

THÔNG BÁO KHOA HỌC

HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ SINH HỌC BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH (AHPND) GÂY RA BỞI *Vibrio parahaemolyticus* NT_{2,5} TRÊN TÔM THỂ TỪ IN VITRO TỚI QUY MÔ NUÔI THƯƠNG PHẨM CỦA CHẾ PHẨM VI SINH CPVS 01 và CPVS 02

EFFICIENCY BIOCONTROL OF THE ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE (AHPND) CAUSED BY *Vibrio parahaemolyticus* NT_{2.5} FORM IN VITRO TO SCALE COMMERCIAL SHRIMP FARMING BY CPVS 01 AND CPVS 02 BIOPRODUCTS

Nguyễn Văn Minh¹, Nguyễn Văn Có¹, Trần Kiến Đức², Nguyễn Sen³,
Nguyễn Văn Dũng⁴, Dư Ngọc Tuấn^{3*}

Ngày nhận bài: 05/08/2019; Ngày phản biện thông qua: 26/11/2019; Ngày duyệt đăng: 15/12/2019

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch, chúng tôi sàng lọc được chủng *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ đối kháng *Vibrio parahaemolyticus* NT_{2,5}, với đường kính lớn nhất là 18,50 mm. *B. polyfermenticus* F₂₇ được chứng minh có khả năng kiểm soát sinh học *V. parahaemolyticus* NT_{2,5} khi thử nghiệm nuôi tôm trong thùng 25 lít, mật độ 10⁶ và 10⁷ CFU/ mL giúp tôm đạt tỷ lệ sống lần lượt là 75,55 ± 3,85 % và 82,22 ± 3,85 % và có tỷ lệ bảo vệ RPS (%) lần lượt là 73,17 % và 80,49 %. Chế phẩm sinh học CPVS 01 dùng để trộn thức ăn nhằm ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong đường ruột tôm, CPVS 02 dùng xử lý nước nuôi tôm nhằm ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong ao nuôi tôm đã được nghiên cứu sản xuất. Ở thí nghiệm trong quy mô bể 1,5 m³, kết quả kiểm soát sinh học *V. parahaemolyticus* NT_{2,5} gây bệnh AHPND của chủng 2 loại chế phẩm vi sinh ở mật độ 10⁶ và 10⁷ CFU/ mL đạt tỷ lệ sống lần lượt là 78,17 ± 3,79 %, 84,33 ± 2,75 % và tỷ lệ bảo vệ RPS (%) lần lượt là 77,61 %, 83,93 %. Thử nghiệm trên ao nuôi tôm thương phẩm, ao 9C dương tính bệnh AHPND từ ngày thứ 50 nhưng tôm vẫn ăn, phát triển bình thường, không có biểu hiện chết hàng loạt của bệnh AHPND. Kết quả nghiên cứu cho thấy chế phẩm CPVS 01 và CPVS 02 có tiềm năng ứng dụng để phòng trừ sinh học bệnh AHPND trên tôm thể nuôi thương phẩm.

ABSTRACT

In this study, by using perpendicular streak method and disk diffusion method, we determined *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ has ability to resist *V. parahaemolyticus* NT_{2,5}, with the largest circular ring of diameter 18,50 mm. The ability of biological control to *V. parahaemolyticus* NT_{2,5} of *B. polyfermenticus* F₂₇ have been proved in 25 liters tank experiment, with 10⁶ CFU/ mL, 10⁷ CFU/ mL, the survival rate (%) of shrimp are 75.55 ± 3.85 % và 82.22 ± 3.85 %, RPS protection rate (%) are 73.17 % và 80.49 %, respectively. The CPVS 01 probiotic is used to mix with shrimp feed to inhibit *V. parahaemolyticus* in the shrimp's intestinal tract, CPVS 02 is used to treat shrimp culture water to inhibit *V. parahaemolyticus* in ponds, its were researched and manufactured. In 1,5 m³ composite tank experiment, the result of the ability of biocontrol *V. parahaemolyticus* NT_{2,5} causing AHPND of 2 types of probiotics with 10⁶ CFU/ mL, 10⁷ CFU/ mL density, the survival rate (%) of shrimp are 78.17 ± 3.79 %, 84.33 ± 2.75 %, RPS protection rate (%) are 77.61 %, 83.93 %, respectively. In the commercial scale shrimp farming, although 9C pond is positive with AHPND from 50th day, shrimp ate and grown normally, there was no sign of mass death of AHPND. The results of this study showed that the CPVS 01

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Đại học Mở TP. HCM

² Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG TP. HCM

³ Chi cục Thủy sản Ninh Thuận

³ Trung tâm Giống Hải sản Ninh Thuận

* Email liên hệ: tuandungoc@yahoo.com

and CPVS 02 probiotics have potential application to biocontrol AHPND in commercial scale shrimp farming.

Từ khóa: bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, tôm thẻ chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus* NT_{2,5}, chế phẩm sinh học, *Bacillus polyfermenticus* F₂₇

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 thủy sản, 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).

