

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**TIỀM NĂNG CHẾ PHẨM VI SINH *Bacillus* VÀ *Streptomyces* KIỂM SOÁT
Vibrio parahaemolyticus GÂY BỆNH AHPND TRÊN
TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)**

**PROBIOTIC POTENTIAL OF *Bacillus* AND *Streptomyces* STRAINS IN CONTROL OF
Vibrio parahaemolyticus CAUSING AHPND IN WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)**

**Võ Hồng Phượng^{1*}, Phạm Thị Huyền Diệu², Lê Hồng Phước¹,
Cao Vĩnh Nguyên³, Chu Quang Trọng¹, Nguyễn Công Thành⁴,
Thái Thanh Trung⁴, Đặng Ngọc Thùy¹**

Ngày nhận bài: 01/08/2019; Ngày phản biện thông qua: 10/11/2019; Ngày duyệt đăng: 15/12/2019

TÓM TẮT

Hiện nay ứng dụng men vi sinh giúp cải thiện chất lượng nước, kiểm soát một số bệnh truyền nhiễm trên tôm đã góp phần giảm thiểu bùng phát dịch bệnh. Mục tiêu của nghiên cứu là xác định khả năng ức chế của *Bacillus* (B1, S5) và *Streptomyces* X285 với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh ở tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Kết quả ghi nhận, bổ sung 10^5 CFU/mL *Bacillus* và *Streptomyces* định kỳ 2 lần/tuần dẫn đến tỷ lệ sống của tôm cao hơn so với nhóm đối chứng và tỷ lệ bao hộ (RPS) là trên 70% sau 10 ngày gây nhiễm *V. parahaemolyticus* trong điều kiện in vivo. Hơn nữa, nghiên cứu tương tự đã được ứng dụng ở quy mô ao (600-700 m²), tôm được nuôi và theo dõi trong 120 ngày tại tỉnh Sóc Trăng. Bổ sung chế phẩm sinh học bao gồm *Bacillus* và *Streptomyces* 2 lần/tuần, có thể kiểm soát *V. parahaemolyticus*. Hơn nữa, các chỉ số môi trường nitrit, amonia đều tăng nhưng trong khoảng cho phép nuôi tôm nước lợ QCVN 02-19: 2014 / BNNPTNT. Mặt khác, ao đối chứng khi sử dụng chế phẩm vi sinh thương mại đã không mang lại hiệu quả và được thu hoạch sớm vào 45 ngày nuôi vì AHPND.

Từ khóa: *Bacillus*, *Streptomyces*, AHPND, tỷ lệ chết bảo hộ RPS (%)

ABSTRACT

Application of probiotics in improving water quality and controlling certain bacterial infection in shrimp are potentially less disease outbreaks. The present study was conducted to determine the inhibitory effects of *Bacillus* and *Streptomyces* on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* infection in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). It was found that addition of 10^5 CFU/mL of *Bacillus* and *Streptomyces* twice per week resulted in higher shrimp survival compared to that of positive control and relative percentage survival (RPS) was above 70% after 10 days of challenging shrimp with *V. parahaemolyticus* in vivo test. Moreover, the same study was applied in larger scale at farm level (600-700 m²) where white-leg shrimp were cultured for 100 days in pond in Soc Trang province. Adding probiotic formulations include *Bacillus* and *Streptomyces* twice per week could control *V. parahaemolyticus*. Furthermore, concentration of nitrite, ammonia slightly improve during 100 days in all experimental groups but those parameters were under permitted code QCVN 02-19:2014/BNNPTNT. On the other hand, the control pond with commercial probiotic was early harvested at 45 cultured days after stocking because of AHPND.

Key word: *Bacillus*, *Streptomyces*, AHPND, RPS (%)

¹ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I

² Trường Đại học Sư phạm, Tp. Hồ Chí Minh

³ Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

⁴ Trung tâm tập huấn và Chuyên gia công nghệ nông nghiệp phía Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreatic necrosis syndrome- AHPND) gây thiệt hại nặng cho ngành nuôi tôm của Việt Nam cũng như khu vực Đông Nam Á. Bệnh ảnh hưởng trên cả tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) có cùng biểu hiện bệnh tích trên cơ quan gan tụy (Panakorn, 2012). Tác nhân gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp là vi khuẩn *V. parahaemolyticus* xâm nhập vào hệ thống mô gan tụy và gây ảnh hưởng đến chức năng gan tụy tôm (Tran và ctv., 2013). Các biện pháp thông thường được sử dụng để kiểm soát dịch bệnh như hóa chất tổng hợp và kháng sinh. Tuy nhiên, bên cạnh những tác động tích cực mang lại chúng còn có những tác động tiêu cực như hiện tượng kháng thuốc đối với các chủng vi sinh vật, ảnh hưởng sức khỏe người tiêu dùng và cũng là rào cản thương mại xuất khẩu. Trong khi đó, chế phẩm vi sinh được chứng minh có khả năng loại trừ các vi sinh vật gây bệnh thông qua cạnh tranh bám dính trong đường ruột, cạnh tranh dinh dưỡng, sản xuất các hợp chất ức chế, tăng cường hệ miễn dịch và cải thiện chất lượng nước (Sahu và ctv., 2008).

