

Khả năng kiểm soát sinh học *Vibrio parahaemolyticus* NT₇ phân lập từ tôm thẻ bệnh hoại tử gan tụy (AHPND) của chủng *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ phân lập từ giun quế

Biocontrol activity of *Vibrio parahaemolyticus* NT₇ isolated from the shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) by *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ isolated from perionyx excavatus

Nguyễn Văn Minh^{1*}, Lê Anh Tuấn¹, Phan Quang Lợi¹, Dương Nhật Linh¹, Trần Kiến Đức², Võ Ngọc Yến Nhi², Trần Thị Á Ni³, Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh⁴

¹Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Công ty TNHH MIDOLI, Việt Nam

⁴Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: minh.nv@ou.edu.vn

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.14.1.435.2019

Ngày nhận: 13/08/2019

Ngày nhận lại: 09/09/2019

Duyệt đăng: 17/09/2019

Từ khóa:

Bacillus polyfermenticus F₂₇,
bệnh hoại tử gan tụy,
kiểm soát sinh học, tôm
thẻ chân trắng,
Vibrio parahaemolyticus NT₇

Bệnh hoại tử gan tụy ở tôm được phát hiện đầu tiên ở Trung Quốc năm 2009 và gây hại cho nghề nuôi tôm ở nhiều nước kể cả Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sàng lọc khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy của một số chủng *Bacillus*. Chủng *V. parahaemolyticus* NT₇ sử dụng trong nghiên cứu này được phân lập từ mẫu tôm thẻ chân trắng bệnh hoại tử gan tụy tại Ninh Thuận và đã được định danh bằng phương pháp sinh hóa. Bằng phương pháp vạch vuông góc và giếng khuếch tán, chúng tôi sàng lọc được chủng *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ đối kháng *V. parahaemolyticus* NT₇ với đường kính lớn nhất là 18,50mm. *B. polyfermenticus* F₂₇ có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* NT₇ khi tiến hành đồng nuôi cấy, không gây tiêu huyết và an toàn đối với tôm thẻ giống với tỷ lệ sống 100% của nghiệm thức thử nghiệm. Kết quả khảo sát LD₅₀ khi gây nhiễm *V. parahaemolyticus* NT₇ lên tôm thẻ giống là 1,12. 10⁵CFU/ml. Tiến hành thử nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ vật chủ của chủng *B. polyfermenticus* F₂₇, chúng tôi nhận thấy chủng có khả năng bảo vệ tôm thẻ giống từ chủng *V. parahaemolyticus* NT₇ gây bệnh. Những kết quả trên cho thấy rằng chủng *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ có tiềm năng để sản xuất chế phẩm sinh học kiểm soát và phòng bệnh EMS/AHPNS trên tôm.

ABSTRACT

Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome - *AHPNS* of cultured shrimp was first detected in China in 2009 and caused huge damage to shrimp farming in many countries including Vietnam. This study investigates the ability to inhibit *Vibrio parahaemolyticus* which causes hepatopancreatic necrosis of some *Bacillus* strains. *V. parahaemolyticus* NT₇ of this research was isolated from a white leg shrimp sample with hepatopancreatic necrosis in Ninh Thuan province and identified by biochemical methods. By the cross-streak and well-diffusion methods, the selected strain *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ shows the largest diameter of 18.50mm resistance to *V. parahaemolyticus* NT₇. *B. polyfermenticus* F₂₇ strain can inhibit *V. parahaemolyticus* NT₇. Besides, *B. polyfermenticus* F₂₇ inhibits *V. parahaemolyticus* NT₇ with co-cultured experiment and does not cause hemolysis. It is also safe for white leg shrimp seed with a 100% survival rate of the experimental treatments. The result of LD₅₀ examination when infecting *V. parahaemolyticus* NT₇ to white leg shrimp seed is 10⁵CFU/ml. Through the host protection capability assessment of *B. polyfermenticus* F₂₇, we found that it can protect white leg shrimp seed from *V. parahaemolyticus*. The findings show that strains of *B. polyfermenticus* F₂₇ have the potential to produce probiotics for *control* and *prevention* of EMS/AHPNS of shrimps.

Keywords:

AHPNS, *Bacillus polyfermenticus* F₂₇, Biocontrol, *Vibrio parahaemolyticus* NT₇, white leg shrimp

1. Mở đầu

Việt Nam có tiềm năng lớn về nuôi trồng thủy sản, trong đó nghề nuôi tôm chiếm vị trí quan trọng. Theo Tổng cục Thống kê, ước tính giá trị sản xuất thủy sản năm 2014 đạt gần 188 nghìn tỷ đồng. Trong đó, giá trị nuôi trồng thủy sản ước đạt hơn 115 nghìn tỷ đồng (Tổng cục Thủy sản, 2014b).

Tuy nhiên, hiện nay tình trạng dịch bệnh ở tôm đang hoành hành trên nhiều vùng nuôi tôm ở nước ta. Đặc biệt là hội chứng tôm chết sớm Early Mortality Syndrome (EMS) hay còn gọi là hội chứng hoại tử gan tụy Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) (Flegel, 2012).

Ở Việt Nam, căn bệnh này đã được quan sát thấy từ năm 2010 nhưng sự tàn phá trên diện rộng do EMS chỉ được báo cáo kể từ tháng 3 năm 2011 ở đồng bằng sông Cửu Long. Nó ảnh hưởng đến khu vực sản xuất tôm chính của tỉnh Tiền Giang, Bến Tre, Kiên Giang, Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau với tổng diện tích ao nuôi tôm khoảng 98.000 ha (Mooney, 2012). Theo báo cáo của Cục Thú y, trong 11 tháng đầu năm 2014 ở nước ta dịch bệnh hoại tử gan tụy đã xảy ra tại 22 tỉnh/ thành phố với diện tích nuôi tôm bị bệnh là 5591 ha gây thiệt hại hàng nghìn tỷ đồng cho người dân và ngân sách Nhà nước (Tổng cục Thủy sản, 2014a).