Ở Việt Nam, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND – acute hepatopancreatic necrosis disease) được phát hiện năm 2010. Bệnh ảnh hưởng đến khu vực các tỉnh sản xuất tôm với tổng diện tích ao nuôi tôm khoảng 98.000 ha (Mooney, 2012). 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 (Tổng cục thủy sản, 2014a).

Nguyên nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) được công bố bởi nhóm nghiên cứu của Donald Lightner – Đại học Arizona (Hoa Kỳ) trên trang Hiệp Hội Nuôi Trồng Thủy Sản Toàn Cầu (The Global Aquaculture Alliance – GAA) ngày 2/5/2013. *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh AHPND được chứng minh trong trình tự bộ gen có chứa đoạn gen độc tố PirA và PirB, do *Vibrio parahaemolyticus* bị tấn công bởi một loại thực khuẩn thể, quá trình chuyển gen xảy ra và PirA và PirB được chèn vào định vị trong plasmid vi khuẩn, độc tố này chỉ được tìm thấy trong các chủng gây bệnh AHPND (Kondo và cs. 2014). Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* xâm nhập vào cơ thể tôm qua đường tiêu hóa, tồn tại, phát triển mạnh và gây hại cho cơ quan gan, tụy của tôm (theo FAO; Lightner và cs., 2012; Kondo và cs., 2014).

Han J.E. và cs., 2015 đã xác định 7 chủng *V. parahaemolyticus* phân lập từ mẫu tôm bệnh hoại tử gan tụy ở Việt Nam kháng kháng sinh, đây là bằng chứng cho thấy 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 và cs., 1997; Verschuere và cs., 2000).

Chi *Bacillus* được nghiên cứu có khả năng tạo ra được các enzyme 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., vì thế *Bacillus* thường được ứng dụng làm chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản (Domrongpakkaphan và cs., 2006; Ravi và cs., 2007). Có nhiều nghiên cứu cho thấy khả năng kiểm soát sinh học của các chủng *Bacillus* đối với *Vibrio* (Purivirojkul và cs., 2007; Balcazar và cs., 2007; Nguyễn Văn Minh và cs., 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 khảo sát, thử nghiệm tính hiệu quả của hai loại chế phẩm vi sinh CPVS 01 và CPVS 02 trong điều kiện nuôi tôm thử nghiệm trong thùng 25 lít, trên quy mô bể nuôi 1,5m³ và ao nuôi thương phẩm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

25 chủng *Bacillus* spp. (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 TP.

Hồ Chí Minh. Trong đó, chủng *Bacillus* sp. F₂₇ phân lập từ giun quế đã được định danh bằng phương pháp sinh hóa kết hợp giải trình 16S rDNA, kết quả xác định F₂₇ thuộc loài *Bacillus polyfermenticus* (Nguyễn Văn Minh và cs., 2010).

Chủng *V. parahaemolyticus* NT_{2,5} phân lập từ mẫu tôm có biểu hiện bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) tại ao nuôi tôm thôn Từ Thiện, xã Phước Vinh, tỉnh Ninh Thuận, đã xác định liều gây chết trung bình LD50 trên tôm thẻ, xác định chứa gen độc tố PirB và định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA. Được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh được sử dụng trong nghiên cứu.

Tôm thẻ chân trắng khỏe mạnh, không mang các mầm bệnh, được trung tâm giống hải sản cấp I tỉnh Ninh Thuận mua từ Công ty TNHH Chăn Nuôi C.P. Việt Nam, tôm được kiểm tra âm tính với bệnh AHPND tại phòng xét nghiệm của Trung tâm Khuyến ngư tỉnh Ninh Thuận.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hoạt hóa *Vibrio parahaemolyticus* NT_{2,5}

Từ ống chủng *V. parahaemolyticus* trên môi trường thạch nghiêng Pepton kiềm, chúng tôi tiến hành cấy rìa trên thạch TCBS và môi trường ChromAgar. Sau 24h, chọn những khuẩn lạc đặc trưng, riêng lẻ trên đĩa môi trường cấy vào ống thạch nghiêng Pepton kiềm, ủ 37°C/24h.

2.2.2. Xác định khả năng đối kháng *B. polyfermenticus* F₂₇ 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 24h (Purivirojkl, Areechon, 2007).

Phương pháp giếng khuếch tán: trải dịch *V. parahaemolyticus* gây bệnh (mật độ 10⁵ CFU/mL) lên đĩa môi trường NA bổ sung 1,5% NaCl. Dịch nuôi cấy các chủng khuẩn thử nghiệm sau 24h trong môi trường NB được li tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút. 70 µL dịch nổi sau ly tâm được bổ sung vào giếng có đường kính 6

mm trên đĩa thạch đã trải vi khuẩn gây bệnh. Đo đường kính vòng kháng khuẩn tạo thành sau 30°C/24h. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. (Chythanya và cs., 2002)

2.2.3. Đánh giá hiệu quả phòng trừ sinh học *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND của chủng vi khuẩn *B. polyfermenticus* F₂₇ trong điều kiện nuôi tôm thử nghiệm trong thùng 25 lít.

