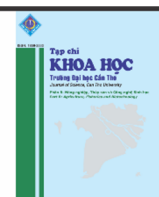




Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.132

**ẢNH HƯỞNG CỦA VI KHUẨN LACTIC BỔ SUNG VÀO THỨC ĂN
LÊN KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH TRÊN
TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)**

Nguyễn Thị Trúc Linh^{1,2}, Nguyễn Trọng Nghĩa², Đặng Thị Hoàng Oanh² và Trương Quốc Phú²

¹Khoa Nông nghiệp Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

²Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/05/2017

Ngày nhận bài sửa: 24/08/2017

Ngày duyệt đăng: 12/10/2017

Title:

Effects of lactic acid bacteria supplemented in feed on resistance to acute hepatopancreatic necrosis disease in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Từ khóa:

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, lactic acid bacteria, tôm thẻ chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus*

Keywords:

Acute hepatopancreatic necrosis disease, lactic acid bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*, whiteleg shrimp

ABSTRACT

The experiments were conducted in glass tank system, each contains 20 L of 20‰ seawater and well aerated. The study was carried out to determine the effect of LAB supplemented in feed on survival rate and the resistance to *V. parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The results showed that the survival rate of shrimp was very high from 82.23 to 92.23% in the treatment of LAB supplement and without challenged to *V. parahaemolyticus*, and not significantly different to the ĐCA treatment (87.77%). The highest survival rate was obtained in the treatment of LAB5 supplement (92.23%). Furthermore, shrimp did not show any symptoms of AHPND. In the *V. parahaemolyticus* challenged-treatments (VP), shrimp showed the typical clinical signs of AHPND. The mortality rate was highest in VP+LAB3 treatment (70.02%), followed by the ĐCD treatment (54.43%) and VP+LAB4 treatment (43.33%). By contrast, shrimp in the remaining treatments had the high survival rate (73.37% to 79.97%) and shrimp's hepatopancreas were less affected by AHPND by histopathological method.

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành trong hệ thống bể kính, chứa 20 lít nước có độ mặn 20‰ và sục khí. Thí nghiệm được thực hiện để xác định ảnh hưởng của vi khuẩn lactic bổ sung vào thức ăn lên tỷ lệ sống và khả năng kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Kết quả thí nghiệm cho thấy, tỷ lệ sống của tôm rất cao từ 82,23 đến 92,23% ở các nghiệm thức có bổ sung LAB vào thức ăn và không cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, và không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức ĐCA (87,77%). Tỷ lệ sống đạt cao nhất là ở nghiệm thức LAB5 (92,23%). Ngoài ra, tôm không có dấu hiệu bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. Ở các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (VP), tôm có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. Tôm chết nhiều nhất ở nghiệm thức VP+LAB3, tỉ lệ chết lên đến 70,02%, kế đến là nghiệm thức ĐCD (54,43%) và nghiệm thức VP+LAB4 (43,33%). Ở các nghiệm thức còn lại, tôm cũng có tỷ lệ sống khá cao (73,37% - 79,97%) và phần lớn mẫu gan tụy thu được không có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh hoại tử gan tụy cấp tính khi phân tích mô bệnh học.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Trúc Linh, Nguyễn Trọng Nghĩa, Đặng Thị Hoàng Oanh và Trương Quốc Phú, 2017. Ảnh hưởng của vi khuẩn lactic bổ sung vào thức ăn lên khả năng kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52b: 122-130.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn lactic (LAB) được sử dụng rộng rãi trong các chế phẩm sinh học cho người và vật nuôi để kích thích tiêu hóa, và phòng một số bệnh do vi khuẩn gây ra. Ngày nay, LAB đã và đang được lựa chọn để bổ sung vào thức ăn cho động vật thủy sản do có nhiều lợi ích như: cạnh tranh loại trừ các vi khuẩn gây bệnh (Garriques and Arevalo, 1995; Moriarty, 1997; Gomez-Gil *et al.*, 2000; Balcazar, 2003; Balcazar *et al.*, 2004; Vine *et al.*, 2004), cung cấp nguồn dinh dưỡng và enzyme cho sự tiêu hóa (Sakata, 1990; Garriques and Arevalo, 1995), hấp thụ trực tiếp vật chất hữu cơ hòa tan bởi vi khuẩn (Garriques and Arevalo, 1995; Moriarty, 1997) và những lợi ích khác đang được kiểm tra như: tăng cường hệ thống miễn dịch để chống lại vi khuẩn gây bệnh (Andlid *et al.*, 1995; Rengpipat *et al.*, 2000; Gullian and Rodríguez, 2002; Irianto and Austin, 2002; Balcázar, 2003; Balcázar *et al.*, 2004), chống virus (Kamei *et al.*, 1988; Girones *et al.*, 1989; Direkbusarakom *et al.*, 1998). Trong nghiên cứu về các loài vi khuẩn hữu ích, có một số dòng vi khuẩn tiết ra chất ức chế, đề kháng lại với vi khuẩn khác như *Lactobacillus* sp. kháng lại vi khuẩn *Vibrio* sp. (Trịnh Hùng Cường, 2011); *L. suntoryeus* LIII có khả năng kháng mạnh đối với vi khuẩn *Escherichia coli* và *Bacillus cereus* (Hồ Lê Huỳnh Châu và *ctv.*, 2010). Hơn nữa, trong quá trình lên men, LAB còn sinh ra acid hữu cơ, ức chế vi khuẩn gây bệnh bằng cách tác động lên tế bào chất của vi khuẩn, ảnh hưởng đến chức năng bảo vệ của màng tế bào (Fooks *et al.*, 1999; Caplice and Fitzgerald, 1999; Kuipers *et al.*, 2000).