Bệnh này cũng đã gây ra nhiều gây ra những thiệt hại nghiêm trọng cho các nước nuôi tôm trên thế giới, như ở Trung Quốc năm 2009 (NACA-FAO, 2011), Malaysia năm 2011 (Lightner, Redman, Pantoja, Noble, & Tran, 2012; Mooney, 2012); Thái Lan năm 2012 (L. Tran et al., 2013) và lây lan sang Tây bán cầu là Mexico năm 2013 (Schryver, Defoirdt, & Sorgeloos, 2014).

Vào đầu năm 2013, nhóm nghiên cứu của Lightner (phòng nghiên cứu Bệnh học thủy sản Đại học Arizona) đã phân lập và xác định tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy (AHPND - Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease) trong môi trường nhân tạo là do dòng đặc biệt của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có độc lực cao thông qua kiểm tra mô học, sử dụng bộ kit API Rapid NE và giải trình tự 16S rRNA gene. (L. Tran et al., 2013). *V. parahaemolyticus* xâm chiếm đường tiêu hóa của tôm và sinh ra độc tố gây phá hủy mô, làm rối loạn chức năng của gan tụy, cơ quan tiêu hóa của tôm (FAO, 2013; Lightner et al., 2012). Năm 2014, Kondo và cộng sự khi phân tích trình tự bộ gen của các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy ở Thái Lan cũng phát hiện gen độc tố PirA và PirB đồng thời lại không phát hiện trong chủng *V. parahaemolyticus* không gây bệnh. Điều này chứng tỏ gen độc tố PirA và PirB là tác nhân gây bệnh AHPND. (Kondo et al., 2014)

Và nó được biết đến với tốc độ lây lan và gây tử vong cao ở các trang trại nuôi tôm (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015). Chính vì vậy khi có dấu hiệu bệnh hoại tử gan tụy ở tôm thì hầu hết các hộ nuôi tôm thường sử dụng sản phẩm hóa học và thuốc kháng sinh nhằm giảm thiểu thiệt hại về bệnh. Theo báo cáo của Han, Mohny, Tang, và Pantoja (2015) đã xác định 7 chủng *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ mẫu tôm bệnh hoại tử gan tụy ở Việt Nam kháng kháng sinh và đó là bằng chứng cho thấy loài vi khuẩn này có khả năng đề kháng kháng sinh rất nhanh, nguy cơ dẫn đến thất bại trong việc điều trị bệnh hoại tử gan tụy là rất cao. Bên cạnh đó, việc điều trị bằng kháng sinh và hóa chất quá nhiều trong ao nuôi tôm sẽ tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh lẫn các vi khuẩn có lợi (Gatesoupe, 1999). Vì vậy, việc sử dụng chế phẩm sinh học giúp các sản phẩm thủy sản được an toàn không gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người đang được quan tâm (Moriarty, 1997; Verschuere, Rombaut, & Verstraete, 2000).

Vi khuẩn thường được ứng dụng làm chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản phần lớn thuộc chi *Bacillus*. Do khả năng tạo ra được các enzym ngoại bào hỗ trợ tiêu hóa, sinh kháng sinh hay những chất ức chế có những đặc tính đối kháng với các chủng vi sinh vật gây bệnh mà được ghi nhận nhiều nhất là khả năng đối kháng với *Vibrio* spp. (Domorongpokkaphan & Wanchaitanawong, 2006; Ravi, Musthafa, Jegathammbal, Kathiresan, & Pandian, 2007). Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy khả năng kiểm soát sinh học của các chủng *Bacillus* đối với *Vibrio* như Purivirojkul và Areechon (2007), Balcazar và Rojas-Luna (2007), Nguyen và cộng sự, (2011). Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus* phân lập từ mẫu tôm bệnh hoại tử gan tụy của một số chủng *Bacillus*, đồng thời thử nghiệm hiệu quả bảo vệ vật chủ của chúng trên quy mô thực nghiệm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

25 chủng *Bacillus* (F₀, F₂, F₅, F₆, F₁₁, F₁₂, F₁₃, F₁₄, F₂₁, F₂₆, F₂₇, F₃₃, F₃₄, F₃₅, F₃₆, Q₁₆, Q₁₁₁, Q₂₇₀, BP₇₆, BD₆₈, BD₃₃, T₁, T₃, T₄, X₁₂₂) được cung cấp từ phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh - Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh. Trong đó chủng *Bacillus* sp. F₂₇ phân lập từ giun quế, *Bacillus* sp. Q₁₆ và Q₁₁₁ phân lập từ ao nuôi cá tra đã được định danh bằng kỹ thuật sinh hóa kết hợp với giải trình 16S rDNA cho kết quả tương ứng là *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ (Nguyen et al., 2010), *Bacillus subtilis* Q₁₆ và *Bacillus subtilis* Q₁₁₁ (Nguyen et al., 2013)

Tôm thẻ chân trắng giống khỏe mạnh và không mang các mầm bệnh được cung cấp từ trại tôm giống Hoàng Thanh Lịch, Vũng Tàu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập Vibrio parahaemolyticus từ mẫu tôm bệnh hoại tử gan tụy