Bacillus là nhóm vi khuẩn được sử dụng phổ biến bởi các đặc tính có lợi của chúng đồng thời bởi vì giá thành thấp, dễ pha trộn, chịu được tác động nhiệt tốt trong quá trình sản xuất, dễ bảo quản, hạn sử dụng dài (Barbosa và ctv., 2005). Nghiên cứu của Nguyễn Văn Phúc và Phan Thị Phương Trang (2014) đã phân lập các hai chủng *B. subtilis* có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* gây AHPND. Ngoài ra, Võ Hồng Phượng và ctv. (2018) cũng đã phân lập vi khuẩn *Bacillus licheniformis* (B1) nồng độ ban đầu 10^5 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, 10^7 CFU/mL có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* (AHPND) nồng độ 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/mL sau thời gian chín giờ bằng phương pháp đồng nuôi cấy.

Các chủng *Streptomyces* có lợi có thể được coi là probiotic tiềm năng trong nuôi trồng thủy sản với khả năng sinh tổng hợp kháng sinh, các chất kháng khuẩn, tạo ra một số enzym ngoại bào, hỗ trợ sinh trưởng của

các vi sinh vật và đảm bảo chất lượng nước (Tan và ctv., 2016). You và ctv. (2007) cũng đã chứng minh *Streptomyces albus* có khả năng sản xuất các hợp chất ức chế và các chất chuyển hóa liên quan đến sự hình thành màng sinh học của các tác nhân gây bệnh như *V. harveyi*, *V. vulnificus*, và *V. anguillarum*. Các nhóm *Streptomyces* RL8 và BMix-StrepMix cho tỷ lệ sống trên tôm gần 95% khi cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* CAIM 170 (Bentley và ctv., 2002). Đặc tính đối kháng của các chủng vi sinh vật có lợi đối với *V. parahaemolyticus* (AHPND) trong sản phẩm probiotic nghiên cứu còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu hiệu quả kết hợp các chủng *Bacillus* và *Streptomyces* trong phòng trị AHPND quy mô phòng thí nghiệm và quy mô thử nghiệm trong ao nuôi diện tích 600-700 m² bằng phương pháp xử lý nước là cần thiết nhằm góp phần đa dạng hóa chủng giống cung cấp cho sản xuất chế phẩm vi sinh và góp phần hạn chế AHPND.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn có lợi *Bacillus licheniformis* B1, *B. subtilis* S5; chế phẩm sinh học *Streptomyces* X285; vi khuẩn gây AHPND *V. parahaemolyticus* thuộc phạm vi đề tài “Nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh đối kháng *Vibrio* spp. gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm sú và tôm thẻ chân trắng”

2. Phương pháp tăng sinh các chủng vi sinh vật trong chế phẩm sinh học *Bacillus* B1, S5 và *Streptomyces* X285

Chế phẩm *Bacillus* B1 và *Bacillus* S5 có mật độ *Bacillus* ban đầu khoảng 2×10^9 CFU/g; chế phẩm *Streptomyces* X285 mật độ ban đầu 10^8 CFU/mL trước khi sử dụng được hoạt hóa và tăng sinh theo công thức sau: bột đậu nành (2g/L), mật rỉ đường (7g/L), cao nấm men (0,5g/L), chế phẩm *Bacillus* (1ppm), chế phẩm *Streptomyces* X285 (1ppm). Hai nhóm vi sinh vật này được lên men từng mẻ trong đó sản phẩm *Bacillus* được tăng sinh thời gian 18-24 giờ; nhóm *Streptomyces* được tăng sinh thời gian 60-72 giờ sục khí liên tục trước khi xử lý nước định kỳ trong các thí nghiệm.

3. Phương pháp khảo sát tần suất sử dụng chế phẩm Bacillus kết hợp Streptomyces trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tôm thẻ khỏe trọng lượng trung bình 1,5-2 g/con được bố trí 100 cá thể vào bể composite tròn (500 lít) chứa 350 lít nước biển 15 ‰, có sục khí liên tục. Chế độ cho ăn mỗi ngày 3 lần. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Định kỳ xử

lý vi sinh và duy trì mật độ Bacillus tương ứng 10⁵ CFU/mL và Streptomyces X285 10⁴ CFU/mL trong các nghiệm thức thí nghiệm. Tất cả các nghiệm thức được gây cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm với *V. parahaemolyticus* 10⁶ CFU/mL sau khi kết thúc xử lý vi sinh một ngày ở các nghiệm thức (Bảng 1).

