

NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN VÀ KHẢ NĂNG BẢO VỆ ẤU TRÙNG TÔM SÚ CỦA MỘT SỐ CHỦNG *BACILLUS* PHÂN LẬP TỪ TRÙN QUẾ TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Dương Nhật Linh¹

Nguyễn Văn Minh¹

Đỗ Bảo Ngọc¹

Đan Duy Pháp¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu tính an toàn và khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú của một số chủng *Bacillus* chống lại *Vibrio* gây bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Phương pháp và kết quả: Ở thử nghiệm an toàn các chủng *Bacillus* spp. mật độ 10^6 CFU/ml được bổ sung vào hộp thí nghiệm, kết quả thu được 10 chủng (T9, F10, F2, F13, F22, F28, F11, F27, F33, F34) an toàn đối với ấu trùng tôm sú. Các chủng này được tiếp tục tiến hành thử nghiệm khả năng bảo vệ ấu trùng tôm, ấu trùng tôm được xử lý trước với các chủng *Bacillus* spp. mật độ 10^6 CFU/ml trong 6 giờ, sau đó gây nhiễm bởi *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*). Kết quả thu được 6 chủng (T9, F10, F2, F13, F22, F11) có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú, có tỷ lệ sống cao hơn so với lô đối chứng chỉ gây nhiễm với *Vibrio* spp.

Kết luận: Chúng tôi thu được 6 chủng *Bacillus* (T9, F10, F2, F13, F22, F11) vừa an toàn vừa có khả năng chống lại 3 chủng *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*) có tiềm năng to lớn trong sản xuất chế phẩm vi sinh vật để phòng và trị bệnh do vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra trong nuôi tôm hay nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: Tôm sú, Trùn quế, *Vibrio*, nuôi trồng thủy sản.

ABSTRACT

Aims: This present study is aimed to evaluate the safety and the antagonistic effect of *Bacillus* against the pathogenic *Vibrios* on Black Tiger Shrimp larvae.

Methods and Results: The safety of *Bacillus* was tested by exposing black tiger shrimp to *Bacillus* at a density of 10^6 CFU/ml. The results showed that there are 10 strains (T9, F10, F2, F13, F22, F28, F11, F27, F33, F34) are safe for black tiger shrimp larvae. These strains were further tested for their protection capability. Black tiger shrimp larvae was treated with *Bacillus* at a density 10^6 CFU/ml in 6 hours, then infected with *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*). By this experiment, six strains (T9, F10, F2, F13, F22, F11) showed their protection capability to black tiger shrimp larvae, a higher survival rate of larvae have been recorded than control sample.

Conclusions: This study reported that six (06) strains of *Bacillus* (T9, F10, F2, F13, F22, F11) were both safe and can controll pathogenic *Vibrios* under in vitro conditions. These results suggested that these *Bacillus* spp. can be applied as effective probiotic to control pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture.

Keywords: Black tiger shrimp, *Perionyx excavatus*, *Vibrio*, aquaculture.

¹Trường Đại học Mở TP.HCM.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, sử dụng chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản được xem như là giải pháp thay thế kháng sinh. Sử dụng chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản đã được chấp nhận rộng rãi để không chế dịch bệnh, tăng sức đề kháng và giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường trong ao nuôi. Khác với biện pháp hóa học và kháng sinh, chế phẩm sinh học cung cấp một phương thức an toàn bền vững đối với người nuôi và tiêu dùng [11]. Vi khuẩn được ứng dụng làm probiotic hiện nay thường là vi khuẩn có khả năng sinh bào tử mà phần lớn thuộc chi *Bacillus*. Trong thủy sản, *Bacillus* spp. 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. và có thể tồn tại có hoạt tính trong cả môi trường nuôi và trong hệ tiêu hóa. Chính vì vậy, *Bacillus* spp. được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực và được xem là một probiotic “thật sự” (the true probiotics) trong nuôi trồng tôm thủy sản [6,8].

