sinh lý, sinh hóa của các chủng vi sinh vật:

Đánh giá khả năng phân giải protein, cellulose và lipid theo phương pháp khuếch tán trên thạch. Khảo sát với protein, thay nguồn nitrogen bằng casein, với cellulose và lipid, thay nguồn carbon tương ứng bằng CMC (Carboxyl Methyl Cellulose) và dầu thực vật.

Đánh giá khả năng kháng khuẩn: Môi trường kiểm định sau khi khử trùng, để nguội đến khoảng 45°C, cho vi sinh vật kiểm định vào rồi phân đều vào các đĩa petri. Khi thạch nguội, tạo giềng, nhỏ dịch lọc kiểm tra vào, đặt lạnh 4°C từ 3-5 giờ, rồi nuôi ở 30°C sau 12-24 giờ, xác định hiệu số vòng vô khuẩn.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả tuyển chọn các chủng có khả năng phân giải tinh bột

Với 206 chủng vi khuẩn và 96 chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải tinh bột phân lập được từ những mẫu bùn trong các ao nuôi tôm ở đầm Sam-Chuồn, chúng tôi tiến hành tuyển chọn bằng phương pháp khuếch tán trên thạch, kết quả thu được chủng vi khuẩn V94 và chủng xạ khuẩn X65 có hoạt tính amylase mạnh nhất. Hai chủng này được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính amylase và sự tích lũy sinh khối của chủng V94 và X65

2.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường dịch thể tương ứng với các khoảng thời gian khác nhau, sau đó xác định hoạt tính amylase và sinh khối khô. Kết quả thu được cho thấy thời gian nuôi cấy tối ưu của chủng V94 là 72 giờ và chủng X65 là 108 giờ. Tốc độ sinh trưởng và sinh khối cực đại của chủng V94 cao hơn hẳn so với chủng X65, tuy nhiên chủng X65 lại cho hoạt tính amylase mạnh hơn.

Bảng 1

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính amylase và sự tích lũy sinh khối

Thời gian (giờ)	Chủng V94		Chủng X65	
	D-d (mm)	SKK (mg/ml)	D-d (mm)	SKK (mg/ml)
24	26,00±0,33	9,63±0,22	15,00±0,33	3,23±0,12
36	28,50±0,00	12,67±0,30	17,50±0,00	4,49±0,21
48	30,00±0,33	16,28±0,12	19,00±0,33	5,22±0,11
60	33,00±0,67	18,37±0,24	21,00±0,33	5,50±0,10
72	34,00±0,00	20,68±0,50	22,00±0,00	6,43±0,13
84	25,00±0,33	19,14±0,21	24,00±0,00	7,81±0,16
96	23,50±0,67	16,95±0,20	29,00±0,67	8,17±0,12
108	19,50±0,33	15,05±0,12	35,00±0,33	8,79±0,12
120	16,50±0,67	14,34±0,14	30,50±0,67	8,41±0,17

Ghi chú: D-d: Đường kính vòng phân giải; SKK: Sinh khối khô.

2.2. Ảnh hưởng của pH môi trường

Chủng V94 và X65 được nuôi cấy trong môi trường dịch thể tương ứng với các mức pH khác nhau. Hoạt tính amylase và sinh khối khô được trình bày ở bảng 2 cho thấy, pH tối ưu cho sự sinh trưởng và phân giải tinh bột của chủng V94 là pH 7,5 và chủng X65 là pH 7,0. Cả 2 chủng này đều thích hợp với khoảng pH từ trung tính đến kiềm, chủng V94 ưa kiềm hơn so với chủng X65. Mặt khác, trong khoảng pH khảo sát, cả 2 chủng đều sinh trưởng tốt, phổ thích nghi rộng cho phép chúng thể hiện khả năng phân giải tinh bột ở các ao nuôi với các điều kiện pH khác nhau.

Bảng 2

Ảnh hưởng của pH môi trường đến hoạt tính amylase và sự tích lũy sinh khối

pH	Chủng V94		Chủng X65	
	D-d (mm)	SKK (mg/ml)	D-d (mm)	SKK (mg/ml)
6,0	19,50±0,67	6,28±0,12	19,50±0,67	4,22±0,13
6,5	24,00±0,67	13,01±0,25	24,00±0,67	6,84±0,13
7,0	32,00±0,33	19,69±0,18	36,00±0,67	8,94±0,15
7,5	36,50±0,00	21,09±0,17	29,50±0,00	8,41±0,11
8,0	34,50±0,33	20,45±0,16	20,00±0,33	7,38±0,16
8,5	28,00±0,00	17,04±0,13	17,50±0,67	6,23±0,18
9,0	21,50±0,67	10,45±0,18	14,50±0,33	4,34±0,21

Ghi chú: D-d: Đường kính vòng phân giải; SKK: Sinh khối khô.

2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Tiến hành nuôi cấy tinh chủng V94 và X65 trong môi trường dịch thể tương ứng với các mức nhiệt độ từ 20°C đến 40°C, sau đó xác định hoạt tính amylase và sinh khối khô. Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn V94 tích lũy sinh khối mạnh nhất ở nhiệt độ nuôi cấy 35°C và chủng X65 là 30°C, cả 2 chủng này đều thể hiện khả năng sinh trưởng và hoạt tính enzyme amylase mạnh trong khoảng nhiệt độ 30-35°C.

