



DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.040

BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG LOẠI TRỪ VI KHUẨN GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP (AHPND) *Vibrio parahaemolyticus* BẰNG PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG HỆ SỢI NẤM TRONG HỆ THỐNG NUÔI TÔM

Trần Minh Long và Phạm Thị Hoa*

Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Phạm Thị Hoa (email: pthoa@hcmiu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 11/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

Title:

Efficiency of fungal mycelium application in aquaculture on eliminating *Vibrio parahaemolyticus* (pathogen) causing Acute hepatopancreatic necrosis disease

Từ khóa:

Bệnh hoại tử gan tụy cấp, hệ sợi nấm, nấm phân hủy gỗ, tôm thẻ chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus*

Keywords:

Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, fungal mycelium, *Vibrio parahaemolyticus* White-leg shrimp, Wood-decay fungi

ABSTRACT

The shrimp production in Vietnam is threaten by the outbreak of many diseases, especially Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* leading up to 100% mortality rate in a short period in shrimp farms. Applying fungal mycelium can be a new potential approach to counteract the disease with advantages of low cost and environmental friendly. In this study, mycelia system of *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus* and *Pycnoporus sanguineus* were used in the small-scale aquaculture system to examine the potential of applying fungal mycelium in controlling the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Penaeus vannamei* were challenged by adding *Vibrio parahaemolyticus* suspension at the concentration of 10^5 CFU/mL. The mycelia were applied into each *Penaeus vannamei* PL30-35 culture tanks with about 5 grams of substrate covered by fungal mycelium. The results shown that the *Pycnoporus sanguineus* mycelium can remove 99% of *V. parahaemolyticus* despite having low survival rate of the white leg shrimp, approximately 65% survived after challenging. Modifications needed to be applied to this design in order to maximize the potential and improve its performance in future researches.

TÓM TẮT

Ngành nuôi tôm ở Việt Nam đang bị đe dọa bởi sự bùng nổ của nhiều loại dịch bệnh, đặc biệt là bệnh hoại tử gan tụy do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra, tỉ lệ chết lên đến 100% trong thời gian ngắn ở các trang trại nuôi tôm. Việc sử dụng hệ sợi nấm kiểm soát dịch bệnh AHPND trên tôm với lợi thế chi phí thấp và thân thiện với môi trường là một phương pháp đầy tiềm năng. Trong nghiên cứu này, hệ sợi nấm gồm có *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus* và *Pycnoporus sanguineus* được sử dụng để kiểm tra khả năng kiểm soát vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Tôm được gây cảm nhiễm bằng cách thêm dịch huyền phù *Vibrio parahaemolyticus* ở nồng độ 10^5 CFU/mL. Khoảng 5 gam cơ chất bao phủ bởi các sợi tơ nấm được áp dụng trên từng bể nuôi tôm *Penaeus vannamei* PL30-35 riêng lẻ, mẫu tôm được thu để đánh giá khả năng kiểm soát vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của từng loại nấm. Kết quả cho thấy, hệ sợi nấm *Pycnoporus sanguineus* có khả năng loại bỏ 99% vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, mặc dù tỉ lệ sống của tôm thẻ chân trắng còn thấp, vào khoảng 65% sau thí nghiệm. Cần có thêm nhiều nghiên cứu nhằm tối đa hóa khả năng kiểm soát vi khuẩn gây bệnh AHPND trên tôm của hệ sợi nấm để có thể ứng dụng thực tế trong nuôi tôm.

Trích dẫn: Trần Minh Long và Phạm Thị Hoa, 2018. Bước đầu đánh giá khả năng loại trừ vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) *Vibrio parahaemolyticus* bằng phương pháp sử dụng hệ sợi nấm trong hệ thống nuôi tôm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 83-90.

1 GIỚI THIỆU

Bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm (EMS/AHPND) được gây ra do các chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* có chứa các gen quy định độc tố PirA và PirB tương tự như độc tố của *Photobacterium* spp (Han *et al.*, 2015). Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng hệ sợi nấm có khả năng loại bỏ một số loài vi khuẩn và kim loại nặng khỏi nước (Stamets, 2005; Stamets *et al.*, 2013). Tuy nhiên, hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu về việc sử dụng hệ sợi nấm trong kiểm soát mầm bệnh do vi khuẩn gây ra trên tôm. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích kiểm tra tính hiệu quả và tính khả thi của việc áp dụng hệ sợi nấm của 3 loài nấm phân hủy gỗ: *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus* và *Pycnoporus sanguineus* nhằm kiểm soát mầm bệnh trên tôm gây ra bởi *Vibrio parahaemolyticus* trong hệ thống nuôi trồng thủy sản.