Một số đặc tính tiềm năng làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản của vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ trùn quế (*Perionyx excavatus*) đã được báo cáo [1,2]. Chúng tôi chọn nguồn phân lập từ trùn quế vì có những khuyến cáo cho rằng sử dụng trùn quế làm thức ăn cho tôm ngoài việc cung cấp dinh dưỡng còn giúp tôm có sức đề kháng cao, khỏe mạnh, vượt qua bệnh phân trắng và tăng trưởng nhanh. Tuy nhiên, khả năng giúp tôm đề kháng hay vượt qua bệnh chưa được các nhà khoa học chứng minh rõ ràng. Việc tìm ra những vi sinh vật có lợi trong trùn quế cũng sẽ góp phần làm sáng tỏ vai trò của trùn quế trong nuôi trồng thủy sản.

Nguồn phân lập từ trùn quế sẽ có môi trường khác biệt với vật chủ. Trong nghiên cứu tuyển chọn probiotic nói chung, hay

trong nuôi trồng thủy sản, lựa chọn nguồn phân lập là bước quan trọng và nguồn phân lập từ vật chủ luôn là sự lựa chọn ưu tiên. Mặc dù vậy, không có sự chỉ định bắt buộc về nguồn phân lập tuyển chọn ở vật chủ (hay môi trường xung quanh vật chủ) tốt hơn là phân lập từ điều kiện môi trường rất khác biệt với vật chủ [11].

Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng *Bacillus* để kiểm soát *Vibrio* spp. [7, 9, 10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tính an toàn và khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú của những chủng *Bacillus* phân lập từ trùn quế trong điều kiện phòng thí nghiệm để làm cơ sở cho các thử nghiệm phòng và trị bệnh do *Vibrio* gây ra trong các trại sản xuất tôm giống hay tôm nuôi công nghiệp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vi khuẩn thử nghiệm: 12 chủng vi khuẩn *Bacillus* T9, F10, F5, F2, F13, F4, F22, F28, F11, F27, F33, F34 đã được phân lập từ trùn và phân trùn quế, cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh Trường Đại Học Mở TP.HCM.

Vi khuẩn gây bệnh: 3 chủng vi khuẩn gây bệnh cho tôm: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* phân lập từ tôm bệnh và được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh Trường Đại Học Mở TP.HCM và viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II TP.HCM.

Ấu trùng tôm sú (*Penaeus monodon* Fabricus) ở giai đoạn PL12 đến PL15 được thu ở trại giống Vũng Tàu.

Phương pháp

Thí nghiệm đánh giá khả năng và mật độ gây nhiễm thích hợp của các chủng *Vibrio* spp. lên ấu trùng tôm sú

Nước biển (độ mặn 16 – 18‰) được lọc để loại bỏ tạp chất, hấp ở 121 °C/1atm /20 phút. Ấu trùng sau khi thuần hóa 12h được cho vào nước biển đã để nguội theo

lô thí nghiệm 60 ấu trùng/300 mL/1 hộp. Vi khuẩn gây bệnh được tăng sinh trên môi trường pepton kiềm ở 30 °C/ 24h rồi bổ sung vào hộp thí nghiệm sao cho đạt mật độ 10^4 , 10^6 , 10^7 CFU/ mL. Theo dõi tỷ lệ sống của ấu trùng tôm sau 24h. Thử nghiệm được tiến hành 6 lần [2].

Thử nghiệm tính an toàn của các chủng Bacillus spp. lên ấu trùng tôm sú

Nước biển (độ mặn 16 – 18‰) được lọc để loại bỏ tạp chất, hấp ở 121 °C/1atm/20 phút. Ấu trùng sau khi thuần hóa 12h được cho vào nước biển đã để nguội theo lô thí nghiệm 60 ấu trùng/300 mL/1 hộp. Vi khuẩn thử nghiệm sau khi tăng sinh trên NA ở 30 °C/ 24h được bổ sung vào hộp thí nghiệm đạt mật độ 10^6 CFU/ mL. Theo dõi tỷ lệ sống của ấu trùng tôm sau 24h. Thử nghiệm được tiến hành 6 lần [2,6].

Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ của các chủng Bacillus spp. lên ấu trùng tôm sú

Nước biển (độ mặn 16 – 18‰) được lọc để loại bỏ tạp chất, hấp ở 121 °C/1atm/20 phút. Ấu trùng sau khi thuần hóa 12h được cho vào nước biển đã để nguội theo lô thí nghiệm 60 ấu trùng/300 mL/1 hộp. Vi khuẩn thử nghiệm sau khi tăng sinh trên NA ở 30 °C/ 24h được bổ sung vào hộp thí nghiệm đạt mật độ 10^6 CFU/ mL sau 6h bổ sung vi khuẩn gây bệnh đã được tăng sinh trên môi trường pepton kiềm ở 30 °C/ 24h. Theo dõi tỷ lệ sống của ấu trùng tôm sau 24h. Thử nghiệm được tiến hành 6 lần. [2,6]

Phương pháp xử lý số liệu

Các thử nghiệm được lặp lại 6 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel của Microsoft. Trong Excel xử lý thống kê ANOVA single factor, với độ tin cậy 0,05.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Thí nghiệm đánh giá khả năng và mật độ gây nhiễm thích hợp của các chủng *Vibrio* lên ấu trùng tôm sú

Kết quả được trình bày trong biểu đồ 1, 2 và 3. Các chữ cái khác nhau minh họa cho sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng ($P < 0,05$).

Ghi chú:

ĐC: Đối chứng (không vi khuẩn)

VP4: *Vibrio parahaemolyticus* mật độ 10^4 CFU/mL

VP6: *Vibrio parahaemolyticus* mật độ 10^6 CFU/mL

VP7: *Vibrio parahaemolyticus* mật độ 10^7 CFU/mL

VP4: *Vibrio harveyi* mật độ 10^4 CFU/mL

VP6: *Vibrio harveyi* mật độ 10^6 CFU/mL

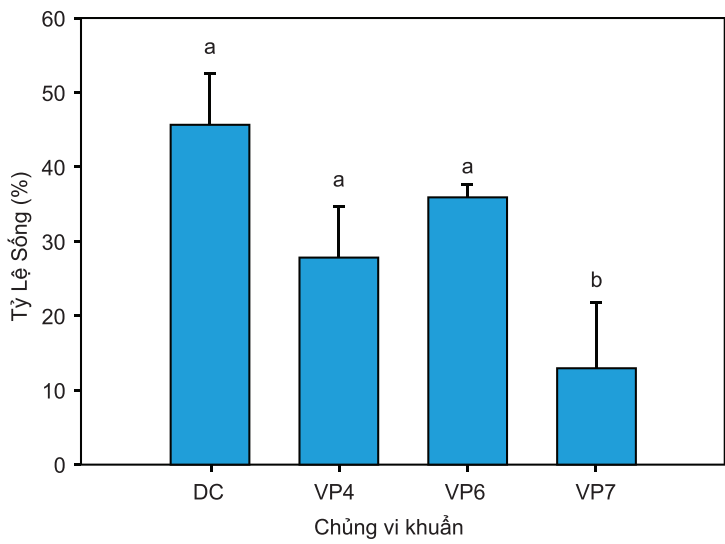
VP7: *Vibrio harveyi* mật độ 10^7 CFU/mL

VP4: *Vibrio alginolyticus* mật độ 10^4 CFU/mL

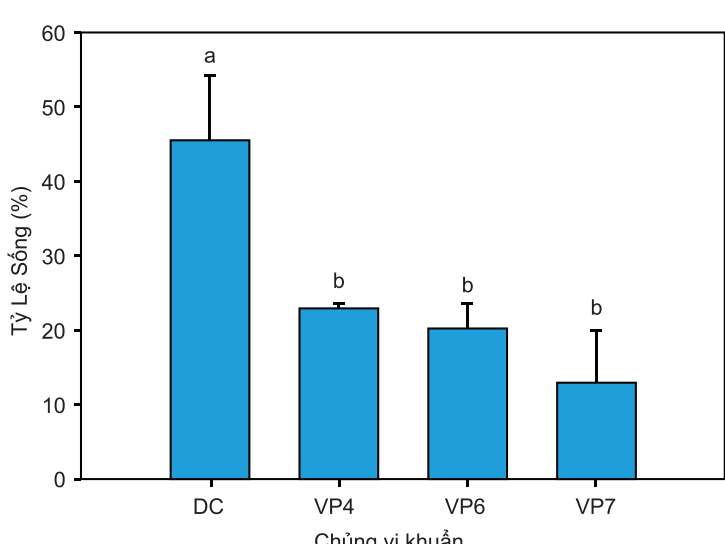
VP6: *Vibrio alginolyticus* mật độ 10^6 CFU/mL

