

Khả năng kháng khuẩn và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) của tỏi (*Allium sativum*) lên men

Nguyễn Thị Hạnh, Phan Thị Vân, Phạm Thị Yến, Lê Thị Mây, Trương Thị Mỹ Hạnh*

Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1

Ngày nhận bài 16/11/2020; ngày chuyển phản biện 20/11/2020; ngày nhận phản biện 2/1/2021; ngày chấp nhận đăng 6/1/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm kiểm tra khả năng kháng khuẩn của tỏi lên men đối với các chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *Vibrio harveyi* KC.13.17.5 gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND), đồng thời đánh giá khả năng phòng AHPND cho tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả chỉ rõ, sản phẩm tỏi lên men có độ nhạy cao đối với cả 2 chủng vi khuẩn gây AHPND khi thử nghiệm ở 25 µl và 30 µl. Khi bổ sung dịch tỏi lên men với liều 15 ml/kg thức ăn/ngày vào thức ăn để cho tôm ăn trong 10 ngày liên tục đã có khả năng phòng AHPND cho tôm. Thức ăn trộn dịch tỏi lên men bao ngoài bằng dầu mực có hiệu quả cao nhất khi nâng tỷ lệ sống của tôm lên 53%, cao hơn so với không sử dụng chất bao ngoài (51%), bao ngoài bằng bột nếp (42%) và không sử dụng dịch tỏi lên men (14%).

Từ khóa: AHPND, dịch tỏi lên men, kháng khuẩn, phòng bệnh, tôm thẻ chân trắng.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, AHPND là một trong những bệnh phổ biến, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến nghề nuôi tôm trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Tác nhân gây AHPND được xác định là do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* [1]. Kết quả nghiên cứu sâu về tác nhân gây AHPND cho thấy, bản chất gây ra AHPND là vi khuẩn mang Plasmid có chứa gen độc lực gây hoại tử gan tụy cấp [2, 3]. Ở Việt Nam, đã xác định có ít nhất 2 chủng vi khuẩn (*V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*) gây AHPND ở tôm nuôi nước lợ, trong đó có tôm thẻ chân trắng [4, 5].

Tỏi có vai trò kích thích tiêu hóa, tăng cường hệ miễn dịch, gia tăng kiểm soát tác nhân gây bệnh, đặc biệt là vi khuẩn và nấm [6-8]. Một số nghiên cứu về hiệu quả của dịch chiết tỏi, tỏi tươi ép, tỏi bột đối với phòng trị bệnh nhiễm khuẩn ở động vật thủy sản đã được thực hiện [6-8]. Tuy nhiên, mỗi phương pháp đều có hạn chế, cụ thể phương pháp tách chiết đòi hỏi trang thiết bị và hóa chất chuyên dùng, người thực hiện cần được đào tạo bài bản, chi phí thực hiện cao, dẫn đến giá thành sản phẩm cao, ngoài ra còn không thuận tiện trong cách bảo quản lẫn sử dụng tại các nông hộ. Đối với tỏi bột, cần có đầu tư về hệ thống máy sấy, nghiền bột. Bên cạnh đó, bột tỏi để trộn vào thức ăn thường bám dính kém và mùi đặc trưng của

tỏi đã không kích thích cho động vật thủy sản bắt mồi. Đối với tỏi tươi ép, mùi đặc trưng của tỏi không kích thích động vật thủy sản bắt mồi. Phương pháp lên men tỏi đã khắc phục được các hạn chế nêu trên. Phương pháp này thực hiện không quá cầu kỳ, giá thành rẻ, thuận lợi cho bà con nông dân khi sử dụng cho động vật thủy sản nuôi, đặc biệt sản phẩm có mùi thơm kích thích động vật thủy sản bắt mồi. Đây là một hướng nghiên cứu đầy hứa hẹn, có giá trị ứng dụng cao.