Các loài nấm phân hủy gỗ được chọn sử dụng trong nghiên cứu này đều là những loài có thể dễ dàng được tìm thấy trong các gốc cây trong khu vực miền Nam Việt Nam. Các công dụng dịch khuẩn, ức chế khả năng phát triển của vi khuẩn của các loài nấm này cũng đã được nghiên cứu. Theo nghiên cứu của Pham *et al.* (2017), *Pycnoporus sanguineus* có khả năng ức chế sự phát triển của 7 chủng vi khuẩn bao gồm *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, và *Salmonella typhi*. Loài *Schizophyllum commune* có thể kiểm soát và ức chế 82% và 97.8% lượng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trong môi trường nuôi cấy lỏng sau lần lượt 6 và 8 giờ theo kết quả nghiên cứu của Ngo *et al.*, 2016. Ngoài ra, với khả năng ức chế và kiểm soát được sự sinh trưởng của một số loài vi khuẩn khác nhau như *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida parapsilosis* (Mustafa *et al.*, 2015) thì *Pleurotus ostreatus* cũng là một loài nấm có tiềm năng ứng dụng trong việc kiểm soát *V. parahaemolyticus* trong nghiên cứu này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Địa điểm nghiên cứu và nguồn gốc chủng khuẩn

Nghiên cứu này được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Thủy sinh Ứng dụng, Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. Ba loài nấm phân hủy gỗ mục khác nhau được sử dụng trong nghiên cứu này, bao gồm *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus* và *Pycnoporus sanguineus* được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Thủy sinh Ứng dụng. Chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây

bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease – AHPND) - VP2 được lấy từ Trung tâm Quan trắc môi trường và Bệnh thủy sản Nam Bộ (MCE) - Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 2 (RIA2), thành phố Hồ Chí Minh.

2.2 Nuôi cấy nấm

Ba chủng nấm đã được phân lập và nuôi cấy chủng thuần trên môi trường thạch khoai tây (PDA) (200 g/L khoai tây, 20 g/L d-glucose và 15 g/L bột rau câu) ở nhiệt độ phòng (25-26°C). Các chủng nấm được cấy truyền trên các đĩa môi trường PDA và ủ ở nhiệt độ phòng trước khi được sử dụng trong nghiên cứu này.

2.3 Chuẩn bị hệ thống sợi nấm trên cơ chất

Bã mía được thu thập, rửa sạch và sau đó được xử lý với 1% Ca(OH)₂ trong 24-48 giờ để ức chế sự phát triển của các loài vi khuẩn và nấm men không mong muốn, sau đó được rửa sạch bằng nước cất để loại bỏ lượng Ca(OH)₂ tồn dư trước khi được sấy khô ở 60-75°C. Sau 24 giờ sấy khô, bã mía được đưa vào túi vải bố bổ sung 1% (về khối lượng) thóc nấu chín để tăng hàm lượng chất dinh dưỡng của cơ chất nuôi cấy nấm. Các túi cơ chất được khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong 20 phút, và được lập lại ba lần để đảm bảo khử trùng hoàn toàn. Sau khi các túi được làm nguội ở nhiệt độ phòng (25-26°C), các chủng nấm được cấy vào các túi cơ chất bằng cách cắt các phần thạch PDA có chứa sợi nấm và chuyển vào từng túi riêng biệt. Sau ba tháng, sợi nấm của các chủng nấm sẽ bao phủ toàn bộ bề mặt và cơ chất của túi, và sẵn sàng để sử dụng trong các thí nghiệm. Phương pháp chuẩn bị và nuôi nấm trên cơ chất đã được tiến hành dựa theo phương pháp của Wuest and Royse, 1987 và của Ngo *et al.*, 2016.