Chủng *B. Polyfermenticus* F₂₇ thử nghiệm được tăng sinh trên môi trường NB ở 30°C/24h. Mật độ thử nghiệm 10⁶ CFU/mL. *V. parahaemolyticus* được tăng sinh trong môi trường canh peptone kiềm (bổ sung 3 % NaCl), ủ 37°C/24h, mật độ thử nghiệm dựa vào kết quả khảo sát LD50, mật độ sử dụng là 2xLD50 (Vaseeharan và cs., 2003). Thí nghiệm được tiến hành với 4 nghiệm thức và bố trí 90 con/nghiệm thức, chia thành 3 thùng mỗi thùng có 30 con tôm/ 25 lít nước.

Thí nghiệm được bố trí gồm 4 nghiệm thức (NT): NT1: gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* (nồng độ 2 x LD50 ở tất cả nghiệm thức); NT2: không gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* và không dùng *B. polyfermenticus* F₂₇; NT3: gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* và bổ sung vi khuẩn *B. polyfermenticus* F₂₇ thử nghiệm mật độ 10⁶ CFU/mL; NT4: gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* và bổ sung vi khuẩn *B. polyfermenticus* F₂₇ thử nghiệm mật độ 10⁷ CFU/mL. Gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* (2 x LD50) đồng thời bổ sung *B. polyfermenticus* F₂₇ vào môi trường nước trong bể nuôi. Sau 3 ngày thì tiến hành thả tôm vào nuôi. Sau đó, tiếp tục sử dụng *B. polyfermenticus* xử lý nước định kỳ 5 ngày/1 lần và kết hợp trộn vào khẩu phần thức ăn cho tôm.

Khả năng bảo vệ vật chủ gây nhiễm với *V. parahaemolyticus* của vi khuẩn *B. polyfermenticus* F₂₇ thử nghiệm được đánh giá theo ba mức độ: RPS > 50%: cao, 30% < RPS ≤ 50%: trung bình, RPS ≤ 30%: không có khả năng bảo vệ.

$$RPS\% = (1 - \frac{a}{b}) \times 100\%$$

Trong đó: RPS (Relative Percentage of Survival): tỷ lệ sống tương đối.

a: số ấu trùng tôm chết ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn khảo sát.

b: số ấu trùng tôm chết ở nghiệm thức đối chứng âm. (Amend, 1981).

2.2.4. *Khảo sát, thử nghiệm hiệu quả phòng trừ sinh học V. parahaemolyticus gây bệnh AHPND của CPVS 01 và CPVS 02 trong quy mô bể nhựa composite 1,5 m³*

Chế phẩm vi sinh: CPVS 01 - chế phẩm dùng để trộn thức ăn nhằm ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong đường ruột tôm (20g CPVS 01/kg thức ăn) và CPVS 02 - chế phẩm dùng xử lý nước nuôi tôm nhằm ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong nước nuôi tôm (1kg CPVS 02 mật độ vi khuẩn *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ là 10⁹ CFU/mL/1000L nước nuôi tôm để đạt mật độ trong bể nuôi là 10⁶ CFU/mL).

CPVS 01 gồm: *Bacillus amyloliquefaciens* $\geq 1 \times 10^9$ CFU/g; *Bacillus subtilis* Q111 $\geq 1 \times 10^9$ CFU/g; *Bacillus polyfermenticus* F27 $\geq 1 \times 10^9$ CFU/g; *Lactobacillus sp.* $\geq 1 \times 10^8$ CFU/g; *Saccharomyces cerevisiae* $\geq 1 \times 10^8$ CFU/g; Enzyme: Amylase, Protease, Lipase. CPVS 02 gồm: *Bacillus subtilis* Q111 $\geq 1 \times 10^9$ CFU/g; *Bacillus polyfermenticus* F₂₇: $\geq 1 \times 10^9$ CFU/g; *Bacillus sp. NO8* $\geq 1 \times 10^9$ CFU/g.

Thí nghiệm được tiến hành với 6 nghiệm thức (NT), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần (3 bể), mỗi bể có 200 con tôm/ 700 lít nước. 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* 2xLD₅₀ và bổ sung chế phẩm vi sinh để đạt mật độ 10⁶ CFU/mL; NT4: gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* 2xLD₅₀ và bổ sung chế phẩm vi sinh để đạt mật độ 10⁷ CFU/mL.

2.2.5. *Khảo sát, thử nghiệm tính hiệu quả của CPVS 01 và CPVS 02 nhằm hạn chế bệnh AHPND ngoài ao nuôi tôm thương phẩm*

Tôm post được nuôi trong 1 ao (1000m³), sau 30 ngày tuổi, tôm được chuyển sang thành 3 ao 9A, 9C, 9D (1000m³/1 ao). Chế phẩm vi sinh hỗ trợ tiêu hóa CPVS 01 được trộn với thức ăn với liều lượng 20g/ 1kg thức ăn. Chế phẩm vi sinh xử lý nước nuôi tôm nhằm ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (CPVS 02): được lên men trực tiếp 48 giờ tại ao tôm trước

khi sử dụng. Thành phần sử dụng để lên men 1000L CPVS 02 gồm: 3kg men bột CPVS 02, 10kg mật ri đường, 3kg thức ăn cho tôm và 100g khoáng. Liều dùng cho ao 1000 m³: ao trước khi thả tôm sử dụng 2 lần, mỗi lần 1000L, cách nhau 2 ngày. Ao đã thả tôm dùng liều 300L mỗi ngày.