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm tần suất sử dụng Bacillus (B1, S5) và Streptomyces X285

Nghiệm thức	Chủng vi khuẩn sử dụng xử lý nước	Tần suất xử lý nước
NT1 (B-S-X-1)	Bacillus (B1, S5) + Streptomyces X285	1 lần/ tuần
NT2 (B-S-X-2)		2 lần/ tuần
NT3 (B-S-X-3)		3 lần/ tuần
NT4 (B-S-1)	Bacillus B1 + Bacillus S5	1 lần/tuần
NT5 (B-S-2)		2 lần/ tuần
NT6 (B-S-3)		3 lần/ tuần
NT7 (B-X-1)	Bacillus B1 + Streptomyces X285	1 lần/tuần
NT8 (B-X-2)		2 lần/ tuần
NT9 (B-X-3)		3 lần/ tuần
NT10 (S-X-1)	Bacillus S5 + Streptomyces X285	1 tuần/ lần
NT11 (S-X-2)		2 lần/ tuần
NT12 (S-X-3)		3 lần/ tuần
Đối chứng dương (ĐC)	Không sử dụng vi sinh	

4. Phương pháp thử nghiệm hiệu quả sử dụng chế phẩm Bacillus kết hợp Streptomyces mô hình ao nuôi thương phẩm 600-700 m²

Hiệu quả xử lý nước 2 lần/tuần kết hợp giữa hai chủng Bacillus (B1, S5) và Streptomyces X285 phòng AHPND trong phòng thí nghiệm được xây dựng dự thảo quy trình ao nuôi thử

nghiệm (600 - 700 m²). Tôm thẻ PL₁₀ khỏe được thả nuôi với mật độ 100-120 con/m², ao được bố trí hệ thống sục khí liên tục. Địa điểm bố trí thí nghiệm tại ấp Nopoul, xã Vĩnh Tân, thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Bố trí thử nghiệm các ao thể hiện Bảng 2.

Bảng 2. Bố trí thử nghiệm hiệu quả sử dụng Bacillus (B1, S5) và Streptomyces X285 mô hình ao nuôi thương phẩm

Ao thí nghiệm	Chủng vi sinh sử dụng	Tần suất sử dụng	Liều và cách sử dụng chế phẩm vi sinh
Ao 1 (TN1) Ao 2 (TN2)	Hỗn hợp Bacillus (B1, S5) và Streptomyces X285	2 lần/ tuần	Lên men sản phẩm trước khi xử lý ao trên bề nhựa (1 m ³). Liều dùng 1g sản phẩm/m ³
Ao 3 (ĐC1)	Sử dụng chế phẩm vi sinh thương mại (<i>Bacillus</i> sp.)	2 lần/ tuần	
Ao 4 (ĐC2)	Sử dụng chế phẩm vi sinh thương mại (<i>Bacillus</i> sp.)	1 lần/5 ngày	Xử lý trực tiếp sản phẩm liều 0,5-1 g/m ³

Ghi chú: Công thức nhân sinh khối theo mục 2.2

Trong quá trình nuôi, mật độ *Vibrio* tổng số và *V. parahaemolyticus* mẫu nước được theo dõi định kỳ 7 ngày/1 lần bằng phương pháp trải đĩa đếm khuẩn lạc trên môi trường TCBS (Thiosulphate citrate bile sucrose agar) và Chromagar vibrio. Bên cạnh đó, gen độc PirB trong nước ao nuôi được xác định sau khi mẫu nước các ao thử nghiệm được làm giàu trong môi trường dinh dưỡng nutrient broth (NB) (Han và ctv., 2015). Ngoài ra, yếu tố môi trường nhiệt độ, pH, độ mặn được theo dõi hằng ngày tại hiện trường; nitrite, tổng đạm amon ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) được phân tích theo phương pháp tiêu chuẩn (Toan, 2017).

5. 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 One Way ANOVA tại mức 5% khác biệt với phép thử Turkey thông qua phần mềm SPSS.

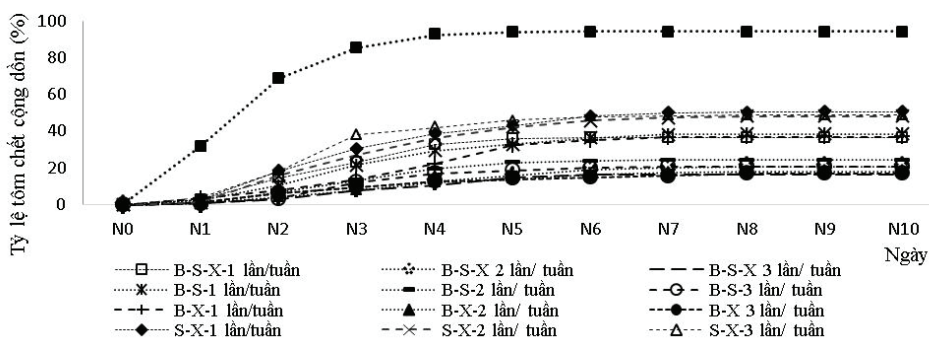
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Tần suất sử dụng chế phẩm Bacillus (B1, S5) kết hợp Streptomyces X285 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tỷ lệ tôm chết cộng dồn ở các nghiệm thức trong 10 ngày theo dõi được thể hiện ở Hình 1. Các nghiệm thức xử lý định kỳ các chủng vi sinh 2 lần/tuần và 3 lần/tuần có hiệu quả bảo vệ tôm