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây AHPND và hiệu quả phòng AHPND trên tôm thẻ chân trắng trong điều kiện phòng thí nghiệm của sản phẩm tỏi lên men.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Củ tỏi ta (*Allium sativum* L.) thu tại Hải Dương, bóc bỏ lớp vỏ lụa bên ngoài, sau đó cắt nhỏ các tép tỏi, phối trộn cùng với rượu và mật ong theo tỷ lệ 10 kg tỏi : 10 lít rượu : 1 lít mật ong. Chuyển nguyên liệu đã phối trộn vào thùng/xô nhựa có nắp đậy ủ cho lên men trong thời gian 25-30 ngày ở 30-35°C. Sau thời gian ủ, lọc bỏ phần bã của củ tỏi, phần dịch tỏi lên men được sử dụng để thử khả năng kháng khuẩn

* Tác giả liên hệ: Email: tmhanh@ria1.org

Antimicrobial activity and prevention acute hepatopancreatic necrosis disease in brackish whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) of the fermented garlic (*Allium sativum*)

Thi Hanh Nguyen, Thi Van Phan, Thi Yen Pham, Thi May Le, Thi My Hanh Truong*

Research Institute for Aquaculture No 1

Received 16 November 2020; accepted 6 January 2021

Abstract:

The study was conducted to screen the antibacterial activity of fermented garlic against *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 and *V. harveyi* KC.13.17.5, the causal agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). The results showed that fermented garlic products had a high sensitivity to both strains of screened bacteria at concentrations of 25 and 30 μ l. Then the effect of fermented garlic as an agent for the prevention of AHPND was evaluated *in vivo*. When adding fermented garlic at a dose of 15 ml/kg food/day to feed shrimp for 10 consecutive days, it was possible to prevent AHPND disease for shrimp. Food mixed with fermented garlic with squid oil was the most effective when it increased the survival rate of shrimp to 53%, significantly higher than treatment using supplementary feed without a coating of 51%, coated with glutinous rice of 42%, and no fermented garlic of 14%.

Keywords: AHPND, antibacterial, disease prevention, fermented garlic, whiteleg shrimp.

Classification number: 4.5

và hiệu quả phòng AHPND cho tôm.

Các chủng vi khuẩn thử nghiệm bao gồm *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *V. harveyi* KC.13.17.5 gây AHPND ở tôm nuôi nước lợ tại Nghệ An. Các chủng này hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA), Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1.

Tôm thẻ chân trắng có khối lượng khoảng 3-4 g/con, kích thước đồng đều, phản xạ nhanh, ruột đầy thức ăn, có kết quả âm tính với vi rút gây bệnh đốm trắng và các loài vi khuẩn gây AHPND.

Bể composit có thể tích 200 l/bể, muối biển nhân tạo dùng để pha nước nuôi tôm ở độ mặn 15‰.

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá khả năng kháng khuẩn của sản phẩm tỏi lên men:

Chuẩn bị vi khuẩn thử nghiệm: các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *V. harveyi* KC.13.17.5 từ tủ -80°C được nuôi cấy thuần lại trên đĩa TCBS (Thiosulfate citrate bile salts), chọn 1 khuẩn lạc đơn đem nuôi cấy tăng sinh trong môi trường NB có bổ sung 2% NaCl để thu dịch vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 600 nm, mật độ vi khuẩn sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn là 10^8 cfu/ml, tương ứng với OD=0,1.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của sản phẩm tỏi lên men bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch Kirby-Bauer [9]. Nhỏ sản phẩm tỏi lên men lên các khoanh giấy vô trùng với 6 thể tích để tiến hành thử nghiệm bao gồm 5, 10, 15, 20, 25 và 30 μ l/khoanh giấy. Khoanh giấy tâm kháng sinh Doxycyclin (30 μ g) được sử dụng như đối chứng dương, khoanh giấy nhỏ nước cất được sử dụng như đối chứng âm. Dùng que trang trang đều 100 μ l vi khuẩn ở mật độ 10^8 cfu/ml lên thạch Mueller Hinton, đặt các đĩa giấy đã thấm sản phẩm tỏi lên men và đối chứng vào, sau đó ủ trong tủ ẩm ở 29°C. Sau 24h nuôi cấy, đĩa thạch được lấy ra để đo đường kính vòng vô khuẩn. Đường kính vòng vô khuẩn ≥ 16 mm: nhạy (dịch tỏi lên men có độ nhạy với vi khuẩn) [10].