Hiện nay, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra đã làm thiệt hại trên 1 tỷ USD/năm cho nghề nuôi tôm nước lợ (Zorrichzahra, 2015). Cho đến nay, bệnh vẫn chưa có dấu hiệu dừng lại và gây thiệt hại ngày một nghiêm trọng (Tổng cục Thủy sản, 2015). Việc sử dụng vi khuẩn có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* trộn vào thức ăn là một trong những biện pháp phòng bệnh cho tôm đang được tập trung nghiên cứu (Soccol *et al.*, 2010). Nguyễn Thị Trúc Linh (2015) sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch đã xác định được 5 chủng LAB có khả năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm với vòng kháng khuẩn từ 17,5-18,5mm. Trong nghiên cứu này, 5 chủng LAB nói trên được sử dụng để trộn vào thức ăn cho tôm trong điều kiện cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* nhằm để xác định khả năng ngăn ngừa bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên đàn tôm nuôi một cách có hiệu quả, an toàn và thân thiện với môi trường.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu thí nghiệm

Nguồn nước: nước biển có độ mặn khoảng 72-85‰ chuyển về từ Vĩnh Châu – Sóc Trăng được lọc qua túi lọc để loại bỏ chất cặn, sau đó, nước được xử lý bằng chlorine, nồng độ 20-30 mg/L và duy trì sục khí mạnh, liên tục (24 giờ) rồi tiến hành kiểm tra và trung hòa hàm lượng Cl tự do bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ theo tỉ lệ 7:1 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$:Cl). Sau khi được xử lý, nước biển được pha loãng với nước ngọt để có độ mặn 20‰.

Bể thí nghiệm: hệ thống bể thí nghiệm là bể kính có thể tích 30 L, bể thí nghiệm được rửa bằng nước sạch sau đó khử trùng với chlorine 30 mg/L và phơi nắng khoảng 5 giờ trước khi sử dụng.

Nguồn tôm thí nghiệm: tôm thẻ chân trắng giai đoạn PL10 được ương trong hệ thống tuần hoàn tại Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ cho đến kích cỡ trung bình khoảng 1g/con và dùng để bố trí thí nghiệm. Trước khi bố trí, tôm được kiểm tra bằng phương pháp PCR nhằm xác định âm tính với WSSV (OIE, 2006) và *V. parahaemolyticus* (Sirikharin *et al.*, 2014) với đoạn mã đặc hiệu AP3. Sau khi bố trí vào các bể thí nghiệm, tôm được thuần dưỡng 3 ngày cho quen với điều kiện môi trường trong bể rồi mới bắt đầu thí nghiệm.

Nguồn vi khuẩn *V. parahaemolyticus*: chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính sử dụng trong thí nghiệm là chủng được lưu trữ tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ (Nguyễn Trọng Nghĩa và *ctv.*, 2015) ở điều kiện -80°C. Chủng vi khuẩn này được phục hồi trong môi trường nutrient broth (NB, Merck) có bổ sung 1,5% NaCl (NB⁺), sau đó ủ ở 28°C trong 18 giờ. Ghi nhận màu sắc và hình dạng khuẩn lạc, nhuộm Gram để kiểm tra tính thuần của vi khuẩn. Khuẩn lạc vi khuẩn thuần được nuôi tăng sinh trong môi trường NB⁺ ở 28°C trong 18 – 24 giờ sau đó xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm.

Phục hồi, nuôi tăng sinh vi khuẩn lactic và cách chuẩn bị thức ăn: Năm chủng LAB (T3.1, RP5.4.1, T4.2, RP5.5.1, và RP6.5) đã xác định có khả năng kháng mạnh nhất với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được sử dụng cho thí nghiệm. Trong đó, chủng T3.1 được phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng, RP6.5 được phân lập từ ruột cá rô phi trong ao nuôi tôm thuộc huyện Thạnh Phú, tỉnh Bến Tre; các chủng RP4.5.1 và RP5.4.2 được phân lập từ ruột cá rô phi. Chủng T4.2 được phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng tại các ao nuôi tôm thâm

canh tại tỉnh Trà Vinh. Các chủng LAB được phục hồi trên môi trường de Man Rogosa Sharpe (MRS, Merck) agar có bổ sung 1,5% NaCl, nhuộm Gram để xác định tính thuần sau đó nuôi sinh khối trong môi trường MRS broth có bổ sung 1,5% NaCl trong 48 giờ rồi ly tâm với tốc độ 7000 vòng trong 5 phút, rửa lại 3 lần bằng nước muối sinh lý đã tiệt trùng, và pha loãng bằng nước muối sinh lý đến khi đạt mật độ 10^{10} CFU/mL, 10 mL của từng chủng LAB lần lượt được trộn đều vào 100g thức ăn và áo bằng dầu mực bên ngoài. Thức ăn được cho vào túi ni lon, dán nhãn bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 12 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần (36 lô thí nghiệm). Các nghiệm thức thí nghiệm gồm:

ĐCA (đối chứng âm): Cho tôm ăn thức ăn không bổ sung LAB và không gây cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

LAB1: Cho tôm ăn thức ăn có bổ sung LAB, chủng T3.1 và không gây cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

LAB2: như LAB1 nhưng bổ sung chủng RP5.4.1.