cao hơn khi xử lý nước 1 lần/tuần với tỷ lệ chết cộng dồn dưới 30% trong 10 ngày thử nghiệm. Kết quả tỷ lệ tôm chết cộng dồn ở các nghiệm thức cho thấy đối với nghiệm thức sử dụng cả ba chủng vi sinh có lợi Bacillus B1, Bacillus S5 và Streptomyces X285 định kỳ 3 lần/tuần có tỷ lệ chết thấp nhất, có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$) và RPS=82,33%. Tương tự, khi kết hợp Bacillus B1 và Streptomyces X285 xử lý nước định kỳ 2 lần/tuần và 3 lần/tuần cũng có hiệu quả bảo vệ với tỷ lệ bảo hộ RPS= 80,58-81,97%, theo thứ tự trên. Trong khi đó, khi xử lý các chủng vi sinh có lợi với tần suất 1 lần/tuần thì tỷ lệ chết của tôm tăng so với nhóm xử lý 2 lần/ tuần trở đi nhưng tỷ lệ chết của các nhóm xử lý vi sinh 1 lần/tuần thấp hơn so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$). Trái lại, khi kết hợp Bacillus S5 và Streptomyces X285 hiệu quả bảo vệ tôm đối với AHPND tương đối thấp, tỷ lệ chết dao động 48-51% theo tần suất xử lý nước.

Mặt khác, sau 10 ngày gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* ở các nghiệm thức cho thấy xử lý 2 lần/tuần và 3 lần/tuần không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ chết tôm ($p > 0,05$) nhưng tỷ lệ chết tôm khác biệt hoàn toàn giữa nghiệm thức xử lý 1 lần/tuần với 2 lần/tuần trở đi. Từ kết quả này cho thấy để ứng dụng hiệu quả phòng AHPND quy mô trang trại nên kết hợp Bacillus và Streptomyces và xử lý định kỳ 2 lần/tuần.



Hình 1. Tỷ lệ chết cộng dồn tôm thẻ chân trắng sau 10 ngày gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Verschuere và ctv. (2000) cho rằng probiotic đơn chủng thông thường sử dụng ít hiệu quả hơn hỗn hợp nhiều chủng. Đa chủng vi sinh vật hay đa loài trong probiotic đều tăng cường hiệu quả bảo vệ kháng lại các tác nhân truyền nhiễm gây bệnh (Kesarcodi-Watson và ctv., 2012) bởi

vi tính đa dạng trong cơ chế ức chế giữa các chủng trong probiotic giúp tăng hiệu quả sử dụng (Chapman và ctv., 2012)

Ngoài ra, liều lượng và thời gian sử dụng probiotic ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực đối với vật nuôi. Sử dụng quá liều có khả năng gây

nên ức chế miễn dịch không đặc hiệu của vật nuôi (Sakai, 1999). Mật độ probiotic 10^7 CFU/mL mang lại hiệu quả kích thích miễn dịch mạnh từ đó tăng cường các chỉ số miễn dịch tế bào (Salinas và *ctv.*, 2006). Mật độ duy trì thông thường 10^5 CFU/mL (Hai và *ctv.*, 2010). Bên cạnh đó, thời gian sử dụng probiotic nên duy trì ít nhất sáu ngày (Jöborn và *ctv.*, 1997) và nhiều hơn năm tháng (Aubin và *ctv.*, 2005) hoặc ngay cả tám tháng (Aly và *ctv.*, 2008).