2.4 Xác định đường cong tăng trưởng của *Vibrio parahaemolyticus*

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra bệnh AHPND được cấy truyền từ ống trữ đông (bảo quản bằng glycerol ở -80°C) vào môi trường thạch Tryptone Soya Agar (TSA) và môi trường lỏng Tryptone Soya Broth (TSB) bổ sung 2% NaCl. Đường cong sinh trưởng của chủng vi khuẩn được thực hiện để xác định điểm thích hợp nhất để tiến hành thí nghiệm gây cảm nhiễm trên tôm. 1 mL dịch huyền phù vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được chuyển vào 50 mL môi trường TSB và ủ ở 30°C. Mật độ quang (OD) của dịch huyền phù vi khuẩn được đo định kỳ sau 4, 5, 6, 7, 8 và 14 giờ ở bước sóng 600 nm bằng máy đo quang phổ. Dịch huyền phù vi khuẩn đã được trải trên môi trường TSA để kiểm chứng số lượng vi khuẩn có trong dịch huyền phù ngay tại các thời điểm của đường cong sinh trưởng.

2.5 Nuôi tôm ở điều kiện thí nghiệm chuẩn bị cho quy trình cảm nhiễm

Tôm post 10 ngày tuổi (PL10) *Penaeus vannamei* được mua từ trại sarn xuất giống ở tỉnh Vũng Tàu. Tôm thí nghiệm được nuôi trong bể composite 500 L với nước biển có độ mặn 20 ppt, pH 7,0-7,8 đến giai đoạn PL30-35. Tôm được cho ăn hai lần một ngày bằng thức ăn thương phẩm với các kích cỡ khác nhau dựa trên ngày tuổi của tôm. Tôm thẻ chân trắng sau đó được chuyển vào bể thủy tinh thí nghiệm để thích nghi trước với môi trường thí nghiệm.

2.6 Thí nghiệm xác định độc tính của sợi nấm trên PL10 *Penaeus vannamei*

Để kiểm tra các độc tố có thể được tạo ra bởi ba loại nấm khác nhau có thể ảnh hưởng đến tôm, thí nghiệm xác định độc tính của sợi nấm đã được tiến hành dựa trên cơ sở của nghiên cứu bởi Mentor *et al.* (2014) như sau: các nghiệm thức bao gồm từng nhóm 10 cá thể tôm được nuôi trong các bình chứa khác nhau chứa 500 mL nước biển có sục khí. Tôm được cho ăn thức ăn thương mại hai lần mỗi ngày. Cơ chất bã mía bao phủ bởi sợi tơ nấm được lấy ra từ các bao ủ nấm, và 5 gam cơ chất có chứa sợi nấm được chuyển sang các túi vải nhỏ. Mỗi túi được nhúng ngập hoàn toàn vào nước trong các bình có chứa 10 cá thể tôm. Bốn bình nuôi đã được chuẩn bị cho thí nghiệm, một bình được dùng làm đối chứng âm chỉ chứa tôm, trong khi các bình còn lại có các túi chứa lần lượt từng loại nấm khác nhau thuộc 3 loài *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus* và *Pycnoporus sanguineus*. Tôm được theo dõi tỉ lệ sống để đánh giá độc tính của các loại nấm.

2.7 Xác định nồng độ vi khuẩn thích hợp cho thí nghiệm cảm nhiễm

Thí nghiệm thăm dò đã được tiến hành để xác định nồng độ vi khuẩn thích hợp sử dụng trong nghiên cứu gây cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm. Nồng độ vi khuẩn được sử dụng trong thí nghiệm này được xác định bằng cách đo OD của dịch huyền phù vi khuẩn trước khi cảm nhiễm tại thời điểm được chọn từ đường cong tăng trưởng của vi khuẩn. Hai nồng độ được sử dụng cho thí nghiệm này là 10^7 và 10^6 CFU/mL. Mỗi nồng độ được tiến hành trên mười con tôm thẻ chân trắng (PL30-35) mỗi bình và được lặp lại 2 lần. Tỉ lệ sống của tôm được ghi nhận sau một ngày thí nghiệm.