Đánh giá hiệu quả phòng AHPND: thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng bệnh đối với tôm gây nhiễm vi khuẩn gây AHPND được mô tả chi tiết trong bảng 1.

Bảng 1. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng bệnh đối với tôm gây nhiễm vi khuẩn gây AHPND.

	CT1	CT2	CT3	Đối chứng dương	Đối chứng âm
Cách bổ sung tòi lên men cho tôm	Thức ăn trộn cùng tòi lên men có bao ngoài bằng bột nếp	Thức ăn trộn cùng tòi lên men có bao ngoài bằng đầu gan mực	Thức ăn trộn cùng tòi lên men không bao ngoài	Thức ăn thường không có chất bổ sung	Thức ăn thường không có chất bổ sung
Cách cho ăn và liều lượng bổ sung	Trộn 15 ml dịch tòi lên men/kg thức ăn/ngày cho tôm ăn liên tục trong vòng 10 ngày, từ ngày thứ 11 cho ăn thức ăn viên công nghiệp không có tòi lên men			Cho ăn thức ăn thường công nghiệp không bổ sung dịch tòi lên men	
Mật độ vi khuẩn ngấm khi công cường độc	1x10 ⁶ (cfu/ml)			Không có bất kỳ tác động nào của vi khuẩn. Tôm nuôi bình thường	
Thời điểm ngấm vi khuẩn	Ngày thứ 11			Không ngấm vi khuẩn	
Thời gian ngấm tôm trong vi khuẩn	1 ngày, sau đó thay toàn bộ nước trong tất cả các bể thí nghiệm				
Thí nghiệm được bố trí kéo dài 21 ngày, các thí nghiệm thức thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, mỗi bể 30 con tôm có kích cỡ khoảng 3-4 g và được theo dõi ghi chép số tôm chết tích lũy theo thời gian, tái phân lập tác nhân vi khuẩn gây AHPND					

Tôm trước khi thí nghiệm được kiểm tra âm tính với AHPND.

Thí nghiệm được bố trí trong khoảng nhiệt độ 25-28°C, pH 7,3-7,9, sục khí hoạt động liên tục ở các bể trong quá trình thí nghiệm, độ mặn 15‰.

Sản phẩm tòi lên men do chúng tôi tạo ra trước đó đã được thử tại nông hộ nuôi tôm với mục đích để phòng bệnh cho tôm nuôi. Kết quả được nông hộ phản ánh, các ao nuôi tôm khi sử dụng dịch tòi lên men bổ sung vào thức ăn cho tôm ăn với liều lượng 15 ml/kg thức ăn/ngày, cho ăn 10 ngày liên tục là có hiệu quả phòng bệnh so với các ao nuôi tôm không sử dụng dịch tòi lên men. Chính vì vậy, để kiểm chứng lại kết quả một cách có ý nghĩa khoa học chúng tôi đã chọn liều lượng 15 ml tòi lên men/kg thức ăn/ngày, cho ăn 10 ngày liên tục để phòng AHPND cho tôm trong thí nghiệm này.

Công cường độc vi khuẩn bằng hình thức ngấm, vi khuẩn sử dụng để gây nhiễm là chủng *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 gây AHPND đã được chúng tôi sử dụng làm vật liệu nghiên cứu cho nhiều nghiên cứu trước đó. Mật độ vi khuẩn khi ngấm là 1x10⁶ cfu/ml [9, 11]. Xác định mật độ vi khuẩn ban đầu theo phương pháp đo OD ở bước sóng λ=600 nm, khi đo OD=0,1 tương đương với mật độ vi khuẩn ban đầu là 10⁸ cfu/ml.

Sử dụng thức ăn tôm cao cấp của Công ty Thức ăn thủy sản Việt Nam, bổ sung sản phẩm tòi lên men thấm đều vào thức ăn. Thí nghiệm thức sử dụng chất bao ngoài, dùng đầu gan

mực nhỏ từng giọt một cho đến khi thấm đều các viên thức ăn, đối với bột nếp đun chín rồi trộn từng thìa một cho đến khi đủ bao ngoài các viên thức ăn. Thức ăn sau đó được rải mỏng ra giấy rồi để khô nửa ngày trong tủ lạnh trước khi cho tôm ăn.