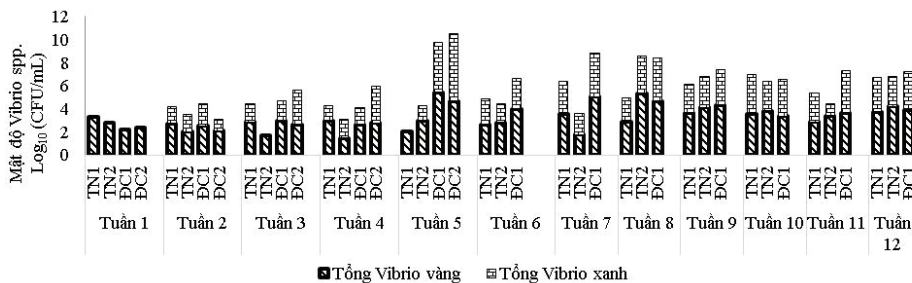
Bên cạnh đó, Pinoargote và *ctv.* (2018) thử nghiệm sản phẩm probiotic thương mại EM (Effective Microorganisms EMRO Inc., Tucson, AZ) liều cao từ 10^8 - 10^9 CFU/mL trong 7 ngày, sau đó gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*. Đồng thời, kết hợp trộn thức ăn và xử lý nước 10^6 CFU/mL vào mỗi 2 lần/ngày liên tục trong

14 ngày trước khi gây nhiễm *V. parahaemolyticus*. Kết quả cho thấy trong 48 giờ theo dõi, tôm nghiệm thức EM không chết cấp tính đến 26 giờ sau khi gây nhiễm, tỷ lệ chết chỉ đạt 26,7% sau 32 giờ. Trong khi đó, nhóm đối chứng dương bắt đầu xuất hiện tôm chết sau tám giờ gây nhiễm và đạt tỷ lệ chết 100% sau 12 giờ. Bên cạnh đó, khi sử dụng Streptomyces N8 (10^8 CFU/g thức ăn) liên tục 30 ngày trước khi gây nhiễm *V. parahaemolyticus* thì tỷ lệ sống tôm thẻ đạt 84,44 % (Garcia và *ctv.*, 2016).

2. Hiệu quả sử dụng chế phẩm Bacillus kết hợp Streptomyces mô hình ao nuôi thương phẩm

2.1 Mật độ Vibrio tổng số trong nước ao nuôi

Tổng số Vibrio ở ao TN1 trong sáu tuần đầu ở mức 3,3 \log_{10} CFU/mL, từ tuần thứ



Hình 2. Diễn biến Vibrio tổng số trong nước của các ao nuôi thử nghiệm.

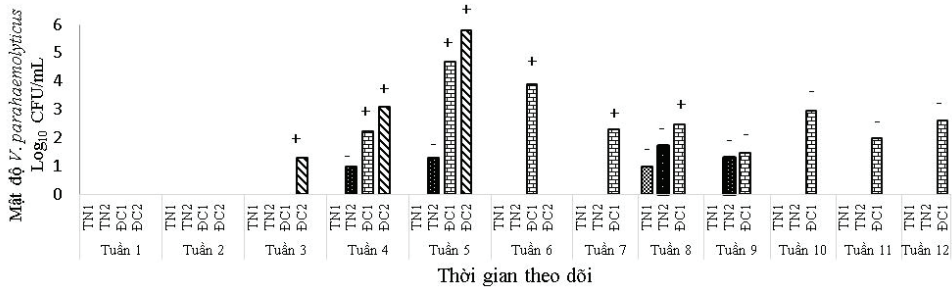
chín, 10 và 12 mật độ Vibrio trong nước tăng đáng kể từ 3,69 – 3,78 \log_{10} CFU/mL. Tương tự ở TN2, từ tuần thứ tám, chín và 12 mật độ Vibrio tăng cao và đạt mức cao nhất khoảng 5,3 \log_{10} CFU/mL. Điều này cho thấy Vibrio thường xuyên có mặt trong ao nuôi và phát triển tùy theo lượng dinh dưỡng và các điều kiện thủy lý thủy hóa trong ao.

Trong môi trường nước ao nuôi ĐC1, Vibrio tổng số luôn tồn tại ở mức khá cao suốt vụ nuôi. Trong bốn tuần đầu tiên, mật độ Vibrio tổng số ở mức 2,61 – 2,98 \log_{10} CFU/mL. Đến tuần thứ năm trở đi, mật độ của nhóm vi khuẩn này đã tăng lên gấp hai lần so với bốn tuần trước đó. Tương tự, ao ĐC2, mật độ Vibrio có xu hướng tăng theo thời gian nuôi và tăng cao hơn rất nhiều so với nhóm ao thí nghiệm. Ở tuần thứ năm, mật độ Vibrio đạt mức cao nhất 5,87 \log_{10} CFU/mL và tỷ lệ Vibrio khuẩn lạc xanh cao gấp 10 lần so với Vibrio khuẩn lạc vàng. Điều này cho thấy không có sự hiệu quả trong việc

kiểm soát nhóm Vibrio khuẩn lạc xanh trong ao nuôi ĐC2.