Bảng 3

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt tính amylase và sự tích lũy sinh khối

Nhiệt độ (°C)	Chủng V94		Chủng X65	
	D-d (mm)	SKK (mg/ml)	D-d (mm)	SKK (mg/ml)
20	15,50±0,33	4,43±0,10	14,00±0,67	1,54±0,11
25	18,00±0,00	5,27±0,17	17,00±0,00	2,62±0,11
30	25,00±0,00	7,54±0,13	24,00±0,00	4,39±0,16
35	23,50±0,67	8,27±0,12	26,00±0,67	3,83±0,10
40	16,50±0,33	4,64±0,21	19,50±0,33	2,78±0,15

Ghi chú: D-d: Đường kính vòng phân giải; SKK: Sinh khối khô.

2.4. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl

Vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường dịch thể tương ứng với các nồng độ NaCl khác nhau, sau đó xác định hoạt tính amylase và sinh khối khô. Kết quả cho thấy, 2 chủng V94 và X65 thích nghi với khoảng nồng độ muối NaCl khá rộng, khoảng 0,5-15%. Ở nồng độ muối cao 20-30%, cả hai chủng vẫn có khả năng sinh trưởng, phát triển và thể hiện hoạt tính amylase khá mạnh. Đây là ưu điểm nổi trội của chủng giống để chúng thể hiện khả năng phân giải tinh bột khi sử dụng làm chế phẩm xử lý ao nuôi.

Bảng 4

Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến hoạt tính amylase và sự tích lũy sinh khối

Nồng độ NaCl (%)	Chủng V94		Chủng X65	
	D-d (mm)	SKK (mg/ml)	D-d (mm)	SKK (mg/ml)
0,5	35,00±0,33	21,09±0,12	33,50±0,33	8,89±0,14
5	36,00±0,00	21,45±0,11	34,50±0,33	9,61±0,18
10	37,00±0,33	20,24±0,10	35,00±0,00	10,24±0,12
15	34,50±0,67	15,44±0,35	36,00±0,33	8,39±0,14
20	28,50±0,00	11,13±0,28	25,00±0,67	6,85±0,13
25	25,00±0,33	7,55±0,28	21,00±0,00	5,72±0,13
30	20,50±0,33	2,37±0,23	18,50±0,33	4,87±0,16

Ghi chú: D-d: Đường kính vòng phân giải; SKK: Sinh khối khô.



Hình 1. Vòng phân giải tinh bột của dịch enzyme amylase

3. Đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng vi sinh vật V94 và X65

3.1. Khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ

Tiến hành nuôi cấy để thăm dò khả năng phân giải protein, cellulose và lipid của chủng V94 và X65 bằng phương pháp khuếch tán trên thạch đĩa. Kết quả được thể hiện qua Bảng 5 và hình 2.

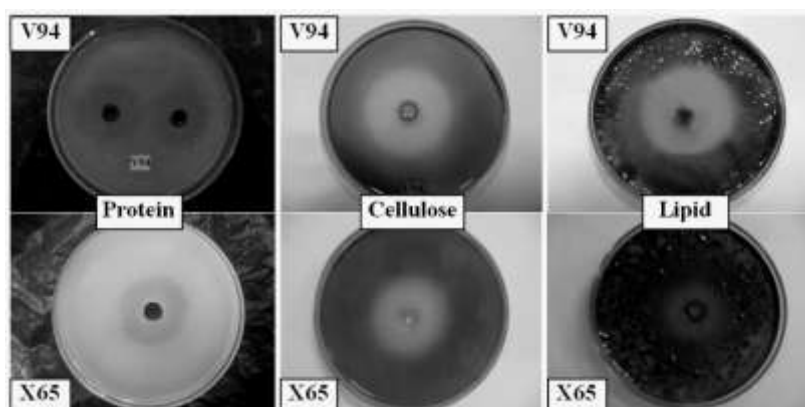
Bảng 5

Khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ của chủng V94 và X65

Cơ chất	Chủng V94		Chủng X65	
	KTVPG (mm)	ĐKVPG (mm)	KTVPG (mm)	ĐKVPG (mm)
Protein	27,00±0,33	23,50±0,00	30,00±0,00	22,50±0,33
Cellulose	28,00±0,00	35,00±0,33	24,00±0,67	28,00±0,67
Lipid	39,00±0,67	35,00±0,33	22,00±0,33	23,50±0,33

Ghi chú: KTVPG: Kích thước vạch phân giải; ĐKVPG: Đường kính vòng phân giải.

Kết quả cho thấy, 2 chủng V94 và X65 ngoài khả năng phân giải tinh bột mạnh, chúng còn có khả năng phân giải mạnh các nguồn cơ chất protein, cellulose và lipid. Khả năng phân giải mạnh với nhiều chất hữu cơ khác nhau của 2 chủng này là một lợi thế rất lớn trong việc tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm ao nuôi tôm.