Đánh giá khả năng kiểm soát *V. parahaemolyticus*: bằng cách kiểm tra mật độ khuẩn lạc xanh, kiểm tra bệnh AHPND 6-7 ngày 1 lần. Các dịch vụ kiểm nghiệm được thực hiện tại phòng kiểm nghiệm ShrimpVet và Viện nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II.

Đánh giá khả năng xử lý môi trường nước và hỗ trợ tiêu hóa: kiểm tra các chỉ số pH (sáng, chiều), NH₃ và NO₂ mỗi ngày, theo dõi hàm lượng thức ăn tôm ăn và trọng lượng tôm (đo ngẫu nhiên 15 hoặc 20 con).

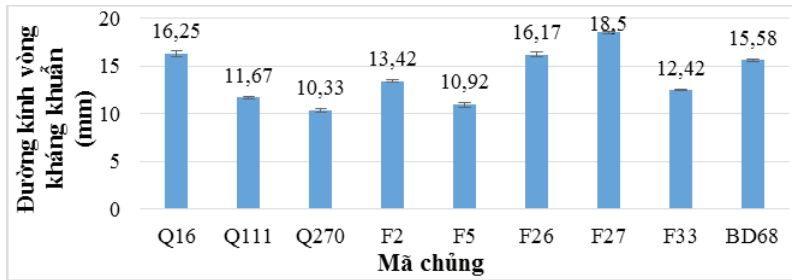
2.2.6. *Phương pháp xử lý số liệu*

Số liệu thu thập được tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức theo phương pháp phân tích Anova với phép thử Duncan thông qua phần mềm Statgraphics plus 3.0 với mức ý nghĩa ($p < 0,05$).

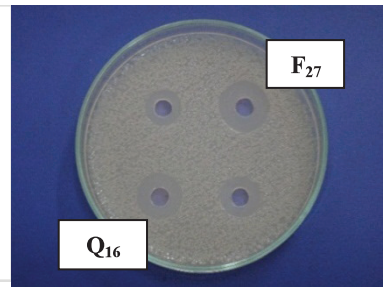
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* NT_{2,5} của các chủng *Bacillus* thử nghiệm

V. parahaemolyticus NT_{2,5} được hoạt hóa, khảo sát hình thái đại thể, và vi thể để kiểm tra tính thuần trước khi làm thí nghiệm tiếp theo. Bằng phương pháp cấy vạch vuông góc, nhận thấy có 9/26 chủng *Bacillus* (Q₁₆, F₂, F₂₇, F₅, F₂₆, F₃₃, BD₆₈, Q₂₇₀, Q₁₁₁) kháng với *V. parahaemolyticus* ở 24h. Bằng phương pháp giéng khuếch tán, đường kính vòng kháng khuẩn của các chủng thử nghiệm có giá trị từ 10,33 – 18,50 mm (hình 2). Trong đó, chủng *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ có đường kính lớn nhất (18,50 mm) và có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại (hình 3), tiếp theo là chủng *B. subtilis* Q₁₆ (16,25 mm). Chủng có đường kính vòng kháng nhỏ nhất là *Bacillus sp.* Q₂₇₀ (10,33 mm). Chúng tôi lựa chọn chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Biểu đồ thể hiện khả năng kháng khuẩn của các chủng Bacillus thử nghiệm



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

3.2. Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trừ sinh học *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND của chủng vi khuẩn *B. polyfermenticus* F₂₇ trong điều kiện nuôi tôm thử nghiệm trong thùng 25 lít.

Với kết quả xác định khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ cao nhất là 18,50 mm. Từ đó, tiến hành thử nghiệm đánh giá hiệu quả kiểm soát sinh học của chủng *B. polyfermenticus* F₂₇. Kết quả được trình bày trong bảng 2 và hình 4.

Bảng 2. Kết quả tỷ lệ tôm sống (%) và RPS (%) khi thử nghiệm trong thùng 25 lít.