Bốn mẫu tôm thẻ có biểu hiện bệnh hoại tử gan tụy còn sống được thu tại thôn Từ Thiện, xã Phước Vinh, tỉnh Ninh Thuận. Có định mẫu trong nước ở 4°C và vận chuyển về PTN Công nghệ vi sinh để tiến hành phân lập. Mẫu được khử trùng bề mặt bằng cồn 70°, tách bỏ phần giáp đầu ngực. Gan tụy tôm được tăng sinh trong dung dịch peptone kiềm, ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, mẫu đã tăng sinh được cấy ria lên đĩa thạch môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar (TCBS), ủ 24 giờ ở 37°C. Chọn khuẩn lạc điển hình tiến hành nhuộm Gram và định danh sơ bộ bằng các thử nghiệm sinh hóa theo khóa phân loại Bergey (Bergey & Holt, 1994; MacFaddin, 2000).

Thử đối kháng với V. parahaemolyticus

Phương pháp vạch vuông góc: vi khuẩn gây bệnh được cấy thẳng vạch lên đĩa môi trường Nutrient agar (NA). Vi khuẩn thử nghiệm được cấy thẳng vạch vuông góc với vạch đầu tiên, ủ ở 30°C, quan sát sau 24 giờ (Purivirojkul & Areechon, 2007).

Phương pháp giếng khuếch tán: trải dịch *V. parahaemolyticus* gây bệnh (mật độ 10⁶CFU/ml) lên đĩa môi trường NA bổ sung 1,5% NaCl. Dịch nuôi cấy các chủng khuẩn thử nghiệm sau 24 giờ trong môi trường NB được li tâm ở 6000rpm trong 15 phút. 70µl dịch nổi sau ly tâm được bổ sung vào giếng có đường kính 6mm trên đĩa thạch đã trải vi khuẩn gây bệnh. Đo đường kính vòng kháng khuẩn tạo thành sau 24 giờ ủ ở 30°C. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. (Chythanya, Karunasagar, & Karunasagar, 2002).

Thử nghiệm đồng nuôi cấy: chủng vi khuẩn thử nghiệm được tăng sinh trên NA, vi khuẩn gây bệnh được tăng sinh trên pepton kiềm ở 30°C/24 giờ. Tạo huyền dịch vi khuẩn trong môi trường LB sao cho mật độ vi khuẩn gây bệnh đạt 103CFU/ml và vi khuẩn thử nghiệm đạt hoặc 105 hoặc 106 hoặc 107CFU/ml. Đối chứng chỉ bổ sung vi khuẩn gây bệnh. Đồng nuôi cấy huyền dịch trên ở 30°C trong 5 ngày. Kiểm tra mật độ sau mỗi 24 giờ bằng phương pháp trải đĩa trên môi trường TCBS. Thử nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại. (Vaseeharan, Lin, & Ramsamy, 2003).

Đánh giá tính an toàn của chủng Bacillus thử nghiệm

Thử nghiệm khả năng gây dung huyết

Vi khuẩn thử nghiệm được cấy lên môi trường thạch máu Blood Agar (bổ sung 5% máu cừu). Tiến hành với vi khuẩn đối chứng không tiêu huyết. Đọc kết quả sau khi ủ ở 30°C trong 24 giờ (Smibert & Krieg, 1981).

Thử nghiệm đánh giá tính an toàn của Bacillus thử nghiệm trên tôm thẻ

Thí nghiệm được bố trí với các nghiệm thức bổ sung hoặc không bổ sung chủng *Bacillus* thử nghiệm (mật độ 10⁶CFU/ml). Mật độ vi khuẩn *Bacillus* thử nghiệm được xác định thông qua đường tương quan giữa giá trị OD610 và mật độ tế bào vi khuẩn *Bacillus* thử nghiệm (T. L. Tran, 2010). Các nghiệm thức được bố trí 5l/thùng, với 10 con tôm khoảng 1g, sạch bệnh và được lặp lại 3 lần. Theo dõi tỷ lệ sống chết của tôm trong 7 - 14 ngày (Vaseeharan et al., 2003).

Thử nghiệm khảo sát khả năng gây chết trung bình - LD₅₀ của V. parahaemolyticus lên tôm thẻ

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được tăng sinh trong môi trường canh peptone kiềm (bổ sung 3% NaCl), ủ 24 giờ ở 37°C. Các nghiệm thức được bố trí 2,5l/thùng, với 10 con tôm khoảng 1g, sạch bệnh và được lặp lại 3 lần. Tôm được ngâm với *V. parahaemolyticus* ở các mật độ: 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶CFU/ml, đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thử nghiệm được xác định thông qua đường tương quan giữa giá trị OD610 và mật độ tế bào vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thử nghiệm (T. L. Tran, 2010). Tôm nhin đối trong 12 giờ sau khi cảm nhiễm. Ghi nhận số tôm chết hằng ngày cho đến khi tôm ngưng chết liên tục trong 3 ngày hoặc chết hoàn toàn.

Lethal Dose 50 (LD₅₀) được tính dựa vào công thức của Reed và Muech (1938):

$$LD_{50} = 10^{(\text{lũy thừa của nồng độ gây chết nhỏ nhất nhưng trên 50\% - PD})} \quad (1)$$

Trong đó, Proportionate Distance (PD) = [(tỉ lệ tôm chết thấp nhất nhưng trên 50% - 50%). (tỉ lệ tôm chết thấp nhất nhưng trên 50% - tỉ lệ tôm chết cao nhất nhưng dưới 50%)⁻¹] (2)

Tôm chết được kiểm tra dấu hiệu bệnh lý và phân lập, định danh vi khuẩn trong gan tụy của tôm bằng các thử nghiệm sinh hóa theo khóa phân loại Bergey's (Bergey & Holt, 1994; MacFaddin, 2000).