VP7: *Vibrio alginolyticus* mật độ 10^7 CFU/mL

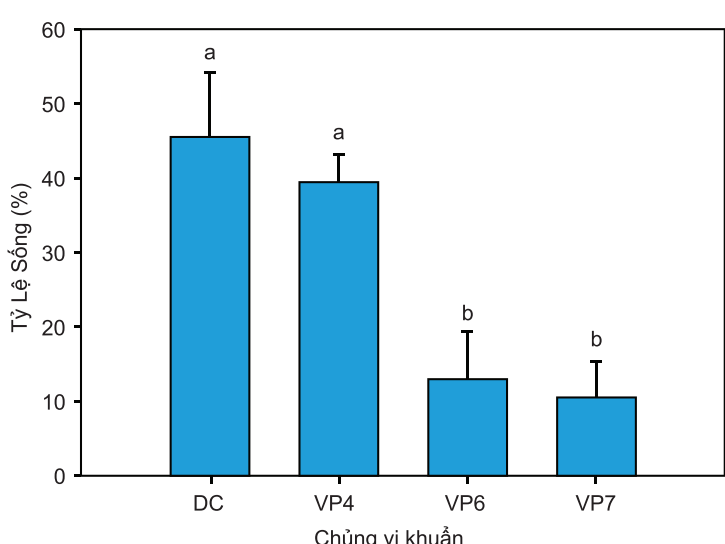
Biểu đồ 1: Tỷ lệ sống của ấu trùng tôm sú sau 24 giờ bổ sung *Vibrio parahaemolyticus*



Biểu đồ 2: Tỷ lệ sống của ấu trùng tôm sú sau 24 giờ bổ sung *Vibrio harveyi*



Biểu đồ 3: Tỷ lệ sống của ấu trùng tôm sú sau 24 giờ bổ sung *Vibrio alginolyticus*



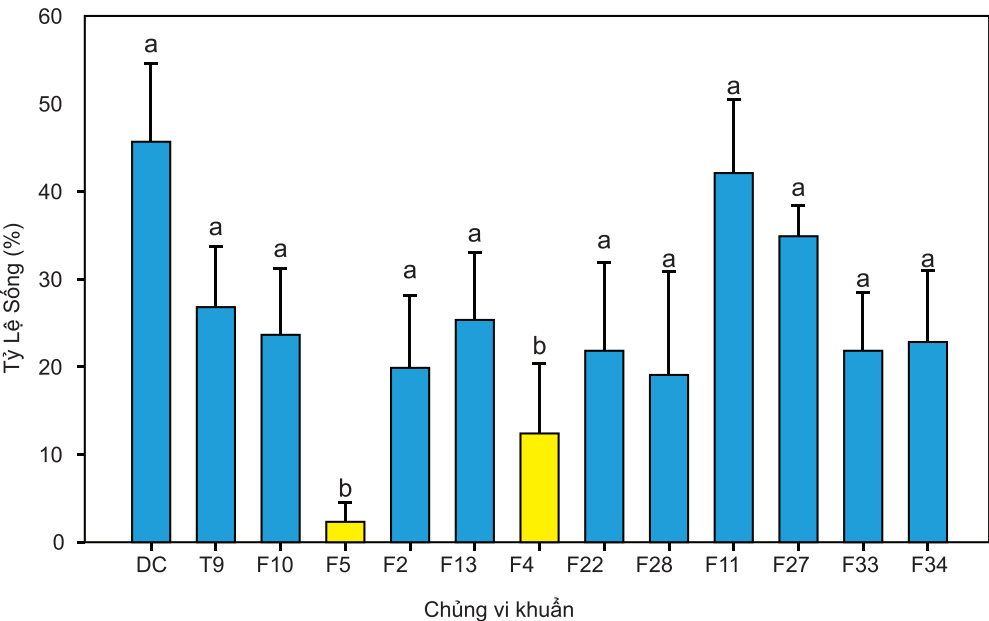
Kết quả thí nghiệm cho thấy *Vibrio parahaemolyticus* gây độc cho ấu trùng tôm ở mật độ 10⁷ CFU/mL, *V. harveyi* gây độc với ấu trùng tôm sú ở cả 3 mật độ 10⁴, 10⁶, 10⁷ CFU/mL, *V. alginolyticus* gây độc đối với ấu trùng tôm sú ở 2 mật độ 10⁶, 10⁷ CFU/mL, được thể hiện qua tỷ lệ sống của ấu trùng tôm thấp hơn so với đối chứng, và sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê (P<0.05). Do đó chúng tôi chọn mật độ *V. parahaemolyticus* là 10⁷ CFU/mL, *V.*

harveyi và *V. alginolyticus* là 10⁶ CFU/mL là mật độ gây nhiễm thích hợp để tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ của các chủng *Bacillus* lên ấu trùng tôm sú.