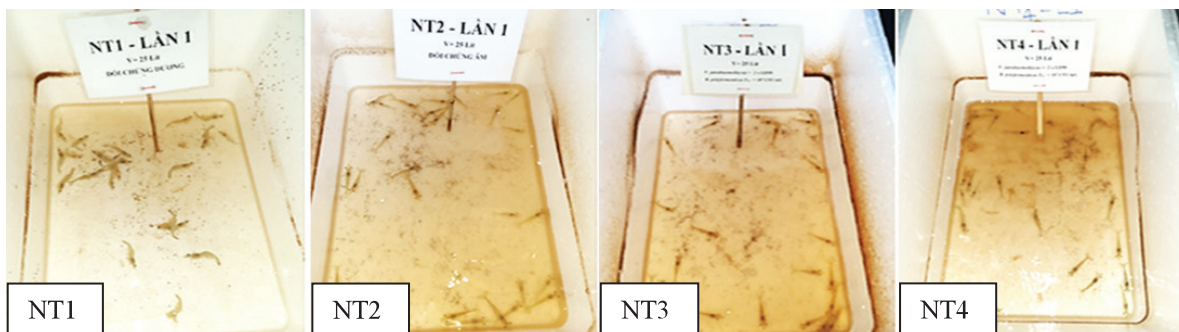
Nghiệm thức	Tỷ lệ tôm sống (%)	RPS (%)
NT1	8,89 ± 8,39 ^c	
NT2	92,22 ± 6,94 ^a	
NT3	75,55 ± 3,85 ^b	73,17
NT4	82,22 ± 3,85 ^{ab}	80,49

Trong cùng một cột, các trị số có cùng mẫu tự không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 0,05 qua phép thử Duncan.

Qua kết quả bảng 2 chúng tôi thấy rằng, sau 7 ngày thí nghiệm, ở nghiệm thức NT3, NT4 được bổ sung chủng *B. polyfermenticus* F₂₇ với các mật độ lần lượt là 10⁶ CFU/mL và 10⁷ CFU/mL trong điều kiện gây nhiễm vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* có tỷ lệ tôm sống lần lượt là 75,55 ± 3,85 % và 82,22 ± 3,85 % cao hơn so với nghiệm thức NT1 (đối chứng dương) có tỷ lệ tôm sống là 8,89 ± 8,39 % và có sự khác biệt có ý nghĩa (P <

0,05). Kết quả này cho thấy chủng vi khuẩn *B. polyfermenticus* F₂₇ ở mật độ 10⁶ và 10⁷ CFU/mL có khả năng bảo vệ tôm khi gây nhiễm với *V. parahaemolyticus* và đạt tỉ lệ bảo hộ tương ứng là 73,17 % và 80,49 %.

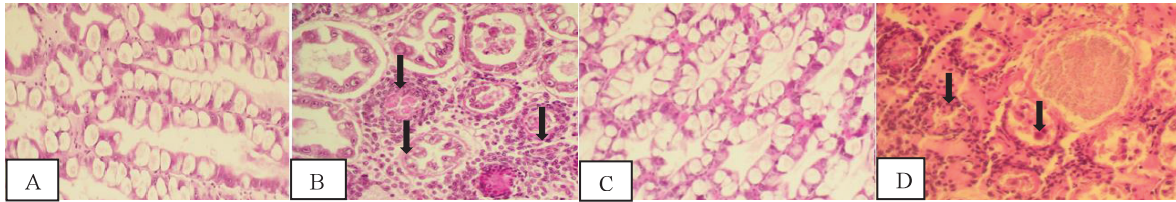
Sau khi gây cảm nhiễm trên tôm thẻ ở thí nghiệm thùng 25 lít. Theo dõi tôm biểu hiện hoạt động chậm chạp, bỏ ăn, gan tụy teo, dai và nhợt nhạt, ruột rỗng của bệnh AHPND ở các nghiệm thức thí nghiệm. Sau đó, các mẫu



Hình 4. Kết quả thử nghiệm khả năng kiểm soát và ức chế *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND của chủng vi khuẩn *B. polyfermenticus* F₂₇ trong điều kiện nuôi tôm thử nghiệm trong thùng 25 lít.

gan tôm bệnh được cố định bằng dung dịch Davidson's và kiểm tra phân tích mô học tại

Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II, kết quả được trình bày hình 5A và 5B.



Hình 5. Biến đổi mô học tôm gây nhiễm *V. parahaemolyticus*

Chú thích: (A); (C) - gan tụy tôm khỏe mạnh. (B), (D) – gan tụy tôm nhiễm bệnh AHPND.

Ở mẫu gan tụy tôm nhiễm bệnh AHPND (hình 5B), dấu hiệu teo ống gan tụy, số lượng tế bào B, F và R giảm nhiều, các tế bào gan thoái hóa, xuất hiện hiện tượng melanin hóa và các tế bào máu tập trung quanh các cụm vi khuẩn trong vùng bị hoại tử.

3.3. Kết quả khảo sát, thử nghiệm hiệu quả phòng trừ sinh học *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND của CPVS 01 và CPVS 02 trong quy mô bể nhựa composite 1,5 m³

Sau khi đánh giá hiệu quả phòng trừ sinh học *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND của chủng vi khuẩn *B. polyfermenticus* F₂₇ trong điều kiện nuôi tôm thử nghiệm trong thùng 25 lít. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu tạo ra hai loại chế phẩm vi sinh dùng xử lý nước nuôi tôm và trộn thức ăn hỗ trợ tiêu hóa nhằm hạn chế bệnh AHPND, thử nghiệm trên quy mô bể nhựa 1,5 m³. Kết quả được trình bày ở bảng 3 và hình 6.