Thử nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ tôm trong điều kiện cảm nhiễm V. parahaemolyticus của chủng Bacillus thử nghiệm

Chủng *Bacillus* thử nghiệm được tăng sinh trên môi trường NB ở 30°C/24 giờ. Mật độ thử nghiệm 10⁶CFU/ml. *V. parahaemolyticus* được tăng sinh trong môi trường canh peptone kiềm (bổ sung 3% NaCl), ủ 24 giờ ở 37°C, mật độ thử nghiệm dựa vào kết quả khảo sát LD₅₀, mật độ sử dụng là 2.LD₅₀ (Vaseeharan et al., 2003). Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức với 3 lần lặp lại.

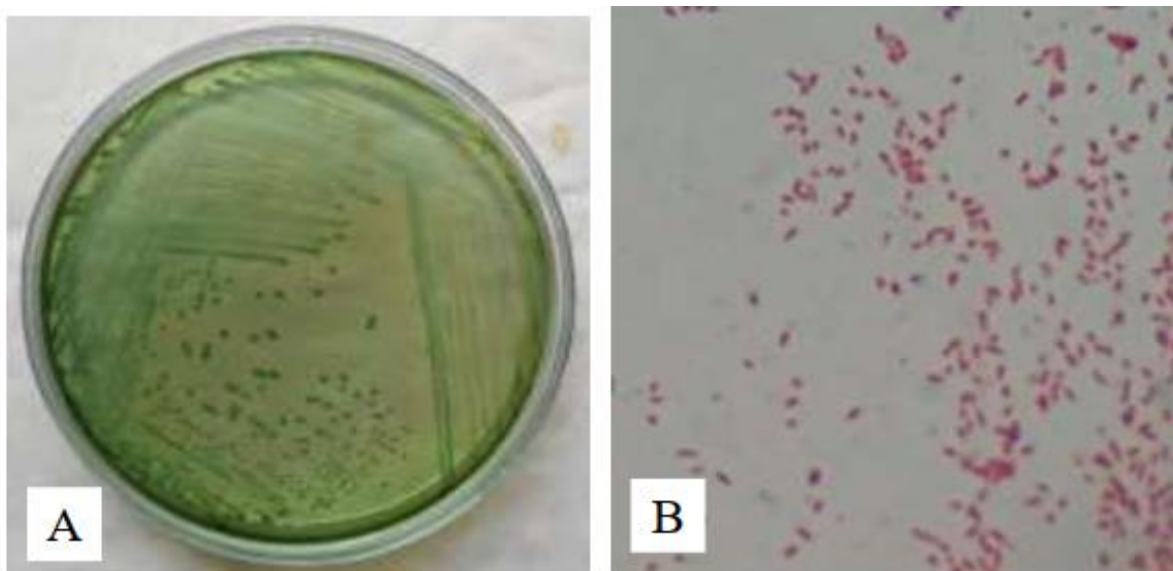
- NT1: gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* 2 x LD₅₀;
- NT2: không gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* và không dùng chế phẩm vi sinh;
- NT3: gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* 2 x LD₅₀ và bổ sung vi khuẩn thử nghiệm mật độ 10⁶CFU/ml;
- NT4: gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* 2 x LD₅₀ và bổ sung vi khuẩn thử nghiệm mật độ 10⁷CFU/ml.

Khả năng bảo vệ vật chủ gây nhiễm với *V. parahaemolyticus* của vi khuẩn thử nghiệm được đánh giá theo ba mức độ: $RPS > 50\%$: cao, $30\% < RPS \leq 50\%$: trung bình, $RPS \leq 30\%$: không có khả năng bảo vệ. Trong đó, thông số tỉ lệ sống tương đối RPS (Relative Percentage of Survival) = $(1 - \text{số ấu trùng tôm chết ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn khảo sát} / \text{số ấu trùng tôm chết ở nghiệm thức đối chứng} \times 100\%)$ (Amend, 1981). Đồng thời, kiểm tra mật độ *V. parahaemolyticus* trong dịch thử nghiệm.

3. Kết quả

Phân lập *Vibrio parahaemolyticus*

Dựa vào kết quả quan sát đại thể và vi thể các chủng phân lập được, chúng tôi tiến hành định danh theo khoá phân loại Bergey (Bergey & Holt, 1994). Kết quả cho thấy chủng NT₇ tương đồng với *V. parahaemolyticus* (Hình 1). Chủng *V. parahaemolyticus* NT₇ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