Thí nghiệm đánh giá tính an toàn của các chủng *Bacillus* lên ấu trùng tôm sú

Kết quả được trình bày trong biểu đồ 4. Các chữ cái khác nhau minh họa cho sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng (P<0,05).

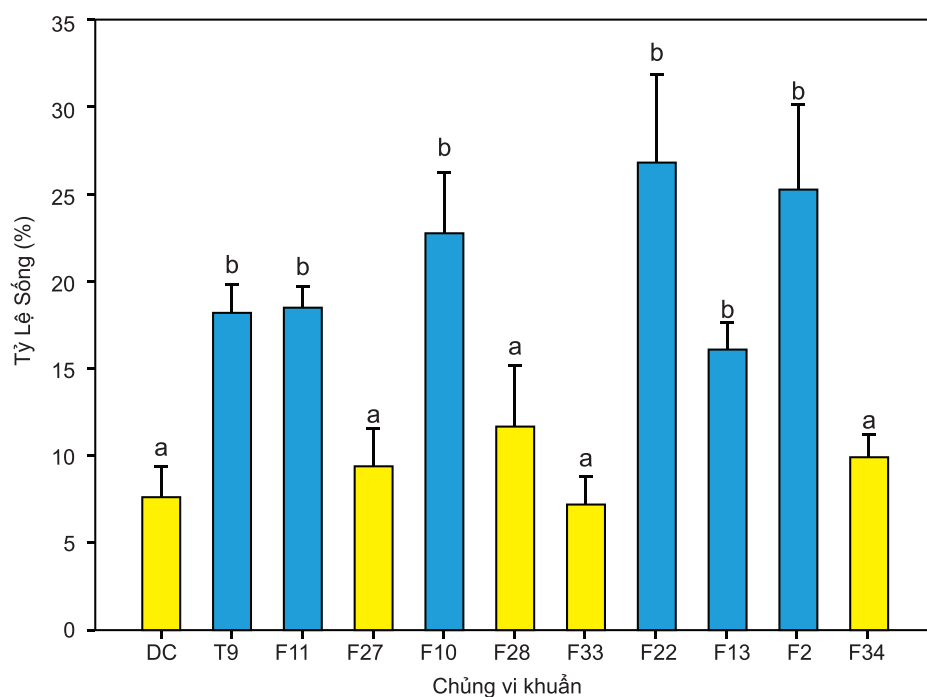
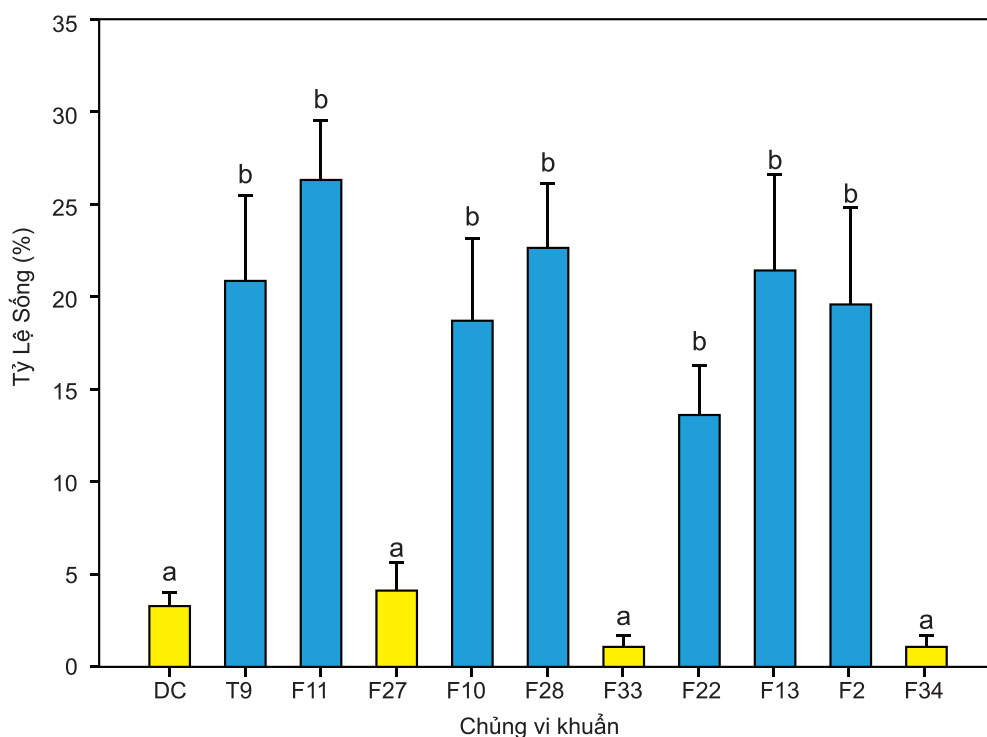
Biểu đồ 4: Tỷ lệ sống của ấu trùng tôm sú sau 24 giờ bổ sung *Bacillus*