Bảng 3. Kết quả tỷ lệ tôm sống (%) và RPS (%) khi thử nghiệm ở quy mô bể nhựa 1,5 m³.

Nghiệm thức	Tỷ lệ sống (%)	RPS (%)
NT1	2,50 ± 2,29 ^f	
NT2	98,83 ± 0,29 ^a	
NT3	78,17 ± 3,79 ^c	77,61
NT4	84,33 ± 2,75 ^b	83,93

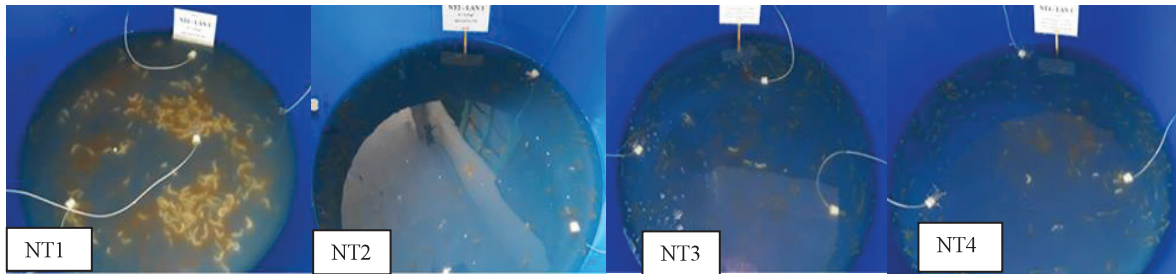
Trong cùng một cột, các trị số có cùng mẫu tự không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 0,05 qua phép thử Duncan.

Qua kết quả bảng 3 chúng tôi thấy rằng, sau 7 ngày thí nghiệm bổ sung chế phẩm vi sinh ở nghiệm thức NT4 với mật độ là 10⁷ CFU/ mL có tỷ lệ tôm sống cao nhất (84,33 ± 2,75 %), tiếp đến NT3 với mật độ 10⁶ CFU/ mL có tỷ lệ tôm sống (78,17 ± 3,79 %), so với NT1 (đối chứng dương) có tỷ lệ tôm sống (2,50 ± 2,29 %) chỉ bổ sung *V. parahaemolyticus* với mật độ 3,89 x 10³ CFU/ mL và có sự khác biệt có ý nghĩa (P < 0,05).

Tỷ lệ bảo vệ RPS (%) của nghiệm thức NT4 là cao nhất 83,93 % và đến NT3 là 77,61 %, kết quả cho thấy sử dụng chế phẩm vi sinh ở mật độ 10⁶ và 10⁷ CFU/mL có khả năng bảo vệ tôm và đạt chỉ số bảo hộ cao

đối với *V. parahaemolyticus* trong điều kiện cảm nhiễm. Trong nghiên cứu của Amoah K. và cs., (2019), khi bổ sung vào chế độ ăn của tôm thẻ chân trắng lượng men vi sinh chứa *Bacillus coagulans* ATCC 7050 10⁸ CFU/ mL, tôm có kháng lại *V. parahaemolyticus*, kết quả ghi nhận tỷ lệ bảo vệ RPS là 76%.

Kết quả mô học cho thấy mẫu gan tụy tôm nhiễm bệnh AHPND (hình 5D), dấu hiệu teo ống gan tụy, số lượng tế bào B, F và R giảm nhiều, các tế bào gan thoái hóa, xuất hiện hiện tượng melanin hóa và các tế bào máu tập trung quanh các cụm vi khuẩn trong vùng bị hoại tử, kết quả có sự khác biệt so với mẫu gan tụy tôm lành bệnh (hình 5C).



Hình 6. Thử nghiệm tính hiệu quả của hai loại chế phẩm vi sinh CPVS 01 và CPVS 02 nhằm hạn chế *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trong điều kiện nuôi tôm quy mô bể nhựa 1,5 m³

3.4. Kết quả khảo sát, thử nghiệm tính hiệu quả của CPVS 01 và CPVS 02 nhằm hạn chế bệnh AHPND ngoài ao nuôi tôm thương phẩm

Kết quả thử nghiệm tính hiệu quả của 2 loại chế phẩm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả theo dõi các chỉ tiêu mật độ Vibrio, bệnh AHPND, chỉ tiêu môi trường trên 3 ao nuôi tôm sử dụng CPVS 01 và CPVS 02