Trong quá trình thí nghiệm, tôm vừa chết hoặc yếu không phản xạ bơi khi có vật chạm vào được thu để tái phân lập lại tác nhân gây nhiễm bằng phương pháp nuôi cấy và định danh vi khuẩn theo phương pháp của Nicky B. Buller [12], sử dụng bộ kit API 20E để thử sinh hóa, sau đó tra kết quả bằng phần mềm: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>. Đồng thời, xác định tác nhân gây AHPND bằng kỹ thuật PCR: sử dụng cặp mồi AP3 (F: ATGAGTAACAATAAAAACATGAAAC; R: GTGGTAATATTGTACAGAA) được công bố bởi Sirikharin và cs [13]. Cặp mồi AP3 để khuếch đại đoạn gen 336 bp của gen Toxin gây AHPND ở tôm, chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR được áp dụng như sau: 95°C (5 phút), [35 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 40 giây)], 72°C (5 phút) và 4°C (∞). Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1% trong dung dịch 1X TBE và đọc kết quả dưới đèn UV, sản phẩm xuất hiện vạch có kích thước 336 pb.

Kết thúc thí nghiệm tôm còn sống ở các thí nghiệm thức cũng được thu để định danh vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 trong gan tụy tôm và kiểm tra AHPND.

Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS với sự sai khác có ý nghĩa p<0,05.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

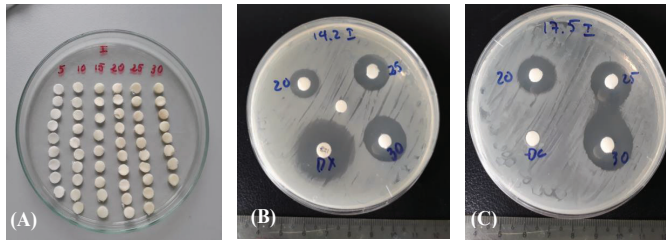
Khả năng diệt khuẩn của tòi lên men đối với các chủng vi khuẩn gây AHPND

Kết quả thử nghiệm ở nồng độ 5 µl, sản phẩm tòi lên men không tạo được vòng vô khuẩn đối với cả 2 chủng vi khuẩn thử nghiệm là *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *V. harveyi* KC.13.17.5. Khi thử nghiệm ở các nồng độ cao hơn là 10, 15 và 20 µl, sản phẩm tòi lên men tạo ra vòng kháng khuẩn trung bình dao động từ 7,2-13,8 mm (chủng *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2) và 8,0-14,6 mm (chủng *V. harveyi* KC.13.17.5). Chỉ khi nâng nồng độ thử nghiệm lên 25 và 30 µl thì sản phẩm tòi lên men mới tạo ra vòng kháng khuẩn có độ nhạy cao đối với cả 2 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Đường kính vòng vô khuẩn trung bình đạt được lần lượt là 16,8-18,2 mm (*V. parahaemolyticus* KC.13.14.2) và 17,2-18,8 mm (*V. harveyi* KC.13.17.5). Trong khi đó, đối chứng Doxycyclin cũng chỉ tạo ra đường kính vòng vô khuẩn trung bình 22,8-24,0 mm giữa hai chủng (bảng 2, hình 1).

Bảng 2. Khả năng diệt khuẩn của sản phẩm tòi lên men đối với các chủng gây AHPND.

Nồng độ thử nghiệm (μl)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
	<i>V. parahaemolyticus</i> KC.13.14.2	<i>V. harveyi</i> KC.13.17.5
5	0	0
10	7,2±0,8 ^a	8,0±0,7 ^a
15	11,4±0,9 ^b	9,8±0,8 ^b
20	13,8±1,3 ^c	14,6±0,9 ^c
25	16,8±1,6 ^d	17,2±0,8 ^d
30	18,2±1,4 ^e	18,8±1,1 ^d
Đối chứng (nước cất)	0	0
Doxycyclin (30 μg)	24,0±1,2	22,8±1,1

Ghi chú: a, b, c, d, e: trên cùng một cột chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê p<0,05.