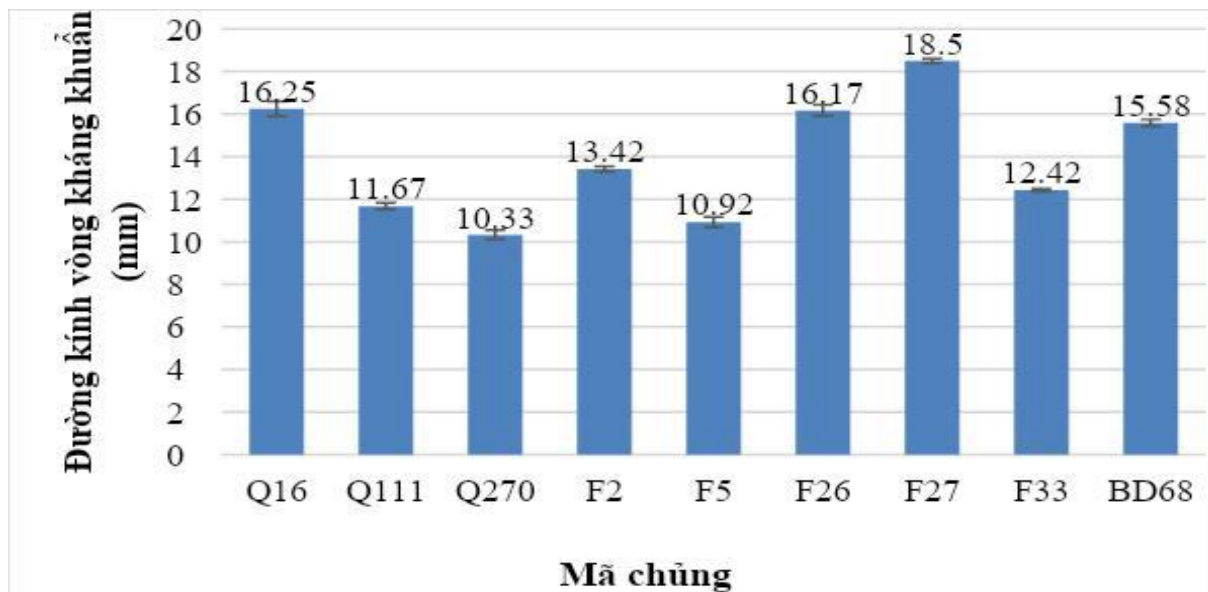
Hình 1. Khảo sát đại thể trên môi trường TCBS (A) và vi thể (B) chủng *V. parahaemolyticus* NT₇

Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* NT₇ của các chủng *Bacillus* thử nghiệm

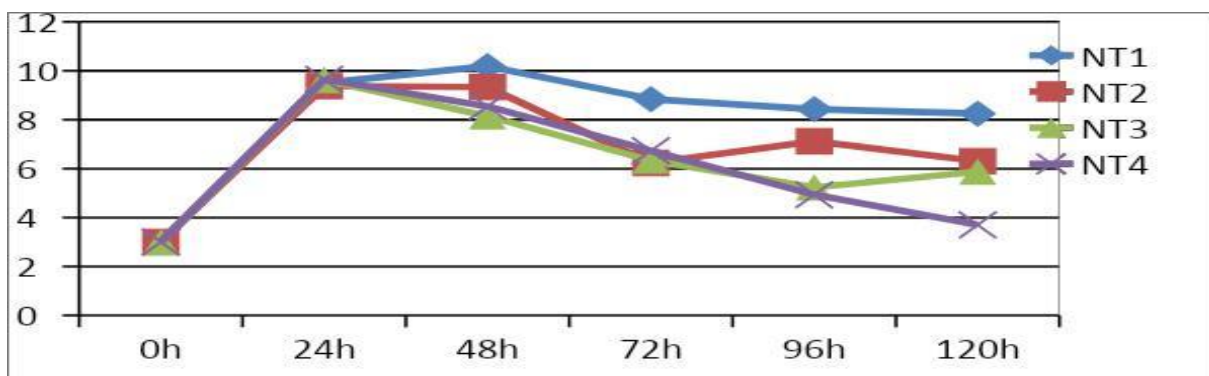
Bằng phương pháp cấy vạch vuông góc, nhận thấy có 9/25 chủng *Bacillus* (Q₁₆, F₂, F₂₇, F₅, F₂₆, F₃₃, BD₆₈, Q₂₇₀, Q₁₁₁) kháng với *V. parahaemolyticus* NT₇ ở 24 giờ.

Bằng phương pháp giếng khuếch tán, đường kính vòng kháng khuẩn của các chủng thử nghiệm có giá trị từ 10,33 - 18,50mm (Hình 2). Trong đó, chủng *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ có đường kính lớn nhất và có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại (18,50mm) (Hình 3), tiếp theo là chủng *B. subtilis* Q₁₆ (16,25mm). Chủng có đường kính vòng kháng nhỏ nhất là *Bacillus* sp. Q₂₇₀ (10,33mm). Chúng tôi lựa chọn chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Bằng phương pháp đồng nuôi cấy, ở nghiệm thức 4 (NT4) mật độ *Vibrio* thấp hơn so với đối chứng (NT1) chứng tỏ rằng chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ có thể ức chế lại *V. parahaemolyticus* NT₇ khi ở cùng trong một điều kiện nuôi cấy (Hình 4). Trong thử nghiệm này ta thấy rằng *Vibrio* bị ức chế mạnh nhất ở mật độ là 10⁷CFU/ml.



Hình 2. Khả năng kháng khuẩn của các chủng *Bacillus* thử nghiệm



Hình 3. Đường kính vòng kháng khuẩn của một số chủng thử nghiệm

Tính an toàn của *B. polyfermenticus* F₂₇

Thử nghiệm khả năng gây dung huyết

Chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ không có khả năng dung huyết, an toàn đối với tôm (kết quả không trình bày).

Thử nghiệm đánh giá tính an toàn của *Bacillus* thử nghiệm trên tôm thẻ

Tính an toàn của chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ lên tôm trưởng thành được thể hiện qua tỷ lệ sống không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) được ghi nhận ở Bảng 1.