Ngày tuổi	Mật độ Vibrio tổng số (CFU/mL)	Tỷ lệ khuẩn lạc vàng/xanh (CFU/mL)	EMS/ AHPND	NH ₃ (mg/L)	NO ₂ (mg/L)
Giai đoạn 1: 30 ngày đầu					
7	8,75 x 10 ³	8,75 x 10 ³ / $<10^1$	Âm tính	0,5	0
11	9,40 x 10 ³	9,40 x 10 ³ / $<10^1$	Âm tính	1	0
23	1,72 x 10 ⁵	1,72 x 10 ⁵ / $<10^1$	Âm tính	0,3	0
30	2,81 x 10 ⁵	2,81 x 10 ⁵ / $<10^1$	Âm tính	0,7	0,05
Giai đoạn 2: 50 ngày sau					
35	9A: 3,75 x 10 ⁴	9A: 3,75 x 10 ⁴ / $<10^1$	9A: âm tính	9A: 0,5	9A: 0,0
	9D: 3,85 x 10 ⁴	9D: 3,85 x 10 ⁴ / $<10^1$	9D: âm tính	9D: 0,5	9D: 0,0
43	9A: 4,10 x 10 ⁴	9A: 4,10 x 10 ⁴ / $<10^1$	9A: âm tính	9A: 0,5	9A: 0,0
	9C: 2 x 10 ⁴ 9D: 4,95 x 10 ⁴	9C: 1,64 x 10 ⁴ / $<10^3$ 9D: 4,50 x 10 ⁴ / $< 3,75 x 10^3$	9C: âm tính 9D: âm tính	9C: 1,0 9D: 1,0	9C: 0,5 9D: 0,0
50	9A: 1,05 x 10 ⁴	9A: 7,40 x 10 ³ / $<3, 10 x 10^3$	9A: âm tính	9A: 0,3	9A: 0,0
	9C: 4,80 x 10 ⁴	9C: 4,10 x 10 ⁴ / $< 5,00 x 10^3$	9C: dương tính	9C: 1,0	9C: 0,3
	9D: 3,19 x 10 ⁴	9D: 2,83 x 10 ⁴ / $< 3,65 x 10^3$	9D: âm tính	9D: 0,5	9D: 0,0
58	9A: 4,65 x 10 ⁴	9A: 4,65 x 10 ⁴ / $< 10^1$	9A: âm tính	9A: 0,3	9A: 0,1
	9C: 6,70 x 10 ⁴	9C: 6,70 x 10 ⁴ / $< 3,90 x 10^2$	9C: dương tính	9C: 0,5	9C: 0,3
	9D: 8,40 x 10 ⁴	9D: 8,00 x 10 ³ / $< 3,60 x 10^2$	9D: âm tính	9D: 0,3	9D: 0
63	9A: 1,22 x 10 ⁴	9A: 1,16 x 10 ⁴ / $< 3,75 x 10^2$	9A: âm tính	9A: 0,3	9A: 0,1
	9C: 7,10 x 10 ⁴	9C: 6,60 x 10 ⁴ / $< 3,90 x 10^3$	9C: dương tính	9C: 0,5	9C: 0,5
	9D: 2,22 x 10 ⁴	9D: 2,13 x 10 ⁴ / $<8,65 x 10^2$	9D: âm tính	9D: 0,3	9D: 0,0
71	9A: 4,3 x 10 ⁴	9A: 2,92 x 10 ⁴ / $< 2,35 x 10^4$	9A: âm tính	9A: 0,3	9A: 0,2
	9C: 5,9 x 10 ⁴	9C: 5,50 x 10 ⁴ / $< 3,25 x 10^3$	9C: dương tính	9C: 0,5	9C: 0,3
	9D: 8,35 x 10 ⁴	9D: 3,85 x 10 ⁴ / $<4,50 x 10^4$	9D: âm tính	9D: 0,3	9D: 0,2
78	9A: 5,15 x 10 ⁵	9A: 1,86 x 10 ⁵ / $< 3,25 x 10^5$	9A: âm tính	9A: 0,3	9A: 0,2
	9C: 5,50 x 10 ⁵	9C: 4,75 x 10 ⁵ / $< 6,10 x 10^4$	9C: dương tính	9C: 0,5	9C: 0,3
	9D: 9,85 x 10 ⁵	9D: 9,85 x 10 ⁵ / $<5,60 x 10^5$	9D: âm tính	9D: 0,3	9D: 0,2

Ao 9C dương tính với bệnh AHPND khi xét nghiệm bệnh bằng phương pháp PCR vào giai đoạn 50 ngày tuổi, chúng tôi bắt đầu tăng liều sử dụng chế phẩm vi sinh CPVS 02 vào ao 9C mỗi ngày 1000 lít, CPVS 01 trộn với thức ăn vẫn duy trì liều bình thường như quy trình. Tôm ăn bình thường, không có biểu hiện kém linh hoạt, màu sắc vùng gan tụy và đường phân bình thường, không bị chết rải rác, tốc độ tăng trưởng tôm tốt. Do kết quả kiểm tra dương tính với bệnh AHPND nên chúng tôi duy trì liều dùng 1000 lít suốt cả vụ. Kết thúc vụ nuôi tôm thử nghiệm 2 chế phẩm vi sinh trên 3 ao đã cho thấy hiệu quả trong việc phòng trừ sinh học bệnh AHPND.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Chủng *Bacillus polyfermenticus* F₂₇ có khả năng đối kháng với chủng *V. parahaemolyticus*, đường kính vòng kháng lớn nhất là 18,50 mm.