2.2. Mật độ Vibrio parahaemolyticus trong các ao nuôi

Các ao thử nghiệm đều phát hiện *V. parahaemolyticus*. Tuy nhiên, ao TN1 chỉ xuất hiện *V. parahaemolyticus* ở tuần thứ tám với mật độ thấp (10,0 CFU/mL) và âm tính với *V. parahaemolyticus* gây AHPND. Tương tự ở ao TN2, chỉ phát hiện ở tuần thứ tư, năm, tám và chín ở mức 1 – 1,7 \log_{10} CFU/mL và cũng âm tính với *V. parahaemolyticus* gây AHPND. Trong khi đó, mật độ *V. parahaemolyticus* ở ao ĐC2 cao hơn so với nhóm ao thử nghiệm, đạt mức cao nhất ở tuần thứ năm (5,8 \log_{10} CFU/ml) đồng thời dương tính với *V. parahaemolyticus* gây AHPND và tôm nuôi có biểu hiện bất thường như bỏ ăn chết rải rác, và thu hoạch ngày thứ 42. Tương tự, ao ĐC1, từ tuần nuôi thứ năm và sáu thì mật độ *V. parahaemolyticus* tăng cao và đạt mức 4,7 \log_{10} CFU/mL và



Ghi chú: (-): âm tính với *V. parahaemolyticus* gây AHPND; (+): dương tính với *V. parahaemolyticus* gây AHPND

Hình 3. Diễn biến *Vibrio parahaemolyticus* trong nước các ao nuôi thử nghiệm.

cũng dương tính với *V. parahaemolyticus* gây AHPND. Tại thời điểm này, ao ĐC1 được xử lý diệt khuẩn bởi glutaraldehyde (10-15%), đồng thời kết hợp xi phông thay nước hằng ngày loại bỏ tôm chết. Bên cạnh đó, thức ăn cũng được kiểm soát và cắt giảm trong thời gian này. Đến tuần thứ bảy trở đi, mật độ *V. parahaemolyticus* giảm đáng kể và duy trì trong khoảng 2,95 log₁₀ CFU/mL. Mức độ kiểm soát *Vibrio* sp. và *V. parahaemolyticus* ở ao TN1 và TN2 cao hơn ao ĐC1 và ĐC2 cho thấy hiệu quả khi kết hợp ba chủng vi sinh Bacillus (B1, S5) và Streptomyces trong xử lý nước định kỳ 2 lần/tuần trong suốt vụ nuôi tốt hơn khi so sánh với các chủng vi khuẩn thương mại khác. Kết quả nghiên cứu của Aftabuddin và ctv. (2013) cho thấy kết hợp hai chủng *Bacillus megaterium* và *Streptomyces fradiae* trong nuôi tôm sú giống giúp duy trì tổng vi khuẩn Vibrio ở mật độ thấp hơn so với nhóm không sử dụng vi sinh này. Moriarty (1998) đã nhận định rằng bổ sung *Bacillus* có thể kiểm soát được Vibrio, tăng tỷ lệ sống của tôm, hạn chế mầm bệnh do vi khuẩn Vibrio trong nước. Theo nghiên cứu của Timmerman và ctv. (2004) tác dụng đồng thời của sự kết hợp Streptomyces và Bacillus mang

lại hiệu quả hơn so với men vi sinh đơn dòng, bởi vì hoạt động sinh học đáng chú ý của nhóm Bac-Strep là khả năng sản xuất một số enzyme và kháng sinh ngoại bào.

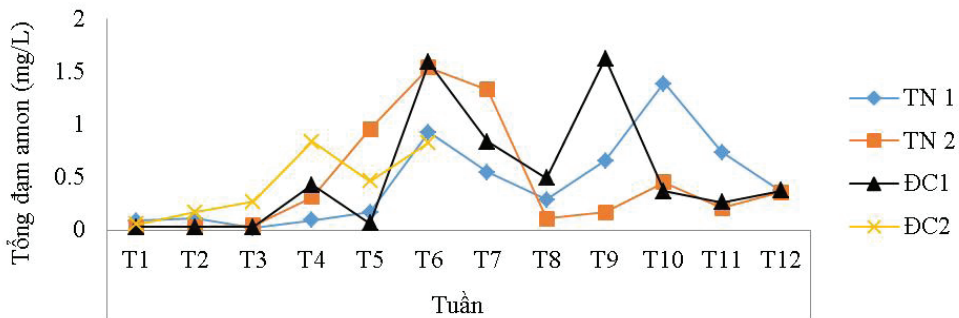
2.3. Các chỉ tiêu môi trường

Nhiệt độ, pH và độ mặn

Thời gian bố trí nuôi thử nghiệm từ tháng 02/2019 đến 06/2019, thời điểm nắng nóng kéo dài do đó nhiệt độ trong các ao nuôi thử nghiệm khá cao và dao động ngày đêm từ 28°C – 32°C. Theo Christopher (2008) giới hạn nhiệt độ cho sự sinh trưởng của tôm thẻ chân trắng từ 14,5 - 35,0°C. Trần Việt Mỹ (2009) cho rằng nhiệt độ trong khoảng 26 - 32°C không gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của tôm nuôi. Giá trị pH khá ổn định, pH sáng dao động trong khoảng 7,7-8,0, pH chiều 7,8-8,2. Chỉ số pH dao động từ 7,5 đến 8,5 nằm trong khoảng thích hợp cho tôm nuôi (Whetstone và ctv., 2002). Như vậy, theo quy chuẩn QCVN 02-19:2014/BNNPTNT thì các khoảng dao động của nhiệt độ, pH đều thích hợp cho tôm nuôi nước lợ.