Bảng 1Kết quả thử nghiệm tính an toàn của chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ trên tôm

Nghiệm thức	Liều thử nghiệm (CFU/ mL)	Tổng con sống (con)	Tỷ lệ Sống (%)
Đối chứng (ĐC)	0	27,83	46,39 ± 5,88 ns
<i>B. polyfermenticus</i> F ₂₇	10 ⁶	21,67	36,11 ± 6,77

Ghi chú: ns: không có sự khác biệt ở mức P = 0,05

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Khả năng gây chết trung bình - LD₅₀ của *V. parahaemolyticus* NT₇ lên tôm thẻ

Chúng tôi khảo sát khả năng gây chết trung bình của *V. parahaemolyticus* NT₇ lên tôm thẻ 1g (Bảng 2).

Bảng 2Kết quả khả năng gây chết LD₅₀

Nghiệm thức	Liều gây độc (CFU.ml ⁻¹)	Tổng chết (con)	Tổng sống (con)	Tổng chết dồn (con)	Tổng sống dồn (con)	Tỷ lệ chết dồn (%)
NT1	0	2	28	2	110	1.79
NT2	1.10 ³	3	27	5	82	5.75
NT3	1.10 ⁴	7	23	12	55	17.91
NT4	1.10 ⁵	8	22	20	22	47.62
NT5	1.10 ⁶	30	0	50	0	100.0
PD		0,95				
LD₅₀		1,12.10⁵				

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Kết quả Bảng 2 cho thấy nghiệm thức NT1 (đối chứng âm) không thấy biểu hiện tôm chết. Điều này chứng tỏ rằng tôm chết là do độc lực từ vi khuẩn gây ra. Dựa vào công thức tính LD₅₀, nhận thấy rằng tỷ lệ chết 50% của tôm sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* NT₇ là 1,12.10⁵CFU/ml.

Khả năng bảo vệ tôm thẻ trong điều kiện cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* NT₇

Với kết quả xác định liều gây độc (LD₅₀) là 1,12.10⁵, chúng tôi thử nghiệm đánh giá hiệu quả kiểm soát sinh học của chủng *B. polyfermenticus* F₂₇. Kết quả bảng 3 cho thấy nghiệm thức NT3, NT4 được bổ sung chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ với các mật độ 10⁶ và 10⁷CFU/mL trong điều kiện gây nhiễm vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* NT₇ thì có tỷ lệ tôm sống cao hẳn hơn so với nghiệm thức NT1 chỉ bổ sung *V. parahaemolyticus* NT₇ và có sự khác biệt có ý nghĩa (P < 0,05). RPS (%) của các nghiệm thức NT3, NT4 lần lượt là 66,7% và 76,19% cho thấy chủng vi khuẩn khảo sát có khả năng bảo vệ tôm gây nhiễm với *V. parahaemolyticus* NT₇ khá cao ở mật độ 10⁶ và 10⁷ CFU/ mL. Từ kết quả trên, chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ đạt mật độ 10⁶CFU/ml đã có khả năng bảo vệ tôm chống lại *V. parahaemolyticus* NT₇ và đạt hiệu quả tốt hơn ở mật độ 10⁷CFU/ml.

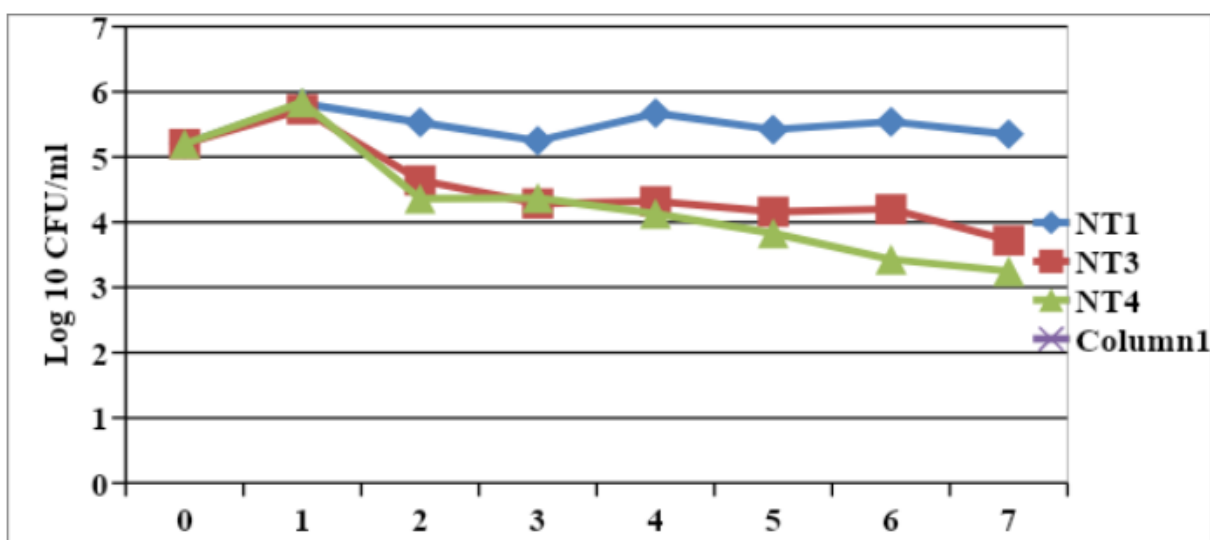
Bảng 3

Kết quả tỷ lệ sống (%) và RPS (%) khi gây nhiễm *V. parahaemolyticus* NT₇

Nghiệm thức	Tỷ lệ sống (%)	RPS (%)
NT1	30,00	
NT2	93,33	
NT3	73,33	66,7
NT4	83,33	76,19

Trong cùng một cột, các trị số có cùng mẫu tự không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa P=0,05 qua phép thử Duncan
 Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Đồng thời, trong thời gian thử nghiệm, chúng tôi kiểm tra mật độ *V. parahaemolyticus* ở các nghiệm thức. Nghiệm thức NT1 mật độ *Vibrio* luôn cao hơn so với NT3 và NT4. Điều này cho thấy chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ có khả năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên quy mô thực nghiệm (Hình 4), giúp khẳng định lại khả năng ức chế của chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ ở mật độ 10⁶CFU/ml và ức chế cao ở mật độ 10⁷CFU/ml.