2.8 Đánh giá hiệu quả của hệ sợi nấm ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Chuẩn bị bình thí nghiệm và áp dụng hệ sợi nấm

Các bình chứa nhỏ đã được chuẩn bị chứa 10 con tôm trong 500 mL nước biển độ mặn 20 ppt, có sục khí. Trong một giờ trước khi thử nghiệm bắt đầu, cơ

chất bã mía chứa sợi nấm đã được lấy ra và đưa vào túi vải, mỗi túi chứa 5 gam cơ chất, tương tự như thí nghiệm xác định độc tính của nấm.

Đánh giá hiệu quả của hệ sợi nấm

Năm nghiệm thức đã được chuẩn bị: cơ chất chứa tơ nấm từ ba loại nấm (*Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus*, và *Pycnoporus sanguineus*); đối chứng dương và đối chứng âm. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần. Các túi chứa sợi nấm được đưa vào các bình chứa một giờ trước khi thử nghiệm. 5 mL huyền phù vi khuẩn với nồng độ tương đương 10^5 CFU/mL được cảm nhiễm vào bình đối chứng dương và các bình nghiệm thức chứa hệ sợi nấm.

Tôm trong tất cả các bể được cho ăn hai lần mỗi ngày bằng thức ăn thương mại, số tôm chết sẽ được thu thập và ghi nhận. Tôm chết được lưu trữ trong Ethanol 70 độ. Thời gian thí nghiệm kéo dài trong bốn ngày. Mẫu nước từ bể được thu thập và trải trên đĩa thạch TCBS sau khi cảm nhiễm 2 giờ và vào ngày cuối cùng của thí nghiệm.

2.9 Kiểm tra sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp PCR

DNA tổng số được chiết tách từ mẫu mô tôm bằng cách sử dụng bộ kit DNA ISOLATE II (Công ty Bioline - Mỹ). Mẫu DNA được khuếch đại bằng phương pháp Multiplex PCR (Han *et al.*, 2015) sử dụng hai cặp mồi VpPirA và VpPirB để phát hiện đoạn gen PirA và PirB trong chuỗi DNA của *Vibrio parahaemolyticus* ở hai vị trí khác nhau: 284 và 392 bp. Hai đoạn mồi được sử dụng trong thí nghiệm này là: VpPirA-284F (5'-TGACTATTCTCACGATTGGGG-3'), VpPirA-284R (5'-CACGACTAGCGCCATTGTTA-3') và VpPirB-392F (5'-TGATGAAGTGATGGGTGCTC-3'), VpPirB - 392R (5'-TGTAAGCGCCGTTAACTCA-3'). Các sản phẩm PCR được chạy điện di trên agarose gel 1.6% bằng buffer Sodium Borate ở điện trường 80V trong 1 giờ. Sản phẩm PCR được nhuộm bằng thuốc nhuộm Gel Red và được soi dưới tia cực tím để hiển thị các band PCR nếu có.

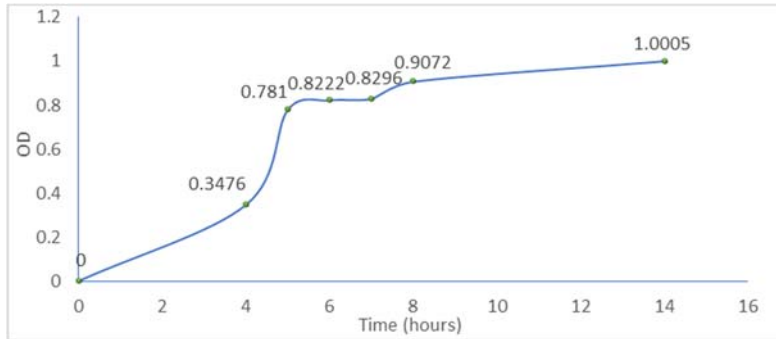
3 KẾT QUẢ

3.1 Quan sát quá trình tăng trưởng của chủng vi khuẩn

Sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được theo dõi thường xuyên từ giờ thứ tư sau khi tăng sinh bằng cách sử dụng máy quang phổ ở bước sóng 600 nm đo dịch huyền phù nuôi khuẩn. Các giá trị OD thu được được sử dụng để xây dựng đường cong tăng trưởng trình bày ở Hình 1. Kết quả cho thấy, pha log của *Vibrio parahaemolyticus* bắt đầu từ giờ thứ tư đến giờ thứ

nấm, trước khi bước vào pha cân bằng từ giờ thứ sáu trở đi. Dịch huyền phù vi khuẩn có giá trị OD từ 0.9 đến 1.0 được trải lên thạch TCBS để đếm mật độ vi

khẩn ngay tại thời điểm đó. Kết quả cho thấy, giá trị OD từ 0,9 đến 1,0 sẽ tương ứng với mật độ vi khuẩn khoảng 10^8 CFU/mL.