LAB3: như LAB1 nhưng bổ sung chủng T4.2.

LAB4: như LAB1 nhưng bổ sung chủng RP5.5.1.

LAB5: như LAB1 nhưng bổ sung chủng RP6.5.

ĐCD (đối chứng dương): Cho tôm ăn thức ăn không bổ sung LAB và gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

VP+LAB1: Cho tôm ăn thức ăn có bổ sung LAB, chủng T3.1 và gây cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

VP+LAB2: như VP+LAB1 nhưng bổ sung chủng RP5.4.1

VP+LAB3: như VP+LAB1 nhưng bổ sung chủng T4.2.

VP+LAB4: như VP+LAB1 nhưng bổ sung chủng RP5.5.1.

VP+LAB5: như VP+LAB1 nhưng bổ sung chủng RP6.5.

Thí nghiệm được tiến hành trên bể kính chứa 20L nước có độ mặn 20‰, sục khí liên tục trong thời gian thí nghiệm. Mỗi bể thí nghiệm bố trí 30 con tôm khỏe với 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức thí nghiệm, kích cỡ trung bình 1g/con. Ở nghiệm thức ĐCA và ĐCD, tôm được cho ăn bằng thức ăn viên CP chứa 40% đạm. Ở các nghiệm thức còn lại, tôm được cho ăn thức ăn cùng loại

nhưng có bổ sung các chủng LAB. Tôm được cho ăn 3 lần mỗi ngày vào lúc 7, 13, và 17 giờ, cho ăn theo nhu cầu. Bảy ngày sau khi được bổ sung LAB ở các nghiệm thức thí nghiệm bao gồm nghiệm thức 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, và 12, tôm được gây cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, sau đó thí nghiệm được tiếp tục theo dõi trong thời gian là 14 ngày. Sau khi cảm nhiễm 3 ngày, nước trong các bể thí nghiệm được thay 30% và các ngày tiếp theo nước cũng được thay 30% mỗi ngày.

Phương pháp cảm nhiễm được thực hiện theo phương pháp Loc Tran *et al* (2013). Tôm được ngâm trong dung dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mật độ 2×10^7 CFU/mL trong 15 phút sau đó vớt và bổ trí vào bể thí nghiệm đã được bổ sung vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với mật độ vi khuẩn của nước trong bể ở 10^6 CFU/mL. Đối với nghiệm thức đối chứng âm tiến hành ngâm tôm trong môi trường TSB (có bổ sung 1,5% NaCl) tiệt trùng và cho vào bể không bổ sung vi khuẩn.

Các chỉ tiêu theo dõi

Mật số vi khuẩn lactic trong ruột tôm được xác định dựa trên phương pháp đếm trên đĩa thạch (Hadi *et al.*, 2009). Mẫu ruột tôm được lấy trong điều kiện vô trùng, cân xác định khối lượng và nghiền trong dung dịch nước muối sinh lý. Sau đó, mẫu ruột tôm nghiền tiếp tục pha loãng ở các nồng độ khác nhau và trải lên đĩa môi trường MRS có bổ sung 1,5% NaCl, ủ đĩa ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ. Số khuẩn lạc phát triển trên đĩa thạch được đếm và xác định mật số vi khuẩn bằng công thức. Mật số vi khuẩn (CFU/g) = [(số khuẩn lạc x độ pha loãng)/V (mẫu)]/m. Trong đó: V (mẫu) là thể tích dung dịch mẫu được nhỏ trên môi trường MRS, m là khối lượng của ruột tôm. Tần suất thu mẫu bao gồm lần thu mẫu thứ 1 sau khi cho ăn vi khuẩn lactic 7 ngày (trước khi cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*), bốn lần thu mẫu tiếp theo (sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*) với nhịp thu mẫu 3 ngày/lần và thu mẫu ngẫu nhiên 3 con/bể.

Tỷ lệ sống của tôm: Tỷ lệ sống được xác định sau 14 ngày cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Tỷ lệ sống (%) được tính bằng công thức (TLS%) = (số tôm thu / số tôm thả) * 100%.

Dấu hiệu bệnh lý và khả năng kháng bệnh ở tôm: Sau khi cảm nhiễm, phát hiện tôm có dấu hiệu bệnh lý như lơ đờ, bỏ ăn, màu sắc nhợt nhạt, tiến hành thu mẫu, cố định và phân tích mô bệnh học. Ngoài ra, mẫu được thu định kỳ sau 3 ngày cảm nhiễm và khi kết thúc thí nghiệm bằng cách thu ngẫu nhiên 3 con tôm mỗi bể để tiến hành phân

tích mô bệnh học, đồng thời theo dõi và ghi nhận các dấu hiệu bệnh lý, thời gian tôm chết.

Phương pháp phân tích mô bệnh học: mẫu gan tụy của tôm thí nghiệm được thu khi tôm có dấu hiệu lơ đờ, bỏ ăn, ruột rỗng sau 3 ngày cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*. Ngoài ra, mẫu còn được thu (3 con/bể) khi kết thúc thí nghiệm. Mẫu mô được cố định trong dung dịch Davidson's AFA (theo tỉ lệ 1 phần cơ/10 phần dung dịch Davidson's) khoảng 48 giờ sau đó chuyển sang cồn 70° (Lightner, 1996). Sau khi cố định, mẫu tôm được cắt tia định hướng. Trước khi tiến hành đúc khối mẫu được khử nước lần lượt qua các dung dịch 70%, 80%, 95%, 100% ethyl alcohol và xylen. Sau đó mẫu được cắt ra thành từng băng dài, cho vào nước ở nhiệt độ 45-50°C làm cho parafin căng ra và dán lên lam. Tiêu bản sau đó được nhuộm với thuốc nhuộm Haematoxylin và Eosin (H&E), quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi ở các vật kính 10X, 40X và 100X.