Tổng đạm amon (TAN) (NH₃/NH₄⁺)

Hàm lượng TAN diễn biến khá phức tạp trong thời gian nuôi, diễn biến theo quy luật



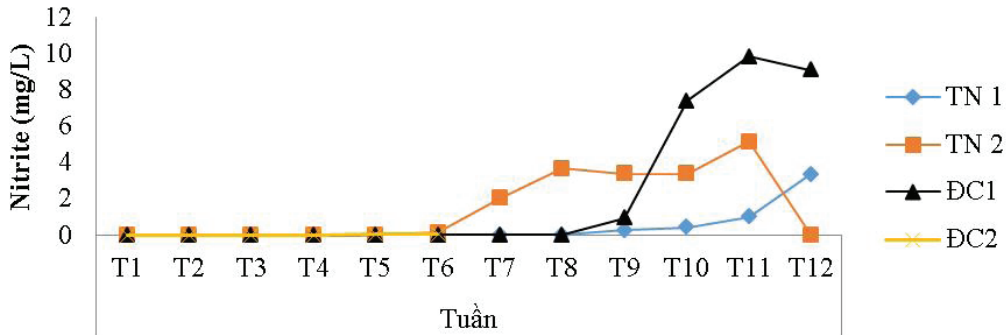
Hình 4. Diễn biến tổng đạm amon trong các ao nuôi thử nghiệm.

hình sin nhưng đều không vượt quá 2 mg/L. Các ao nuôi thử nghiệm có tổng đạm amon cao nhất sẽ có nồng độ NH₃ dao động 0,2 mg/L. Theo Boyd (1998) tổng đạm amon thích hợp cho ao nuôi thủy sản là 0,2-2 mg/L và khí NH₃

là 0,1 mg/L. Mặt khác NH₃ là khí dễ bị thoát ra ngoài môi trường dưới tác động của quạt nước và sục khí mạnh (Chanratchakool, 2003).

Hàm lượng Nitrite

Hàm lượng nitrite trong nước của các ao



Hình 5. Diễn biến nitrite trong các ao nuôi thử nghiệm.

nuôi tôm thử nghiệm ổn định trong sáu tuần đầu nuôi, đạt giá trị thấp hơn 0,01 mg/L. Tuy nhiên, từ tuần thứ bảy trở đi, giá trị NO₂⁻ có xu hướng tăng nhẹ và đạt giá trị nitrit cao nhất (5,1 mg/L) vào tuần thứ 11 đối với ao TN2, và 9,8 mg/L đối với ao ĐC1. Trong khi đó ao TN1 luôn được duy trì ở mức thấp dưới 0,07 mg/L đến tuần thứ 11 và tăng 3,3 mg/L vào tuần thứ 12. Hàm lượng NO₂⁻ ở tất cả các ao nuôi đều cao hơn mức thích hợp vào thời điểm cuối vụ nuôi, tuy nhiên tôm khá ổn định. Điều này cũng có thể được lý giải như sau: tôm được nuôi trong môi trường nước lợ có hàm lượng Ca²⁺, Cl⁻ và sục khí liên tục (oxy hòa tan trong các ao nuôi thử nghiệm dao động trên 5,0 mg/L) do đó làm giảm tính độc của NO₂⁻ (Boyd, 1998).

IV. KẾT LUẬN

Chế phẩm vi sinh bao gồm chủng *Bacillus licheniformis* (B1), chủng *B. subtilis* (S5) và chủng *Streptomyces* X285 sử dụng kết

hợp với liều lượng 1g/m³, xử lý định kỳ 2 lần/tuần có khả năng nâng cao tỷ lệ sống của tôm với tỷ lệ bảo hộ RPS trên 80% sau khi gây nhiễm *V. parahaemolyticus* trong điều kiện phòng thí nghiệm. Ngoài ra, khi ứng dụng các chủng vi khuẩn có lợi này quy mô ao nuôi thử nghiệm 600-700 m² cũng đem lại hiệu quả giám sát sự phát triển của *V. parahaemolyticus* gây AHPND. Bên cạnh đó, các yếu tố môi trường dao động trong khoảng giới hạn phát triển của tôm.