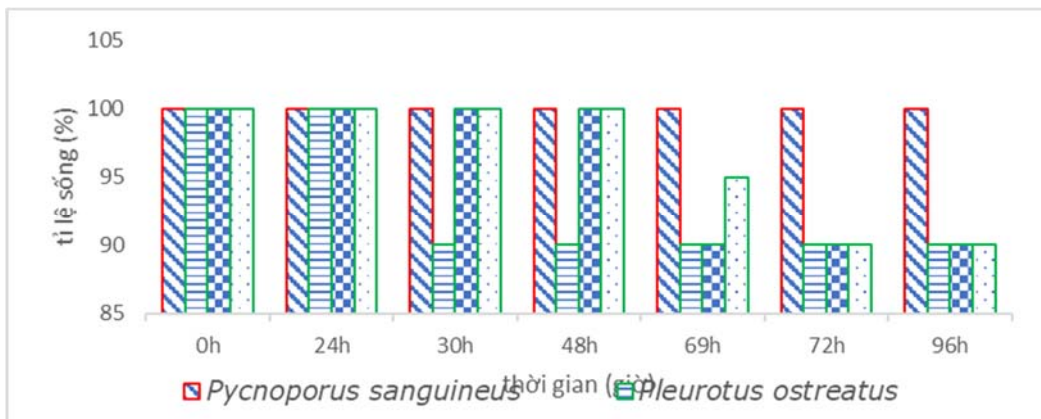


Hình 1: Đường cong tăng trưởng của *Vibrio parahaemolyticus* dựng từ kết quả đo OD ở 600nm (n=1)

3.2 Thí nghiệm xác định độc tính của các loại nấm khác nhau

Trong thí nghiệm độc tính, tôm được nuôi trong các bình chứa với các túi chứa cơ chất và sợi nấm của 3 loài nấm: *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus* và *Pycnoporus sanguineus*, và một bình

đối chứng âm không chứa nấm. Như kết quả trình bày trong Hình 2, tỉ lệ sống của tôm chân trắng rất cao vì chỉ có hai con tôm chết được tìm thấy trong các bình chứa của *Pleurotus ostreatus* và *Schizophyllum commune*, trong khi tôm còn lại trong tất cả các nghiệm thức đều khỏe mạnh sau 4 ngày.

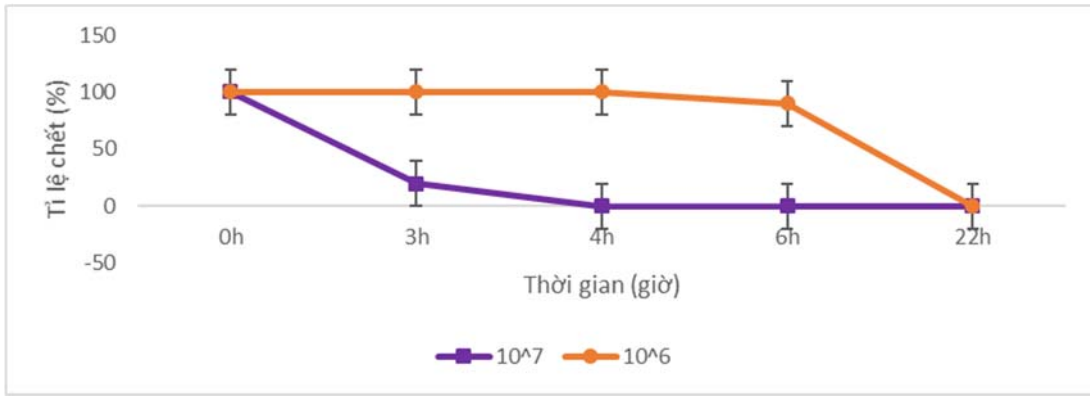


Hình 2: Tỉ lệ sống của tôm thẻ chân trắng PL10 sau bốn ngày sống trong nước ngâm giá thể chứa sợi nấm