3 PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS 22.0. Số liệu sẽ được tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn bằng phần mềm Excel, so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức theo phương pháp phân tích ANOVA một nhân tố và 2 nhân tố với phép thử Duncan thông qua phần mềm SPSS 22.0 ở mức ý nghĩa ($p < 0,05$).

4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Mật số LAB trong ruột tôm thẻ thí nghiệm

Ở các nghiệm thức không bổ sung LAB vào thức ăn (ĐCA và ĐCD) thì không có sự tồn tại

LAB trong ruột tôm thẻ thí nghiệm. Ngược lại, các nghiệm thức có bổ sung LAB vào thức ăn nhưng không có cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* thì có sự hiện diện LAB trong ruột tôm thẻ với mật số cao nhất là 95×10^5 CFU/g ở nghiệm thức bổ sung LAB2 và thấp nhất là $0,17 \times 10^5$ CFU/g ở nghiệm thức bổ sung chủng LAB3. Nhìn chung, mật số LAB trong ruột tôm thẻ có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê lẫn nhau giữa các lần thu mẫu trong cùng một nghiệm thức và cũng có sự khác biệt có ý nghĩa lẫn nhau của các nghiệm thức trong cùng 1 lần thu mẫu. Mật số LAB có xu hướng tăng cao ở lần thu mẫu từ thứ 2 trở đi, cao nhất là ở nghiệm thức LAB2 với mật số là 95×10^5 CFU/g, kế đến là nghiệm thức LAB4: 73×10^5 CFU/g ở lần thu mẫu thứ 3. Nghiệm thức LAB1 và LAB5 thì mật số LAB đạt cao nhất ở những lần thu mẫu cuối lần lượt là (9,3 và $8,8 \times 10^5$ CFU/mL). Chỉ riêng ở nghiệm thức LAB3, mật số đạt cao nhất ở lần thu mẫu thứ 3 (11×10^5 CFU/g) và thấp nhất ở lần thu mẫu cuối cùng ($0,17 \times 10^5$ CFU/g).

Các nghiệm thức có cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và bổ sung LAB vào thức ăn thì mật số LAB cũng tồn tại trong ruột tôm và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê lẫn nhau qua các kỳ thu mẫu. Đối với nghiệm thức VP+LAB3, mật số LAB trong ruột tôm giảm mạnh và tôm đã chết hoàn toàn trong những lần thu mẫu cuối. Ở nghiệm thức VP+LAB1, mật số LAB trong ruột tôm thẻ cao ở lần thu mẫu thứ 1, 2, và thứ 4. Các lần thu mẫu còn lại có khuynh hướng giảm nhưng mật số LAB trong ruột tôm vẫn duy trì ở mức khá cao (Bảng 1).

Bảng 1: Kết quả phân tích mật độ vi khuẩn lactic trong ruột tôm thẻ (10^5 CFU/g)

NT	Lần1 (CFU/g)	Lần2 (CFU/g)	Lần3 (CFU/g)	Lần4 (CFU/g)	Lần5 (CFU/g)
ĐCA	0 ^{aF}	0 ^{aI}	0 ^{aI}	0 ^{aH}	0 ^{aI}
ĐCD	0 ^{aF}	0 ^{aI}	0 ^{aI}	0 ^{aH}	0 ^{aI}
LAB1 (T3.1)	3,9 ± 0,64 ^{cG}	2,4 ± 0,53 ^{dF}	8 ± 1,6 ^{bD}	9,3 ± 0,38 ^{aB}	0,9 ± 0,067 ^{aF}
LAB2 (RP5.4.1)	4,3 ± 0,68 ^{dG}	95 ± 0,5 ^{aA}	10 ± 1,6 ^{cC}	36 ± 13 ^{bA}	4,2 ± 1,1 ^{dB}
LAB3 (T4.2)	5,9 ± 0,81 ^{bE}	0,9 ± 0,23 ^{dH}	11 ± 1,1 ^{aB}	3,1 ± 1,1 ^{cG}	0,17 ± 0,036 ^{dH}
LAB4 (RP5.5.1)	22 ± 3,4 ^{bA}	1,6 ± 0,2 ^{cG}	73 ± 16 ^{aA}	9,6 ± 0,35 ^{bB}	1,9 ± 0,72 ^{cE}
LAB5 (RP6.5)	6,6 ± 0,2 ^{bD}	3,9 ± 0,8 ^{dE}	3,3 ± 0,83 ^{eF}	4,8 ± 0,25 ^{eE}	8,8 ± 1,1 ^{aA}
VP+LAB1	9,6 ± 0,47 ^{aB}	8,4 ± 1,5 ^{bC}	1,3 ± 0,15 ^{dH}	6,9 ± 1,3 ^{cC}	0,77 ± 0,15 ^{cG}
VP+LAB2	0,84 ± 0,08 ^{eI}	4,6 ± 0,85 ^{bD}	2,2 ± 0,53 ^{dGH}	5,5 ± 0,96 ^{aD}	3,1 ± 0,9 ^{cD}
VP+LAB3	1,7 ± 1,6 ^{aH}	0,67 ± 0,12 ^{bH}	0,093 ± 0,015 ^{eI}	Chết 100%	Chết 100%
VP+LAB4	8,9 ± 1,3 ^{bC}	9,8 ± 7,5 ^{aB}	4,1 ± 1,3 ^{dE}	4,6 ± 1,4 ^{cE}	0,14 ± 0,03 ^{dH}
VP+LAB5	5,2 ± 1,4 ^{bF}	9,8 ± 7,5 ^{aB}	2,5 ± 1 ^{dFG}	3,8 ± 4,2 ^{cF}	3,8 ± 2,1 ^{cC}