Hình 1. Khả năng diệt khuẩn của tòi lên men đối với vi khuẩn gây AHPND trên tôm. (A) Đĩa giấy tẩm dịch chiết tòi; (B) Đường kính vòng vô khuẩn của tòi lên men khi thử với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 gây AHPND; (C) Đường kính vòng vô khuẩn của tòi lên men khi thử với vi khuẩn *V. harveyi* KC.13.17.5 gây AHPND; ĐC: đối chứng âm; Dx: Doxycyclin (30 μg).

Đối với chủng *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 khi nâng nồng độ thử nghiệm từ 25 lên 30 μl, đường kính vòng vô khuẩn tăng từ 16,8 lên 18,2 mm, khoảng cách này tạo ra sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê (p<0,05). Trong khi đó, khi nâng nồng độ thử nghiệm từ 25 lên 30 μl đối với chủng *V. harveyi* KC.13.17.5, đường kính vòng vô khuẩn tạo ra từ 2 nồng độ lại không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê (bảng 2, hình 1).

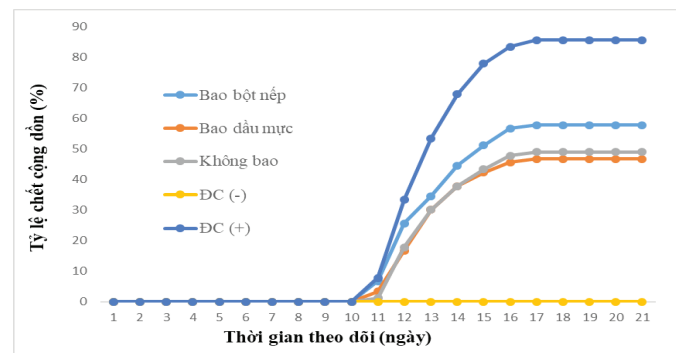
Kết quả thử nghiệm này của chúng tôi cũng tương đồng với một số kết quả của các công trình nghiên cứu trước về khả năng kháng khuẩn của dịch chiết tòi đối với tác nhân vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản. Theo Nguyễn Anh Tuấn (2009) [11], dịch ép tòi tươi có tác dụng diệt khuẩn rất tốt đối với vi khuẩn *V. harveyi* ở nồng độ thử nghiệm là 100% với đường kính vòng vô khuẩn trung bình là 22,1±3,11 mm. Cao khô tòi có khả năng diệt khuẩn cao với 2 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên cá trắm cỏ ở nồng độ thử nghiệm là 30 μg/μl với đường kính vòng vô khuẩn trung bình lần lượt là 18,33±1,57 mm và 18,33±1,53 mm [9].

Cũng nghiên cứu và thử nghiệm đối với các chủng vi khuẩn gây AHPND trên tôm Nguyễn Thị Hạnh và Đặng Thị Lụa (2016) cho rằng, cao khô tòi tách chiết bằng dung môi

là cồn 70° khi thử nghiệm ở 5 nồng độ (10, 15, 20, 25 và 30 μl) đều không có khả năng diệt khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (KC.12.020, KC.13.14.2) gây AHPND trên tôm [14]. Trong khi đó, nghiên cứu này lại cho thấy tòi lên men có tính nhạy đối với cả 2 chủng vi khuẩn gây AHPND là *V. harveyi* KC.13.17.5 và *V. Parahaemolyticus* KC.13.14.2 khi thử nghiệm ở thể tích ≥25 μl (đường kính vòng vô khuẩn >16 mm) (bảng 2).