3.3 Cảm nhiễm để xác định nồng độ vi khuẩn

Để xác định nồng độ vi khuẩn thích hợp cho thí nghiệm cảm nhiễm, hai nồng độ vi khuẩn đã được thử nghiệm, và sau 24 giờ đầu tiên, nồng độ có tỉ lệ

tôm chết cao hơn sẽ được chọn. Hai nồng độ này là 10^6 và 10^7 CFU/mL, bằng cách pha loãng dịch khuẩn ở nồng độ 10^8 CFU/mL mười và một trăm lần. Từ các kết quả được biểu hiện ở hình 3, nồng độ 10^6 CFU / mL đã được quyết định là phù hợp cho thí nghiệm vì có tỉ lệ tử vong cao sau một ngày.



Hình 3: Kết quả xác định nồng độ cảm nhiễm trên tôm thẻ chân trắng. Thí nghiệm được lặp lại hai lần với 10 tôm mỗi bể

3.4 Đánh giá hiệu quả bảo vệ của hệ sợi nấm kháng *Vibrio parahaemolyticus*

Ảnh hưởng của sợi nấm đến tỉ lệ sống của tôm thẻ chân trắng

Kết quả kiểm tra độc tính của cơ chất và sợi tơ nấm được trình bày trong Bảng 1. Tôm trong nghiệm thức đối chứng dương chết do AHPND sau 4 ngày thử nghiệm, trong khi tỉ lệ sống của đối chứng âm là 90% vào cuối thời gian thí nghiệm. Trong thí nghiệm này, tỉ lệ sống của tôm trong ba nghiệm thức đều trên 50%. Trong số đó, tỉ lệ sống của nghiệm thức chứa nấm *P.ostreatus* cao nhất

(khoảng 75%), trong khi tỉ lệ sống của *S. commune* và *P. sanguineus* là khoảng 65%. Tuy nhiên, xem xét kết quả được trình bày trong Bảng 1, mặc dù tỉ lệ sống cao nhưng chỉ có kết quả lúc 15 giờ có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức, và không có sự khác biệt đáng kể ($p > 0,05$) ở những thời điểm khác. Nghiệm thức sử dụng *P. ostreatus* và *P. sanguineus* khác biệt đáng kể so với đối chứng dương ($p < 0,05$), nhưng không khác với đối chứng âm ($p > 0,05$). Tuy nhiên, tỉ lệ sống của *S. commune* không có sự khác biệt đáng kể nào với cả hai đối chứng.

Bảng 1: Tỉ lệ sống của tôm trong thí nghiệm (%)

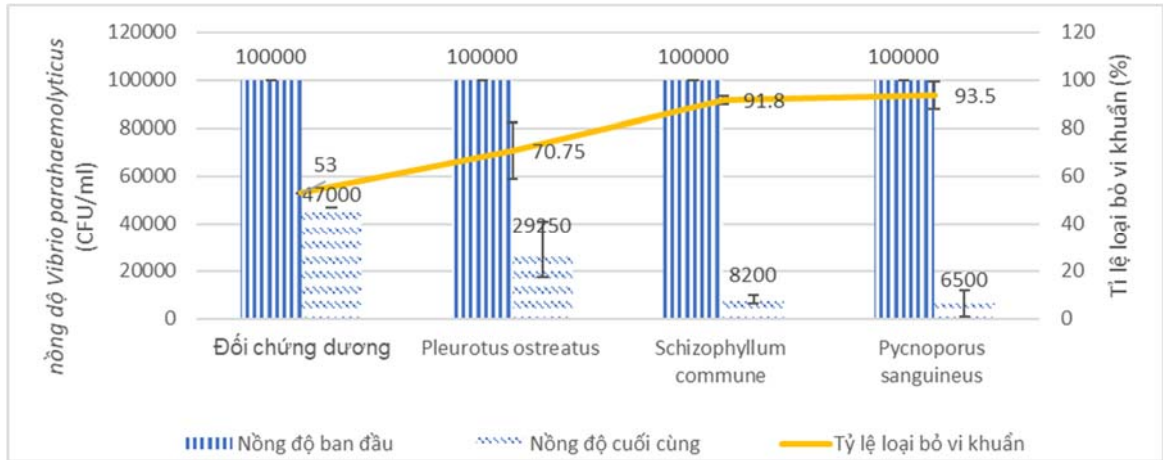
Thời gian (giờ)	Đối chứng dương	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Đối chứng âm
0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
10	80±0 ^{a1}	100±0 ^{a1}	90±14.14 ^{a1}	100±0 ^{a1}	100±0 ^{a1}
15	60±0 ^{a2}	95±7.07 ^{b2}	90±14.14 ^{ab2}	95±7.07 ^{b2}	100±0 ^{b2}
18	60±0 ^{a3}	85±7.07 ^{a3}	85±21.21 ^{a3}	95±7.07 ^{a3}	100±0 ^{a3}
36	40±0 ^{a4}	85±7.07 ^{a4}	70±42.43 ^{a4}	70±42.43 ^{a4}	95±7.07 ^{a4}
43	20±0 ^{a5}	80±14.14 ^{a5}	70±42.43 ^{a5}	70±42.43 ^{a5}	90±0 ^{a5}
60	20±0 ^{a6}	75±7.07 ^{a6}	70±42.43 ^{a6}	70±42.43 ^{a6}	90±0 ^{a6}
67	10±0 ^{a7}	75±7.07 ^{a7}	70±42.43 ^{a7}	70±42.43 ^{a7}	90±0 ^{a7}
84	0±0 ^{a8}	75±7.07 ^{a8}	65±49.50 ^{a8}	65±49.50 ^{a8}	90±0 ^{a8}
91	0±0 ^{a9}	75±7.07 ^{a9}	65±49.50 ^{a9}	65±49.50 ^{a9}	90±0 ^{a9}