Ghi chú: a, b, c, d, e, f, g : các số liệu trong cùng một hàng có chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. A, B, C, D, E, F, G: các số liệu trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê

Đối với các nghiệm thức còn lại (VP+LAB2, VP+LAB4, và VP+LAB5), mật số LAB vẫn tồn tại trong ruột tôm thẻ nhưng có xu hướng giảm nhẹ

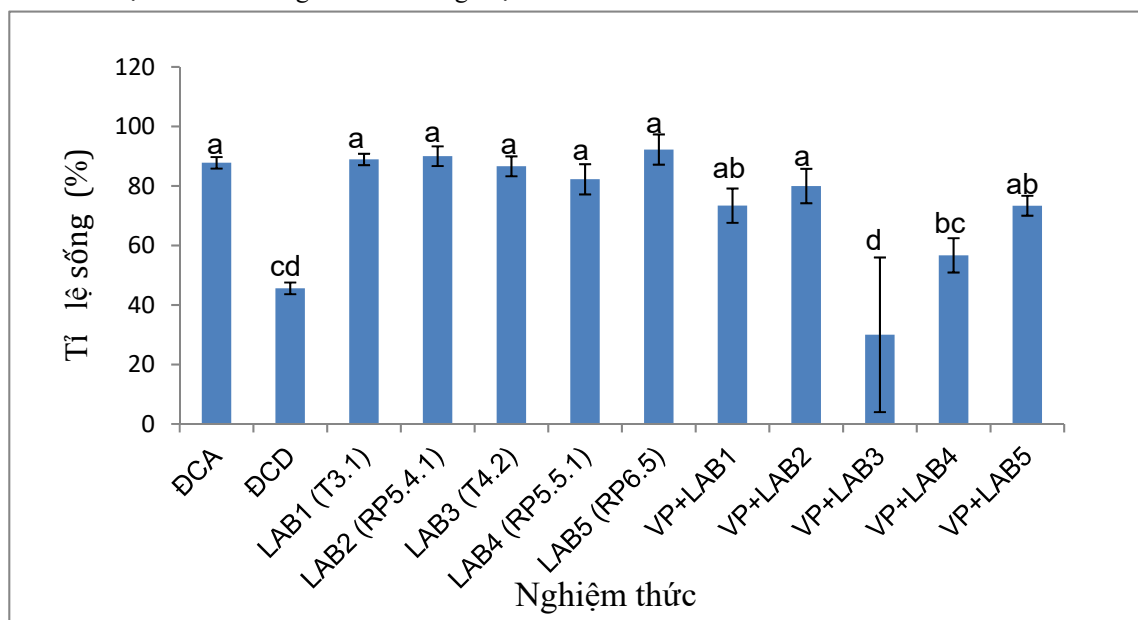
vào cuối thí nghiệm. Điều này được giải thích là khi cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, vi khuẩn thâm nhập vào đường tiêu hóa (Lightner,

2013), vì thế khi vi khuẩn tấn công vào đường ruột sẽ cạnh tranh với LAB, làm cho mật số LAB có khuynh hướng giảm đi. Tuy nhiên, chúng vẫn tồn tại và phát triển trong hệ thống tiêu hóa của đối tượng thí nghiệm. Ngoài ra, khả năng kháng khuẩn của LAB còn phụ thuộc vào sự phát triển và khả năng bám vào đường ruột của vật chủ (Vázquez *et al.*, 2005), vì thế ở các chủng LAB khác nhau, sẽ có khả năng bám vào đường ruột của vật chủ khác nhau và khả năng kháng khuẩn cũng khác nhau. Fuller (1989) đã đưa ra kết quả nghiên cứu: LAB có khả năng cạnh tranh vị trí bám dính ở niêm mạc ruột và kích thích hệ thống miễn dịch ruột. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Vázquez *et al.* (2005) cho thấy *Lactobacillus* mang lại nhiều lợi ích cho vật nuôi bởi chúng có khả năng bám vào thành tế bào, tăng mật số của vi khuẩn có lợi cho vật chủ, ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh và cân bằng vi sinh đường ruột. Vì

vậy, một số chủng LAB thí nghiệm phát triển tốt trong đường ruột của tôm kể cả khi có sự cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Tóm lại, LAB đóng vai trò rất quan trọng trong việc phòng bệnh trên động vật thủy sản. Hầu hết các chủng LAB thí nghiệm vẫn tồn tại và phát triển tốt trong ruột tôm thể khi trộn LAB vào thức ăn và có cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*. Chỉ riêng nghiệm thức VP+LAB3, khả năng bám dính vào đường ruột vật chủ của vi khuẩn kém nên khả năng kháng với *V. parahaemolyticus* cũng thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại.