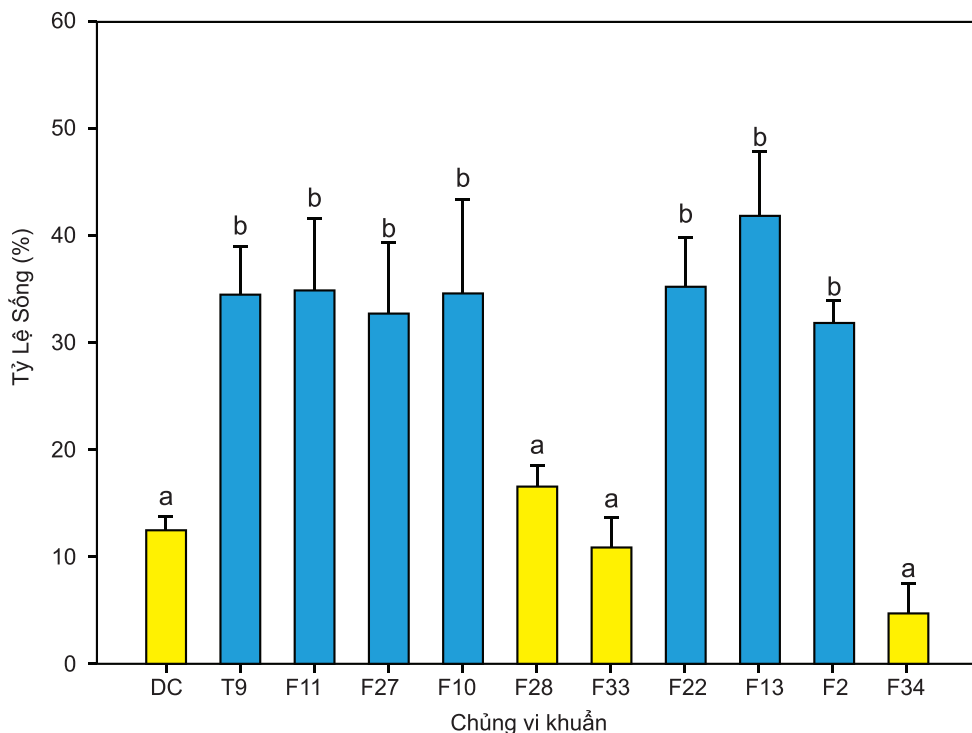


Trong 12 chủng *Bacillus* có 10 chủng *Bacillus* (T9, F10, F2, F13, F22, F28, F11, F27, F33, F34) an toàn với ấu trùng tôm sú. Nên được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm kế tiếp. Còn 2 chủng F5 và F4 gây hại cho ấu trùng tôm sú thể hiện qua tỷ lệ sống thấp hơn so với đối chứng và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê nên không sử dụng để tiếp tục thí nghiệm.

Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ của các chủng *Bacillus* lên ấu trùng tôm sú

Kết quả được trình bày trong biểu đồ 5, 6 và 7. Các chữ cái khác nhau minh họa cho sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng (P<0,05).