*Số liệu được trình bày dưới dạng số trung bình ± độ lệch chuẩn (n=2); ^{a,b} biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) giữa các nghiệm thức trong cùng 1 thời gian

Khả năng ức chế vi khuẩn của sợi nấm trong môi trường nuôi trồng thủy sản

Trong thí nghiệm này, các mẫu nước được lấy tại hai thời điểm khác nhau và được trải địa tương tự như các thí nghiệm trước đó. Cụ thể, số lượng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đã giảm tới 93,5% với

sự hiện diện của *P. sanguineus*, cũng là tỉ lệ loại bỏ cao nhất. Trong khi nghiệm thức sử dụng cơ chất có tơ nấm *S. commune* cho thấy có tỉ lệ loại bỏ vi khuẩn lên đến 91,8%, thì tỉ lệ loại bỏ vi khuẩn của *P. ostreatus* chỉ là 70,75%, thấp nhất trong số ba loài nấm.

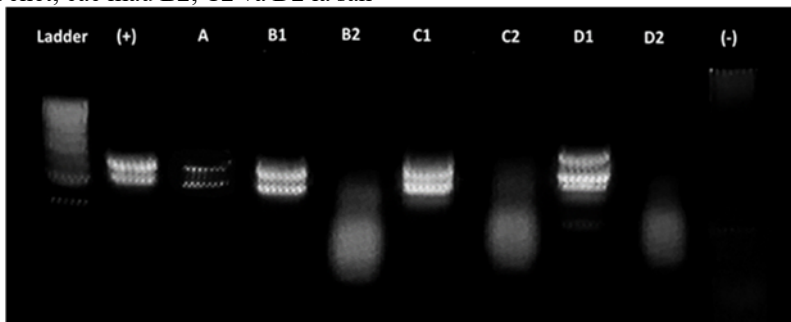


Hình 4: Khả năng loại bỏ vi khuẩn Vibrio parahaemolyticus sau khi kết thúc thí nghiệm

Kết quả PCR của thí nghiệm đánh giá hiệu quả loại bỏ *V. parahaemolyticus* của sợi nấm bằng phương pháp ngâm cơ chất nuôi nấm vào nước nuôi tôm