4.2 Ảnh hưởng của LAB lên tỷ lệ sống của tôm thẻ thí nghiệm

Khi bổ sung các chủng LAB vào thức ăn, tỉ lệ sống của tôm thẻ có cải thiện đáng kể. Kết quả này được thể hiện qua Hình 1.



Hình 1: Tỷ lệ sống của tôm thẻ được cho ăn thức ăn có bổ sung LAB

Ghi chú: a, b, c, d : các số liệu biểu thị trên cột có chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê

Số liệu ở Hình 1 cho thấy tôm có tỉ lệ sống cao nhất ở nghiệm thức bổ sung LAB5 ($92,23 \pm 5,08\%$), kế đến là nghiệm thức LAB2 ($90 \pm 3,3\%$), thấp nhất là nghiệm thức VP+LAB3 ($29,97 \pm 26\%$) và nghiệm thức đối chứng dương ($45,57 \pm 1,96\%$). Kết quả thí nghiệm còn chỉ ra rằng khi trộn LAB vào thức ăn trong điều kiện không cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, tôm thẻ có tỷ lệ sống khá cao và không có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm, cụ thể là ở nghiệm thức cho ăn LAB (LAB1, LAB2, LAB3, LAB4, LAB5), tỷ lệ sống lần lượt là $88,9 \pm 1,91\%$; $90 \pm 3,3\%$; $86,6 \pm 3,35\%$; $82,23 \pm 5,08\%$; và $92,23 \pm 5,08\%$. Các nghiệm thức

này khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm ($87,77 \pm 1,93\%$). Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Aly (2008), *Lactobacillus* có khả năng làm tăng tỉ lệ sống của động vật thủy sản khi được bổ sung vào thức ăn.

Đối với các nghiệm thức có cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* thì tỉ lệ sống của tôm trong nghiệm thức VP+LAB1, VP+LAB2 và VP+LAB5 tương đối cao và khác biệt không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức với nhau (lần lượt là $73,37 \pm 5,77\%$; $79,97 \pm 5,77\%$; và $73,33 \pm 3,35\%$) với nghiệm thức đối chứng âm nhưng lại khác biệt có

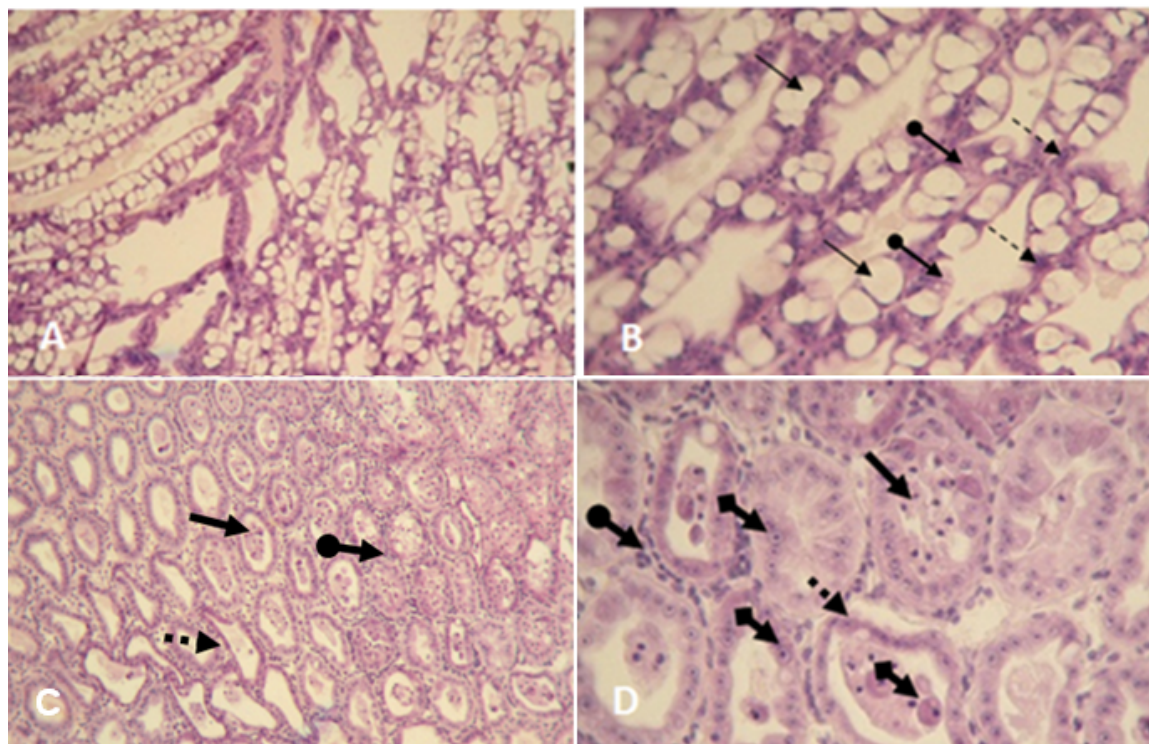
ý nghĩa và rất có ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng dương ($45,57 \pm 1,96\%$). Tóm lại, trong các nghiệm thức VP+LAB1; VP+LAB2 và VP+LAB5, tỷ lệ sống của tôm có cải thiện hơn so với nghiệm thức đối chứng dương. Điều này cũng tương đồng với nghiên cứu của Scharifuzzaman *et al.* (2011) khi bổ sung vi sinh vật có lợi vào đường ruột sẽ mang lại hiệu quả về mặt dinh dưỡng, tăng đáp ứng miễn dịch và khả năng đề kháng bệnh của vật nuôi. Tương tự, các nghiên cứu của Nogami and Maeda (1992) và Nogami *et al.* (1997) (trích dẫn bởi Tateo, 2008) cho biết khi bổ sung LAB vào thức ăn cũng giúp tăng tỷ lệ sống của giáp xác cũng như cải thiện sức khỏe và tăng tỷ lệ sống của cá tằm (*Sparus aurata*) và cá hồi. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với với nghiên cứu của Natesan *et al.* (2012), khi cho tôm sú ăn vi khuẩn *Lactobacillus* trong điều kiện có cảm nhiễm vi khuẩn *V. alginolyticus*, tỷ lệ sống cũng được cải thiện từ 20% lên đến 87% trong 10 ngày cảm nhiễm.