Hình 2. Vòng phân giải protein, cellulose và lipid của dịch enzyme

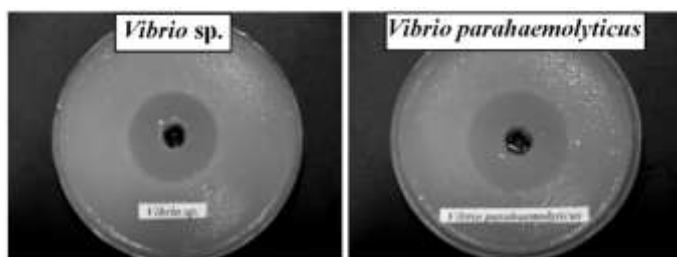
3.2. Khả năng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của chủng V94 và X65 đối với 5 loại vi sinh vật kiểm định gồm *B. pumilus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Vibrio* sp. và *V. parahaemolyticus* được thể hiện qua Bảng 6 và hình 3. Các thí nghiệm thăm dò bước đầu cho thấy, chủng vi khuẩn V94 không có khả năng kháng với các chủng vi sinh vật kiểm định, trong khi đó chủng xạ khuẩn X65 lại có khả năng kháng với cả 5 loại vi sinh vật kiểm định, đặc biệt là kháng mạnh với 2 đối tượng gây bệnh cho tôm là *Vibrio* sp. và *V. parahaemolyticus*.

Bảng 6

Khả năng kháng khuẩn của chủng V94 và X65 đối với các vi sinh vật kiểm định

Vi sinh vật kiểm định	Hiệu số vòng vô khuẩn (mm)	
	Chủng V94	Chủng X65
<i>B. pumilus</i> (G ⁺)	0,00	22,00±0,33
<i>S. aureus</i> (G ⁺)	0,00	23,00±0,00
<i>E. coli</i> (G ⁻)	0,00	27,00±0,67
<i>Vibrio</i> sp. (G ⁻)	0,00	24,50±0,33
<i>V. parahaemolyticus</i> (G ⁻)	0,00	29,50±0,33



Hình 3. Vòng vô khuẩn của dịch nuôi cấy chủng X65

III. KẾT LUẬN

Hai chủng vi khuẩn V94 và xạ khuẩn X65 có khả năng phân giải tinh bột mạnh được phân lập từ bùn ao nuôi tôm ở đầm Sam-Chuồn, Phú Vang, Thừa Thiên Huế.

Thời gian nuôi cấy tối ưu đối với chủng V94 là 72 giờ và chủng X65 là 108 giờ. Hai chủng này sinh trưởng tốt trong khoảng pH từ trung tính đến kiềm yếu, nhiệt độ 30-35°C, nồng độ NaCl tối thích 0,5-15‰.

Hai chủng V94 và X65 còn có khả năng phân giải mạnh protein, cellulose và lipid. Chủng X65 có khả năng kháng với 5 loại vi sinh vật kiềm định, đặc biệt kháng mạnh với 2 chủng *Vibrio* gây bệnh cho tôm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Thị Tường Châu, Nguyễn Ngọc Thanh, 2007. Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 333-338.
2. Nguyen Van Hop, Hoang Thai Long, Nguyen Hai Phong, Thuy Chau To, 2005. Proceedings of National Conference on Thua Thien Hue lagoon, p. 231-245.
3. Phạm Thị Ngọc Lan, 2012. Thực tập vi sinh vật học. NXB. Đại học Huế.
4. Phạm Thị Ngọc Lan, Huỳnh Ngọc Thành, 2012. *Tap chí Khoa học*, ĐH Huế, 63 (4): 157-165.
5. Phạm Thị Ngọc Lan, Nguyễn Công Minh, 2005. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. NXB. KHKT, Hà Nội, tr. 1117-1120.

PRELIMINARY INVESTIGATION ON STARCH DEGRADING MICROORGANISMS IN SHRIMP PONDS AT SAM-CHUON LAGOON, PHU VANG, THUA THIEN HUE

PHAM THI NGOC LAN, NGUYEN HUU HOANG, NGO THI TUONG CHAU

SUMMARY

The environmental water quality at many shrimp ponds in Tam Giang-Cau Hai lagoon system is declined due to strong pollution with unfavorable culturing conditions. Thus, the assessment and selection of indigenous microorganisms with high degradation capacity of organic wasters as well as constraining shrimp diseases has paid practical and scientific significance.

The preliminary investigation at shrimp ponds were isolated and identified two indigenous strains of microorganisms, e.g. bacterial strain, V94 and actinomycetes strain, X65 with high potential for the study purposes.

The experiments were identified the optimal growth times for V94 and X65 were 72 and 108 hrs, respectively; the optimal pH, temperature and concentration of NaCl for their growth were neutral to low pH, 30-35°C and 0.5-15‰, respectively. Both these strains were also assessed with high capacity for degradation of protein, cellulose and lipid. Moreover, X65 strain has been shown the ability to inhibit two shrimp's pathogens, *Vibrio* sp. and *Vibrio parahaemolyticus*.