Khả năng phòng bệnh của tòi lên men đối với AHPND trên tôm thẻ chân trắng

Trong 10 ngày đầu, tôm thẻ chân trắng ở các thí nghiệm được ăn thức ăn có bổ sung dịch tòi lên men để phòng AHPND, từ ngày thứ 11 đến cuối thí nghiệm tôm ăn thức ăn viên công nghiệp không bổ sung dịch tòi lên men, các bể ở thí nghiệm đối chứng tôm ăn thức ăn viên công nghiệp không trộn dịch tòi lên men trong suốt thời gian thí nghiệm. Riêng các bể đối chứng âm và dương tôm ăn thức ăn viên công nghiệp, không bổ sung dịch tòi lên men. Kết quả cho thấy, tôm ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm đều ăn hết thức ăn, phản xạ nhanh nhẹn, màu sắc sáng và không thấy có tôm chết. Đến ngày thứ 11 (ngày đầu tiên gây nhiễm), tất cả các nghiệm thức thí nghiệm có gây nhiễm vi khuẩn đều có tôm chết với tỷ lệ chết từ 1,1 đến 7,7%. Tôm chết nhanh sau 2-4 ngày gây nhiễm và dừng chết sau 7 ngày gây nhiễm. Cuối thí nghiệm, tỷ lệ tôm chết cao nhất là nghiệm thức đối chứng dương với tỷ lệ chết cộng dồn là 86%. Tiếp đến là nghiệm thức tôm bổ sung sản phẩm tòi lên men vào thức ăn có dùng bột nếp để bao ngoài với tỷ lệ chết cộng dồn là 58%. Nghiệm thức tôm ăn thức ăn có bổ sung dịch tòi lên men bao ngoài bằng dầu gan mực và nghiệm thức không sử dụng chất bao ngoài có tỷ lệ chết cộng dồn lần lượt là 47 và 49%. Trong khi đó, nghiệm thức đối chứng âm tôm không có hiện tượng chết (hình 2). Kết quả này cho thấy, sản phẩm tòi lên men có hiệu quả trong việc kiểm soát độc lực của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 gây AHPND trên tôm.



Hình 2. Tỷ lệ chết cộng dồn của tôm trong thí nghiệm đánh giá khả năng phòng AHPND của tòi lên men.

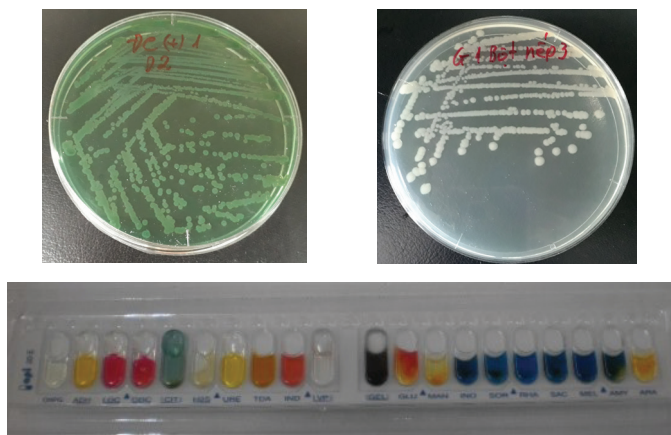
Kết quả thí nghiệm cũng chỉ rõ, khi bổ sung sản phẩm tòi lên men vào thức ăn cho tôm với liều lượng 15 ml/kg thức ăn/ngày liên tục trong 10 ngày đã có tác dụng nâng cao tỷ lệ sống

của tôm khi công cường độc vi khuẩn gây AHPND. Trong đó, hình thức sử dụng dầu gan mực để bao ngoài có hiệu quả cao nhất, tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức này là 53%, ở nghiệm thức không sử dụng chất bao ngoài là 51%, còn ở nghiệm thức sử dụng bột nếp để bao ngoài là 42% so với tôm ở nghiệm thức đối chứng dương có tỷ lệ sống chỉ đạt 14% và đối chứng âm là 100%. Khi so sánh tỷ lệ sống của tôm giữa hai nghiệm thức có hiệu quả cao nhất khi sử dụng sản phẩm tòi lên men để phòng AHPND là nghiệm thức sử dụng dầu gan mực để bao ngoài và nghiệm thức không sử dụng chất bao ngoài cho thấy không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tuy nhiên, lại có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng dương của thí nghiệm ($p < 0,05$).