Ngoài ra, các nghiệm thức VP+LAB3 và VP+LAB4 có tỷ lệ sống thấp hơn các nghiệm thức gây cảm nhiễm vi khuẩn. Hơn thế nữa, mật số LAB trong ruột tôm ở 2 nghiệm thức này có khuynh hướng giảm mạnh qua các kỳ thu mẫu. Kết quả này cho thấy có mối tương quan mật thiết giữa mật độ vi khuẩn lactic trong ruột và tỷ lệ sống của tôm. Điều này có thể là do mật số LAB trong ruột tôm càng cao và khả năng bám dính vào ruột tôm càng tốt thì khả năng kháng bệnh sẽ tốt hơn (Vazquez *et al.*, 2005). Trong khi đó, ở nghiệm thức VP+LAB1, VP+LAB2, và VP+LAB5 thì mật số vi khuẩn trong ruột tôm mặc dù có sự dao động nhưng LAB trong ruột tôm vẫn tồn tại ở mật số khá cao lớn hơn 10^5 CFU/mL. Thêm vào đó, tỷ lệ sống ở các nghiệm thức này cũng rất cao và không khác

biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng âm. Tóm lại, khi bổ sung chủng LAB1, LAB2 và LAB5 vào thức ăn sẽ làm mật số LAB trong ruột tồn tại ở mật số cao và cũng có khả năng làm tăng tỷ lệ sống của tôm trong môi trường có sự hiện diện của vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính.

4.3 Kết quả phân tích mô bệnh học

Kết quả phân tích mô học trên các mẫu tôm thí nghiệm cho thấy ở các mẫu tôm không cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, vùng gan tụy tôm bình thường với cấu trúc hình sao của ống gan tụy và sự hiện diện của các loại tế bào B, R, và F (Hình 2A, B). Trong khi đó, một số nghiệm thức có cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có sự biến đổi vùng gan tụy với mức độ ảnh hưởng tùy thuộc theo từng nghiệm thức. Ở nghiệm thức đối chứng dương gan tụy tôm biểu hiện một số biến đổi đặc trưng trên vùng gan tụy của các mẫu tôm này tương tự mô tả của Lightner *et al.*, (2012) trên tôm bệnh hoại tử gan tụy cấp tính như cấu trúc mô gan tụy bị biến đổi, ống gan tụy không có tế bào B, F và R và một số tế bào của ống gan tụy có nhân to khác thường, các tế bào gan thoái hóa và rơi vào lòng ống, xuất hiện melanin hóa ở các vùng hoại tử (Hình 2C, D). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở nghiệm thức VP+LAB3 và VP+LAB4. Trong khi đó, hiệu quả của LAB lên bệnh hoại tử gan tụy trên của các chủng LAB được thể hiện thông qua phân tích mô bệnh học trên một số mẫu thu được ở nghiệm thức VP+LAB1, VP+LAB2 và VP+LAB5. Các biến đổi trên gan tụy của mẫu ở các nghiệm thức này cho thấy đa số các mẫu gan tụy đều có dấu hiệu bình thường như tôm ở nghiệm thức đối chứng âm.



Hình 2: Mô bệnh học tôm thí nghiệm

A, B: Mô gan tụy tôm khỏe (20X, 40X)

→ Tế bào B, ●→ Tế bào R, -→ Tế bào F

C, D: Mô gan tụy tôm bị nhiễm *Vibrio parahaemolyticus* (20X, 40X)

●→ Tế bào máu tập trung xung quanh ống gan tụy

▪→ Ống gan tụy teo, mất các tế bào B, R, F

→ Tế bào thoái hóa rơi vào lòng ống

◆→ Nhân tế bào trương to bất thường

Điều này cho thấy các chủng LAB1, LAB2 và LAB5 có khả năng làm hạn chế ảnh hưởng của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm.

5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1 Kết luận

Chủng LAB1, LAB2 và LAB5 phát triển và duy trì tốt trong đường ruột của tôm thẻ đồng thời có thể sử dụng trong phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm.

5.2 Đề xuất

Thử nghiệm xác định khả năng kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính của các chủng LAB1, LAB2, và LAB5 trong các ao nuôi tôm thẻ thâm canh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aly E. Abo-Amer, 2008. Characterization of a Bacteriocin-Like inhibitory substance produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from

Egyptian home-made Yogurt. ScienceAsia, 33: pp. 313 - 319.

Andlid, T., Vazquez-Juarez, R., Gustafsson, L., 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). Microb. Ecol. 30(3), 321-334.

Balca'zar J. L. de Blas I. Ruiz-Zarzuela I. Vendrell D. and Muzquiz, J.L., 2004. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. J. Aquacult. Trop. 19, 239-242.