Hình 4. Kết quả kiểm tra mật độ *V. parahaemolyticus* ở các nghiệm thức

4. Thảo luận

Nhiều nghiên cứu về vi khuẩn *Bacillus* spp. đã cho thấy rằng chúng có thể làm giảm mật độ vi khuẩn gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Như báo cáo của Vaseeharan và cộng sự (2003) đã sử dụng *Bacillus subtilis* BT23 để kiểm soát *V. harveyi*. Nghiên cứu của Balcazar và Rojas-Luna (2007) cũng cho thấy *Bacillus subtilis* UTM 126 có khả năng kiểm soát sinh học chủng *V. parahaemolyticus* (Balcazar & Rojas-Luna, 2007). Nguyen và cộng sự (2011) đã sử dụng 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. (F₁₁, F₃₃, F₁₀) có khả năng kiểm soát sự tăng trưởng của 3 chủng vi khuẩn gây bệnh là *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* ở mật độ *Bacillus* spp. tốt nhất là 10⁹CFU/ml (Nguyen et al., 2011). Ở nghiên cứu này, chúng tôi chọn lọc được chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* NT₇ cao nhất (18,50mm).

Ở thử nghiệm tính an toàn của chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ được đánh giá dựa trên 2 thử nghiệm là khả năng huyết giải và tính an toàn đối với tôm. Thử nghiệm khả năng dung

huyết là bước sàng lọc tính gây bệnh của các chủng để đảm bảo an toàn đối với động vật thủy sản và cho động vật có vú nói chung nhằm đảm bảo tính an toàn khi thực phẩm thủy sản bị nhiễm cho con người qua chuỗi thức ăn (Shafiqur, Khan, Naser, & Karim, 2009). Trong nghiên cứu của Shafiqur và cộng sự (2009) về *Bacillus* spp. phân lập được từ ao tôm tỉ lệ dương tính hemolysin là 48,64%. Chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ được đánh giá an toàn đối với tôm nên được lựa chọn để tiến hành thử nghiệm tiếp theo.

Nguyen và cộng sự (2011) đã phân lập được 2 chủng *Bacillus* sp. F₁₀ và F₁₁ từ giun quế có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú chống lại *V. parahaemolyticus* (Nguyen et al., 2011). “Kết quả của nghiên cứu thí nghiệm khả năng bảo vệ tôm giống trong điều kiện cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* NT₇ cho thấy *B. polyfermenticus* F₂₇ có khả năng bảo vệ tôm giống”.

5. Kết luận

Hiện nay, tình trạng lạm dụng kháng sinh và hóa chất trong nuôi trồng thủy sản ngày càng gia tăng, làm tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh lẫn các vi khuẩn có lợi, gây ra tình trạng kháng thuốc và dư lượng kháng sinh và hóa chất còn gây ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm và sức khỏe người sử dụng. Do đó kết quả của nghiên cứu này giúp mở ra một hướng phát triển mới cho ngành chế phẩm thủy sản - chế phẩm an toàn cho con người và không ảnh hưởng đến môi trường sinh thái.

Chúng tôi đã phân lập được chủng *V. parahaemolyticus* NT₇ từ mẫu tôm thẻ bệnh hoại tử gan tụy. Thử nghiệm khả năng đối kháng bằng phương pháp cấy vạch vuông góc cho thấy có 9 trong số 25 chủng *Bacillus* kháng *V. parahaemolyticus* NT₇. Trong đó, chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ phân lập từ giun quế có đường kính lớn nhất là 18,50mm, khác biệt thống kê so với các chủng còn lại, có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* NT₇ khi tiến hành đồng nuôi cấy, an toàn đối với tôm giống được lựa chọn cho những thử nghiệm tiếp theo.

Đồng thời chứng minh được chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ có khả năng bảo vệ tôm thẻ chống lại *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên mô hình gây nhiễm nhân tạo. Sau thời gian thử nghiệm, 93,33% tôm ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn (NT₂) vẫn sống và hoạt động bình thường chứng tỏ các yếu tố môi trường không ảnh hưởng đến tôm. Bên cạnh đó, tôm chết ở các nghiệm thức đều có dấu hiệu của bệnh hoại tử gan tụy và phân lập được *V. parahaemolyticus* từ những mẫu này. Điều này chứng tỏ tôm ở các nghiệm thức chết là do *V. parahaemolyticus*. Số lượng tôm sống ở các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$). Trong đó, các nghiệm thức NT₃, NT₄ bổ sung *B. polyfermenticus* F₂₇ với mật độ 10^6 và 10^7 CFU/ml có tỷ lệ sống cao hơn gấp 2,44 và 2,78 lần so với nghiệm thức đối chứng NT₁. RPS (%) của các nghiệm thức NT₃, NT₄ đều lớn hơn 50% cho thấy khả năng bảo vệ tôm khá cao của chủng khảo sát. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy chủng *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ có tiềm năng ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học kiểm soát và phòng bệnh EMS/AHPNS trên tôm.