Biểu đồ 5: Khả năng bảo vệ của các chủng Bacillus chống lại V.Parahaemolyticus**Biểu đồ 6: Khả năng bảo vệ của các chủng Bacillus chống lại V.Harveyi**

Biểu đồ 7: Khả năng bảo vệ của các chủng *Bacillus* chống lại *V.alginolyticus*

Trong 10 chủng (T9, F10, F2, F13, F22, F28, F11, F27, F33, F34) khảo sát có 2 chủng (F33, F34) không có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú chống lại 3 chủng *Vibrio* gây bệnh, F27 chỉ có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm chống lại *V. alginolyticus* và F28 chỉ có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm chống lại *V. harveyi*. Sáu chủng còn lại (T9, F10, F2, F13, F22, F11) đều có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú chống lại cả 3 chủng *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* và *V. alginolyticus*. Các chủng có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú chống lại *Vibrio* gây bệnh thể hiện qua tỷ lệ sống của ấu trùng tôm sú cao hơn so với đối chứng chỉ bổ sung vi khuẩn gây bệnh (biểu đồ 5, 6 và 7) và sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

Kết quả của thử nghiệm cũng tương tự như báo cáo của Balcazar và đồng

tác giả (2007) cho thấy *Bacillus subtilis* UTM 126 có khả năng ức chế 3 chủng *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* [4], Sugama và Tsumura (1998) đã cấy chủng *Bacillus* YC5-2 với mật độ 10^5 CFU/mL vào bể ương ấu trùng tôm làm giảm mật độ *Vibrio* và cho tỷ lệ sống cao (67.3%) hơn đối chứng (4,9%) [5].

KẾT LUẬN

Qua các thí nghiệm trên từ 12 chủng *Bacillus* ban đầu chúng tôi xác định được 8 chủng (T9, F10, F2, F13, F22, F28, F11, F27) vừa an toàn, vừa có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú chống lại *Vibrio* gây bệnh, trong đó 6 chủng (T9, F11, F10, F22, F13, F2) có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm chống lại cả 3 chủng *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Minh, Dương Nhật Linh, Đỗ Bảo Ngọc, Trần Thị Khánh Linh, Hà Thị Bảo Yến, 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& PTNT*, 137-143.

2. Nguyễn V. Minh, Dương N. Linh, Đan D. Pháp, Lai P. Mỹ Lệ, Lại T. Minh Lê, Nguyễn T. Hồng Phương, Lê H. Ái Thuý, Phạm H. Vân, Nguyễn V. Bảy, Nguyễn V. Hoà, (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*.
3. Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh, Trần Nguyễn Ái Hằng, Nguyễn Thảo Sương, Hoàng Thanh Lịch, Nguyễn Văn Vũ, Phạm Minh Nhựt, Văn Thị Thúy, Nguyễn Thị Đà (2010) Phân lập và khảo sát đặc tính probiotic của một số chủng vi khuẩn phân hủy quorum sensing và đối kháng với nhóm *Vibrio* spp. *Hội nghị CNSH Thủy sản toàn quốc*.
4. Balcazar J.L., Tyrone Roja-Luna, (2007), Inhibitory activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* Species confers protection against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Current Microbiology* 55, pp.409-412.
5. Irasema, E., Luis-Villaseñor, María E. Macías-Rodríguez, Bruno Gómez-Gil, Felipe Ascencio-Valle, Ángel I. Campa-Córdova (2011), Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture* 321, 136–144.
6. Moriarty, D.J.W., Decamp, O., Lavens, P., (2005), Probiotics in aquaculture, *AQUA Culture AsiaPacific Magazine*, 14-16.
7. Purivirojkul, W., and 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.
8. Ravi, A.V., Musthafa, K.S., Jegathammbal G, Kathiresan, K., and Pandian, S.K., (2007) Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture, *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology* 45, 219 - 223.
9. Rengpipat, S., Piyatiratitivorakul, S., Phianpaik, W, Menasveta P (1998), Effects of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth, *Aquaculture* 167, 301-313.
10. Vaseeharan, B., Ramasamy, P., (2003), Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Lett Appl Microbiol* 36(2), 83-87.
11. Verschuere, L, Rombaut, G., Sorgeloos P., Verstraete, W., (2000), Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655–671.