Hình 3. Biểu hiện của tôm sau khi gây nhiễm vi khuẩn gây AHPND. (I) Tôm chết ở nghiệm thức sử dụng bột nếp để bao ngoài; (II) Tôm chết ở nghiệm thức sử dụng dầu mực để bao ngoài; (III) Tôm chết ở nghiệm thức đối chứng dương; (IV) Tôm ở nghiệm thức đối chứng âm.

Tôm chết ở các nghiệm thức sau khi công cường độc vi khuẩn gây AHPND có các biểu hiện bệnh như gan tụy chuyển màu trắng hoặc đỏ (mũi tên chỉ ở hình 3-III), vỏ mềm (mũi tên chỉ ở hình 3-II), màu sắc nhợt nhạt và ruột tôm không có thức ăn (mũi tên chỉ ở hình 3-I). Trong khi đó, tôm ở lô đối chứng âm màu sắc tươi sáng, gan tụy đen, ruột đầy thức ăn (hình 3-IV). Những biểu hiện của tôm sau gây nhiễm này hoàn toàn giống với những biểu hiện của tôm bị nhiễm AHPND đã được công bố [15].



Hình 4. Khuẩn lạc và đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tái phân lập lại từ tôm chết/yếu ở các nghiệm thức thí nghiệm.

Bảng 3. Kết quả tái phân lập vi khuẩn gây AHPND trong quá trình thí nghiệm.

TT	Ngày thí nghiệm	Tần xuất tái phân lập vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> ở các nghiệm thức thí nghiệm				
		Đối chứng (-)	Đối chứng (+)	Không bao ngoài	Bao ngoài dầu gan mực	Bao ngoài bột nếp
1	12	KT	2/2	2/2	2/2	2/2
2	15	KT	2/2	2/2	2/2	2/2
3	21	0/5	0/1	0/1	0/1	0/1

KT: không thu mẫu.

Trong quá trình thí nghiệm, tôm chết ở các nghiệm thức được thu để nuôi cấy và tái phân lập lại vi khuẩn gây nhiễm. Kết quả nuôi cấy và định danh vi khuẩn cho thấy, 100% mẫu thu khi tôm vừa mới chết/yếu vào ngày thứ 12 và 15 của thí nghiệm (sau 2 và sau 5 ngày công cường độc) đều dương tính với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Các chủng vi khuẩn phân lập được đều có phản ứng sinh hóa trùng khớp với chủng *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 ban đầu đem gây nhiễm. Điều đó khẳng định, tôm trong các nghiệm thức gây nhiễm vi khuẩn bị chết là do độc lực của vi khuẩn gây nhiễm. Trong khi đó, 100% mẫu tôm sống thu ở các nghiệm thức vào ngày thứ 21 (ngày cuối) của thí nghiệm lại cho kết quả âm tính với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. (hình 4, bảng 3).

Kết quả kiểm tra tác nhân gây AHPND trên tôm bằng kỹ thuật PCR cũng đã khẳng định, tôm chết sau khi công cường độc vi khuẩn ở các nghiệm thức thí nghiệm là do nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây AHPND (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả kiểm tra AHPND bằng phương pháp PCR.

TT	Ngày thí nghiệm	Tần xuất bắt gặp tôm nhiễm AHPND ở các nghiệm thức thí nghiệm				
		Đối chứng (-)	Đối chứng (+)	Không bao ngoài	Bao ngoài dầu gan mực	Bao ngoài bột nếp
1	11	KKT	1/1	1/1	1/1	1/1
2	12	KKT	2/2	2/2	2/2	2/2
3	15	KKT	2/2	2/2	2/2	2/2
4	21	0/5	0/1	0/1	0/1	0/1

KKT: không kiểm tra.

Các mẫu tôm chết thu được sau 1 ngày gây nhiễm (ngày thứ 11 của thí nghiệm) đều cho kết quả dương tính với AHPND (4/4 mẫu). Kết quả kiểm tra các mẫu tôm thu sau 2 và 5 ngày gây nhiễm ở các nghiệm thức vẫn tiếp tục cho kết quả dương tính với AHPND, tỷ lệ nhiễm đều là 100% ở các ngày thu mẫu để kiểm tra.