Tài liệu tham khảo

Amend, D. F. (1981). Potency testing of fish vaccines. *Fish biologics: Serodiagnostics and Vaccines*, 49, 447-454.

- Balcazar, J. L., & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, 55(5), 409-412.
- Bergey, D. H., & Holt, J. G. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Chythanya, R., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208(1/2), 1-10.
- Domorongpokkaphan, V., & Wanchaitanawong, P. (2006). In vitro antimicrobial activity of *Bacillus* spp. against pathogenic *Vibrio* spp. in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Kasetsart Journal*, 40(4), 949-957.
- FAO. (2013). *Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304)*. Hanoi, Vietnam: Network of aquaculture centres in Asia-Pacific.
- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166-173.
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1/2), 147-165.
- Han, J. E., Mohney, L. L., Tang, K., & Pantoja, C. (2015). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture*, 2(C), 17-21.
- Kondo, H., Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Mavichak, R., Unajak, S., Nozaki, R., & Hirono, I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepato-pancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announcements*, 2(2), Article e00221-14.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L., & Tran, L. (2012). *Early mortality syndrome affects shrimp in Asia*. Retrieved May 13, 2019, from <https://www.aquaculturealliance.org/pdf/GAA-Lightner-Jan12.pdf>
- MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria* (3rd ed.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mooney, A. (2012). *An emerging shrimp disease in Vietnam, microsporidiosis or liver disease?* Retrieved February 24, 2012, from <http://aquatichealth.net/issues/38607>
- Moriarty, D. J. W. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151, 333-349.
- NACA-FAO (Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific-Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2011). *Quarterly aquatic animal disease report (Asia and Pacific region)*. Bangkok, Thailand: Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific.
- Nguyen, M. V., Duong, L. N., Dan, P. D., Lai, L. P. M., Lại, L. T. M., Nguyen, P. T. H., ..., Pham, V. H. (2010). *Phân lập và sàng lọc một số vi khuẩn tiềm năng làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản từ trùn quế (Perionyx excavatus) [Isolation and screening of some potential bacteria as probiotic in aquaculture from wormwood (Perionyx excavatus)]*.

Paper presented at Hội nghị CNSH thủy sản toàn quốc, Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn.

- Nguyen, M. V., Duong, L. N., Do, N. B., Tran, L. T. K., Ha, Y. T. B., Nguyen, H. V., & Nguyen T. N. T. (2011). Nghiên cứu khả năng kiểm soát *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm sú của một số chủng *Bacillus* spp. phân lập từ trùn quế [Study on control ability of *Vibrio* spp. causing disease on tiger shrimp of some strains of *Bacillus* spp. isolated from worms]. *Tạp chí NN & PTNN*, 3, 137-143.
- Nguyen, M. V., Nguyen, D. H. T., Do, Q. P., Vo, N. Y. N., Duong, L. N., Nguyen, T. N. T., & Le, P. H. (2013). Khả năng kiểm soát sinh học *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh của một số chủng *Bacillus* spp. phân lập từ ao nuôi cá tra [Biological control of pathogenic *Edwardsiella ictaluri* of some strains of *Bacillus* spp. isolated from catfish pond]. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 51(5C), 508-512.
- Purivirojkul, W., & Areechon, N. (2007). Application of *Bacillus* spp. isolated from the intestine of blacktiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from natural habitat for control pathogenic bacteria in aquaculture. *Kasetsart Journal: Natural Science*, 41, 125-132.
- Ravi, A. V., Musthafa, K. S., Jegathammbal, G., Kathiresan, K., & Pandian, S. K. (2007). Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology*, 45(2), 219-223.
- Reed, J. L., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent Endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 27(3), 493-497.
- Schryver, P., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: A microbial management issue in shrimp farming? *Pathogens Magazines*, 10(4), Article e1003919.
- Shafiqur, R., Khan, S. N., Naser, M. N., & Karim, M. M. (2009) Application of probiotic bacteria: A novel approach towards ensuring food safety in shrimp aquaculture. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 33(1), 139-144.
- Smibert, R. M., & Krieg, N. R. (1981) General characterization. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, & G. B. Phillips (Eds.), *Manual of methods for general bacteriology* (pp. 409-443). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Tổng cục Thủy sản. (2014a). *Hội thảo Khoa học bệnh đốm trắng và bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ [Scientific workshop on white spot disease and hepatopancreatic necrosis disease in brackish water shrimp]*. Retrieved May 15, 2019, from <http://www.fistenet.gov.vn/e-nuoi-trong-thuy-san/phong-chong-dich-benh/tinh-hinh-dich-benh-111om-trang-va-benh-hoai-tu-gan-tuy-cap-tren-tom-nuoi-nuoc-lo/>
- Tổng cục thủy sản. (2014b). *Tình hình sản xuất thủy sản năm 2014 [Fishery production in 2014]*. Retrieved May 15, 2019, from <http://www.fistenet.gov.vn/thong-tin-huu-ich/thong-tin-thong-ke/thong-ke-1/tinh-hinh-san-xuat-thuy-san-nam-2014/>

- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45-55.
- Tran, T. L. (2010). *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm [Methods of microbiological analysis in food, water and cosmetics]*. Hanoi, Vietnam: NXB Giáo Dục Việt Nam.
- Vaseeharan, B., Lin, J., & Ramsamy, 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.
- Verschuere, L., Rombaut, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671.
- Zorriehzahra, M. J., & Banaederakhshan, R. (2015). Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2s), 64-72.