Balca'zar J. L., 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.

Caplice, E. and Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International journal of food microbiology, 50(1): 131-149.

Direkbusarakom, S., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ruangpan, L., Danayadol, Y., 1998. *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. J. Mar. Biotechnol. 6, 266-267.

- Fooks, L.J., R. Fuller, G.R. Gibson, 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiol. International dairy journal. 9(1):53-61.
- Fuller, R (1989). Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol, 66, pp. 65-78.
- Garriques, D., Arevalo, G., 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Ed.). Swimming Though Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 53-59.
- Girones, R., Jofre, J.T., Bosch, A. 1989. Isolation of marine bacteria with antiviral properties. Canadian Journal of Microbiology. 35(11), 1015-1021.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191, 259-270.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Velasco-Blanco, G., 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. Aquaculture 211(1-4), 43-48.
- Gullian, M., Rodri'guez, J., 2002. Immunostimulant qualities of probiotic bacteria. Global Aquacult. Advocate 5, 52-54.
- Hadi Zokaei Far, Che Roos B. Saad, Hassan Mohd Daud, Sharr Azni Harmin, Shahram
- Shakibazadeh., 2009. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). African Journal of Biotechnology Vol. 8 (14), pp. 3369-3376.
- Hồ Lê Quỳnh Châu, Hồ Trung Thông và Nguyễn Thị Khánh Quỳnh, 2010. Đánh giá khả năng bám dính và kháng khuẩn ở mức độ in vitro của một số chủng vi sinh vật có tiềm năng sử dụng làm probiotics. Tạp chí Khoa học, Đại học Huế, 57: tr. 5 - 13.
- <https://tongcucthuysan.gov.vn/tang-cuong-kiem-soat-dich-benh-tren-nuoi-tom-nuoc-lo>. Ngày truy cập 8/7/2017.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 25, 333-342.
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Kimura, T., 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. Microbiology and Immunology. 32, 67-73.
- Kuipers, O.P., G. Buist, J. Kok, 2000. Current strategies for improving food bacteria. Res. Microbiol. 151, 815-822.
- Lightner, D.V., R. M. Redman, C. R. Pantoja, ph.D., B. L. Noble, Loc Tran, 2012. Early Mortality Syndrome Affects Shrimp in Asia. Global Aquaculture Advocate, January/February 2012:40.
- Loc Tran, L. Nunan, R. M. Redman, L. L. Mohnney, C. R. Pantoja, K. Fitzsimmons, D. V. Lightner, 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Diseases of aquatic organisms. 105: 45-55.
- Moriarty D., 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 151: 333-349.
- Natesan Sivakumar, Muthuraman Sundararaman and Gopal Selvakumar, 2012. Probiotic effect of *Lactobacillus acidophilus* against Vibriosis in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). African journal of Biotechnology. Vol. 1191. PP. 15811-15818.
- Nguyễn Thị Trúc Linh, 2015. Nghiên cứu phân lập và định danh các dòng vi khuẩn lactic có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) trên tôm biển. Đề tài cấp Trường, Trường Đại học Trà vinh.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E.M., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology: 15, 443-452.
- OIE, 2006. Manual of diagnostic test for aquatic animal, 2006. White spot disease. www.oie.int/eng/normes/finnual.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture 191, 271-288.
- Sakata, T., 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish. In: Lesel, R. (Ed.), Microbiology in Poecilotherms. Elsevier, Amsterdam, pp. 171-176.
- Scharifuzzaman, S.M., Abbass, A., Tinsley, J.W., Austin, B., 2011. Subcellular components of probiotics *Kocuria* SM1 and *rhodococcus* SM2 induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Vibrio anguillarum*. Fish and Shellfish Immunology: 30, 347-353.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Flegel, T.W., Mavichak, R., Proespraiwong, P., 2014. A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA). (http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030).
- Soccol C.R, L.P.S Vandenberghe, M.R Spier, A.B.P Medeiros, C.T Yamaguishi, J.D Lindner, A. Pandey and V. Thomaz, 2010. The Potential of

- Probiotics, Food Technol. Biotechnol. 48 (4) 413–434.
- Tateo Yamanaka, 2008. Chemolithoautotrophic Bacteria: Biochemistry and Environmental Biology. Springer Science & Business Media, p:70-71.
- Tổng cục Thủy sản, 2015. Báo cáo tổng hợp quy hoạch nuôi tôm nước lợ vùng Đồng bằng Sông Cửu Long đến năm 2020, tầm nhìn 2030. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Viện Kinh tế và Quy hoạch Thủy sản.
<https://www.fishnet.gov.vn/Portals/0/BAO%20CAO%20TOM%20NUOC%20LO.pdf>. Ngày truy cập 23/9/2017.
- Tran L, L Nunan, R. M Redman, L. L Mohney, C. R Pantoja, K Fitzsimmons, D. V Lightner, 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis Aquat Org 105:45-55.
- Trịnh Hùng Cường, 2011. Phân lập vi khuẩn *Lactobacillus* sp. trên tôm sú nuôi công nghiệp có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* sp. Luận văn Cao học. Đại học Cần Thơ.
- Vázquez, J. A., M. P. González and M. A. Murado. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture, 245: pp. 149 – 161.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2004. In-vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. FEMS Microbiol. Lett. 231, 145–152.
- Zorriehzahra M.J. and R. Banaederakhshan, 2015. Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. Advances in Animal and Veterinary Sciences. (3): 64 – 72.