Trước khi kết thúc thí nghiệm, tôm còn sống ở các nghiệm thức được thu để kiểm tra AHPND, tất cả các mẫu kiểm tra đều âm tính với AHPND. Điều đó cho thấy,

gan tụy tôm còn sống trong thí nghiệm đã đào thải hết vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây nhiễm ban đầu (bảng 4).

Kết luận

Ở các nồng độ 5, 10, 15 và 20 µl, sản phẩm tỏi lên men không có hiệu quả diệt khuẩn cao. Ở nồng độ 25 và 30 µl, sản phẩm tỏi lên men có độ nhạy cao đối với cả 2 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.13.14.2 và *V. harveyi* KC.13.17.5 gây AHPND.

Trong điều kiện phòng thí nghiệm, bổ sung tỏi lên men với liều 15 ml/kg thức ăn/ngày vào thức ăn rồi bao ngoài bằng dầu mực cho tôm ăn trong 10 ngày liên tục có khả năng nâng cao tỷ lệ sống của tôm lên 53%, cao hơn nghiệm thức không sử dụng chất bao ngoài (51%), bao ngoài bằng bột nếp (42%) và cao hơn so với đối chứng dương tôm chỉ ăn thức ăn thường không bổ sung sản phẩm tỏi lên men (14%). Tỷ lệ sống của tôm ở các nghiệm thức bổ sung dịch tỏi lên men vào thức ăn so với tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung tỏi lên men vào thức ăn là có sự sai khác có ý nghĩa thống kê.

Kết quả nghiên cứu mở ra tiềm năng ứng dụng sản phẩm tỏi lên men để phòng trị AHPND cho tôm nuôi nước lợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] L. Tran, et al. (2013), "Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp", *Disease of Aquatic Organisms*, **105**, pp.45-55.

[2] C.F. Lo, et al. (2014), "Recent Advances in the newly emergent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)", *Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA9)*, p.72.

[3] L.T. Kwai, E.H. Ung, S.W. Choo, S.M. Yew, W.Y. Wee, K.P. Yap (2014), "An AP1, 2 & 3 PCR Positive non - *Vibrio parahaemolyticus* bacteria with AHPND histopathology", *Diseases in Asian Aquaculture (DAA9)*, p.77.

[4] Đặng Thị Lua, Nguyễn Việt Khuê, Phan Thị Vân (2016), "Non-

Vibrio parahaemolyticus gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **14**, tr.690-698.

[5] H. Kondo, et al. (2015), "Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam", *Genome Announc.*, **3(5)**, DOI:10.1128/genomeA.00978-15.

[6] L.P. Rees, et al. (1993), "A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*)", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **9(3)**, pp.303-307.

[7] M.A. Adetumbi, B.H.S. Lai (1986), "Inhibition of in-vitro germination and spherulation of *Coccidiodios immitis* by *Allium sativum*", *Curr. Microbiol.*, **13**, pp.73-76.

[8] M. Corzo-Martinez, N. Corzo, M. Villamiel (2007), "Biological properties of onions and garlic", *Trends in Food Science & Technology*, **18**, pp.609-625.

[9] Nguyễn Thị Hạnh, Đặng Thị Lua (2016), "Đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với một số vi khuẩn gây bệnh trên cá nuôi nước ngọt", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **22**, tr.100-104.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2006), *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests of bacteria isolate from aquatic animals*.

[11] Nguyễn Anh Tuấn (2009), "Thử nghiệm một số loại thảo dược trong phòng trị bệnh nhiễm khuẩn trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*)", *Kỷ yếu hội nghị khoa học và công nghệ tuổi trẻ các trường đại học và cao đẳng khối nông lâm ngư thủy toàn quốc*.

[12] Nicky B. Buller (2004), *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*, CABI Publishing.

[13] <https://enaca.org/?id=96>.

[14] Nguyễn Thị Hạnh, Đặng Thị Lua (2016), "Đánh giá khả năng diệt khuẩn của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với một số vi khuẩn gây bệnh trên tôm", *Khoa học công nghệ trong phát triển nuôi trồng thủy sản*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

[15] NACA (2012), *Asia pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (EMS)/ Acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS)*.