Ở thí nghiệm nuôi tôm trong thùng 25 lít, với mật độ 10⁶ CFU/g và 10⁷ CFU/g, *B. polyfermenticus* F₂₇ có khả năng kiểm soát và ức chế *Vibrio parahaemolyticus* NT_{2,5} gây

bệnh AHPND, có tỷ lệ bảo vệ tôm RPS (%) lần lượt là 73,17 % và 80,49 %.

Đánh giá khả năng kiểm soát sinh học *V. parahaemolyticus* NT_{2,5} gây bệnh AHPND của chủng 2 loại chế phẩm vi sinh (CPVS 01 và CPVS 02) trong điều kiện nuôi tôm thử nghiệm trong quy mô bể nhựa 1,5 m³, có tỷ lệ bảo vệ RPS (%) lần lượt là 77,61 %, 83,93 %.

Kết quả thử nghiệm khả năng kiểm soát bệnh AHPND của hai loại chế phẩm vi sinh trong quy mô ao thương phẩm, cho thấy cả 3 ao đều được kiểm soát tốt chỉ số môi trường, kiểm soát và kiểm hãm sự tiến triển của bệnh AHPND trong suốt vụ nuôi, tôm ăn bình thường, phát triển tốt, không có biểu hiện chết hàng loạt của bệnh AHPND. Kết quả nghiên cứu này cho thấy chế phẩm CPVS 01 và CPVS 02 có tiềm năng ứng dụng trong việc phòng trị bệnh hoại tử gan tụy cấp tính cho tôm thẻ nuôi thương phẩm.

Chúng tôi kiến nghị cần sự hỗ trợ của các ban ngành liên quan để quy trình công nghệ này được đánh giá lặp lại và trên diện rộng hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Nguyễn Văn Minh, Dương Nhật Linh, Đan Duy Pháp, Lai Phong Mỹ Lê, Lại Thị Minh Lê, Nguyễn Thị Hồng Phương, Lê Huyền Ái Thuý, Nguyễn Văn Bầy, Nguyễn Văn Hoà, Phạm Hùng Vân, 2010. Phân lập và sàng lọc một số vi khuẩn tiềm năng làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản từ trùn quế (*Perionyx excavatus*). Hội nghị CNSH thủy sản toàn quốc, Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn.
2. Nguyễn Văn Minh, Dương Nhật Linh, Đỗ Bảo Ngọc, Trần Thị Khánh Linh, Hà Thị Bảo Yên, Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh, 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. Tạp chí NN & PTNN, 137 -143.
3. Trần Linh Thuớc, 2010. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. NXB Giáo Dục Việt Nam, 70 trang.
4. Tổng cục Thủy sản, 2014a. Hội thảo Khoa học bệnh Đốm trắng và bệnh Hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ.
5. Tổng cục thủy sản, 2014b. Tình hình sản xuất thủy sản năm 2014.

Tiếng Anh

6. Amoah K., Huang Q.C., Tan B.P., Zhang S., Chi S.Y., Yang Q.H., Liu H.Y., Dong X.H., 2019. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 87:796-808.
7. Chythanya R., Karunasagar I., Karunasagar I., 2002. Inhibition of shrimp pathogenic *vibrios* by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208, 1-10.
8. 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, on 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053.
9. Gatesoupe F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
10. Han J.E., Tang K.F.J., Tran L.H., Lightner D.V., 2015. Photorhabdus insect-related (Pir) toxin- like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113, pp. 33–40.
11. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th edition, Chapper V, 816 pages.
12. 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 Announc*, 2(2), (e00221-14).
13. Lightner D.V. (1996), “A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp”. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA , pp.1-72
14. Lightner D.V., Loc T., Linda N., Rita M. R., Leone L. M., Carlos R. P., Kevin F. (2013), “Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp”, *Diseases Of Aquatic Organisms*, 105, pp. 45–55.
15. Lightner D.V., Redman R.M., Pantoja C.R., Noble B.L., Tran L.H., 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Glob Aquacult Advocate*, 40 pages.
16. Mooney A., 2012. An emerging shrimp disease in Vietnam, microsporidiosis or liver disease?
17. Moriarty D. J. W. (1997), “The role of microorganisms in aquaculture ponds”, *Aquaculture* 151, pp. 333 – 349.
18. 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 J. (Nat. Sci.)* 41, 125-132.
19. 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”, *Lett Appl Microbiol*, 45, No. 2, pp. 219-223.
20. Reed J.L., Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty percent Endpoints. *The American journal of hygiene* 27, 493-497.
21. Schryver P., Defoirdt T., Sorgeloos P., 2014. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? *PLoS Pathogens*. 2014 Apr; 10(4): e1003919.
22. Tran L., Nunan L., Redman R.M., Mohney L.L., Pantoja C.R., Fitzsimmons K., Lightner D.V., 2013. Diseases Of Aquatic Organisms 105, 45–55.
23. Verschuere L., Rombaut P., Verstraete W. (2000), “Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture”. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 64 (4), pp. 655-671.