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn chương trình Công nghệ sinh học - Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn; Trung Tâm Quan Trắc và Bệnh Thủy Sản khu vực Nam Bộ (Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản 2) đã tạo điều kiện thật tốt để chúng tôi có thể thực hiện được các nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Trần Viết Mỹ, 2009. Cẩm nang nuôi tôm chân trắng thâm canh (*Penaeus vannamei*). Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn thành phố Hồ Chí Minh, Trung tâm Khuyến nông.
2. Nguyễn Văn Phúc và Phan Thị Phương Trang, 2014. Phân lập định danh và xác định các đặc tính có lợi của

chủng *Bacillus* spp. từ ao nuôi tôm ở các tỉnh Bến Tre. Tạp chí khoa học ĐHSP TPHCM, 64: 94-102.

3. Võ Hồng Phương, Võ Thị Hậu, Nguyễn Thái Hồng Ngọc, Lê Hồng Phước, Nguyễn Hoàng Tuấn, Nguyễn Hồng Lộc và Lê Thị Bích Thủy, 2018. Khảo sát đặc tính đối kháng của *Bacillus licheniformis* (B1) đối với *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh teo gan tụy cấp tính trên tôm (AHPND) trong điều kiện thí nghiệm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 54 (Số chuyên đề: Thủy Sản) (2): 91-100.

Tiếng Anh

4. Aftabuddin, S., Abul Kashem, M., Abdul Kader, M., Sikder, M. and Abdul Hakim, M., 2013. Use of *Streptomyces fradiae* and *Bacillus megaterium* as probiotics in the experimental culture of tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea, Penaeidae). Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation, 6(3): 253-267.

5. Aly, S. M., Mohamed, M. F. and John, G., 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research, 39(6): 647-656.

6. Aubin, J., Gatesoupe, F.-J., Labbé, L. and Lebrun, L., 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Research, 36(8): 758-767.

7. Barbosa, T. M., Serra, C. R., La Razione, R. M., Woodward, M. J. and Henriques, A. O., 2005. Screening for bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. Applied and environmental microbiology, 71(2): 968-978.

8. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M. and Challis, G. L., 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature, 417(6885): 141-7.

9. Boyd, C. E., 1998. Water quality in pond for aquaculture, Department of fisheries and applied aquaculture, Auburn University.

10. Chanratchakool, P., 2003. Problem in *Penaeus monodon* culture in low salinity areas. Aquaculture Aisa, 8: 54-55.

11. Chapman, C. M. C., Gibson, G. R. and Rowland, I., 2012. In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. Anaerobe, 18(4): 405-413.

12. Christopher, E. M., 2008. Evaluation of group water from the Lajas Valley for low salinity culture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. University of Puerto Rico Mayaguez Campus.

13. Garcia, M., Medina, R., Isidro Campa-Córdova, Á. and Mazón-Suástegui, J. M., 2016. Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with *Bacillus* and *Lactobacillus* in juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture International, 25(2): 927-939.

14. Hai, N. V., Buller, N. and Fotedar, R., 2010. Effect of customized probiotics on the physiological and immunological responses of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896) challenged with *Vibrio harveyi*. Journal of Applied Aquaculture, 22(4): 321-336.

15. Han, J. E., Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., White, B. L. and Lightner, D. V., 2015. qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture, 442(12-15).

16. Jöborn, A., Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L. and Kjelleberg, S., 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. Journal of Fish Diseases, 20(5): 383-392.

17. Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. and Gibson, L., 2012. Performance of single and multi-strain probiotics during hatchery production of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*. Aquaculture,

354: 56-63.

18. Moriarty, D. J. W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds, *Aquaculture*, 164(1-4): 351-358.
19. Panakorn, S., 2012. Opinion article: more on early mortality syndrome in the shrimp. *Aquaculture Asia Pacific*, 8(1): 8-10.
20. Pinoargote, G., Flores, G., Cooper, K. and Ravishankar, S., 2018. Effects on survival and bacterial community composition of the aquaculture water and gastrointestinal tract of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to probiotic treatments after an induced infection of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture Research*, 49: 3270-3288.
21. Sahu, M. K., Swarnakumar, N. S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T. and Kannan, L., 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian journal of microbiology*, 48(3): 299-308.
22. Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1): 63-92.
23. Salinas, I., Diaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrilion, M., Morinigo, M. A. and Esteban, M. A., 2006. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopathol*, 111(3-4): 279-86.
24. Tan, L. T., Chan, K. G., Lee, L. H. and Goh, B. H., 2016. *Streptomyces* bacteria as potential probiotics in aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 7: 79.
25. Timmerman, H. M., Koning, C. J., Mulder, L., Rombouts, F. M. and Beynen, A. C., 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3): 219-33.
26. Toan, T., 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition.
27. Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K. and 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.
28. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 655-71.
29. Whetstone, J. M., Treece, G., D., Browdy, C. L. and Stokes, A. D., 2002. Opportunities and constraints in marine shrimp farming. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) publication No. 2600 USDA.
30. You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L. and Zhou, S., 2007. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5): 1137-44.