Kết quả quy trình Multiplex PCR xác định sự hiện diện của gene độc tố của *V. parahaemolyticus* trong cơ thể tôm trong tất cả các nghiệm thức được thể hiện trên Hình 5. Các band sản phẩm PCR được đánh số 1 và 2 đại diện cho loại mẫu tôm được sử dụng trong PCR. Các kí hiệu B1, C1, D1 là các mẫu PCR mô của tôm chết; các mẫu B2, C2 và D2 là sản

phẩm PCR mô tôm sống. Từ trái sang phải, các band PCR lần lượt là: thang 100 bp, chứng dương DNA (+) là DNA chiết tách từ các khuẩn lạc *Vibrio parahaemolyticus* lấy trực tiếp từ đĩa thạch TCBS, A là tôm từ các bể đối chứng có bổ sung *Vibrio parahaemolyticus* dùng làm đối chứng dương cho nghiệm thức cảm nhiễm, B1 và B2 là các bể chứa các sợi nấm *Pleurotus ostreatus*, C1 và C2 là chứa *Schizophyllum commune*, D1 và D2 là các bể chứa *Pycnoporus sanguineus*, và (-) là DNA chiết tách từ tôm khỏe mạnh sử dụng cho nghiên cứu



Hình 5: Kết quả PCR định danh Vibrio parahaemolyticus trên tôm sống và chết trong thí nghiệm

Kết quả cho thấy rõ ràng trong thí nghiệm này chỉ có tôm chết là mang mầm bệnh vi khuẩn với 2 band rõ rệt ở vị trí 284 và 392 bp; trong khi sản phẩm PCR của các mẫu còn lại không có band ở vị trí đó, cho thấy chúng không bị ảnh hưởng bởi mầm bệnh.

4 THẢO LUẬN

Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm cho thấy, liều lượng thích hợp để gây nhiễm tôm thẻ chân trắng với *Vibrio parahaemolyticus* là 10^7 CFU / mL, tương ứng với kết quả OD bằng 0,9. Theo Joshi et al. (2014), mật độ vi khuẩn cảm nhiễm thông thường dao động từ 10^5 đến 10^6 CFU/mL. Khi thực hiện thí nghiệm, OD của dịch vi khuẩn là khoảng 0,9 nhưng cho dịch vào bể nuôi, kết quả đếm đĩa cho thấy mật

độ là 10^5 CFU/mL. Nồng độ này thấp hơn mật độ vi khuẩn sử dụng trong thí nghiệm cảm nhiễm, nhưng nó vẫn được chấp nhận dựa trên các thí nghiệm từ các nghiên cứu khác.

Để kiểm tra tính khả thi của việc áp dụng sợi nấm, việc thử nghiệm độc tính đã được thực hiện để đánh giá tác động lên tôm của các hợp chất sinh học được bài tiết bởi nấm trên cơ chất. Tuy nhiên, có thể thấy rõ từ kết quả của thử nghiệm này rằng các hợp chất đó không gây ra bất kì tác động rõ ràng nào đối với tôm, suy từ tỉ lệ sống cao của tôm sau khi thử nghiệm độc tính.

Đặc tính kháng khuẩn của nấm *Pleurotus ostreatus* và nấm *Schizophyllum commune* đã được

chứng minh trong các nghiên cứu của Iwalokun *et al.* (2007), và Mirfat *et al.* (2014). Tương tự, *Pycnoporus sanguineus* đã được báo cáo là có hoạt tính kháng khuẩn đối với nhiều loài vi khuẩn trong nghiên cứu của Smfinia (1995). Kết quả nghiên cứu đã chứng minh tính kháng khuẩn của ba loại nấm dùng trong nghiên cứu này.

Trong thí nghiệm ngâm trực tiếp sợi nấm, tỉ lệ sống của tôm trong các nghiệm thức cao đáng kể. Trong khi tất cả tôm trong nghiệm thức đối chứng dương đã chết sau 4 ngày thí nghiệm, tôm trong ba nghiệm thức xử lí với nấm thì tôm có tỉ lệ sống lên đến 75%. Tuy nhiên, các phân tích thống kê chỉ ra rằng không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức có nấm và đối chứng dương và âm trong thời gian thí nghiệm ngoại trừ thời điểm 15 giờ. Tỉ lệ sống của tôm ở hai nghiệm thức *P. ostreatus* và *P. Sanguineus* khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng dương ($p < 0,05$), nhưng không khác biệt với đối chứng âm ($p > 0,05$). Tuy nhiên, tỉ lệ sống của tôm trong nghiệm thức sử dụng *S. commune* không cho thấy sự khác biệt đáng kể nào so với cả hai nhóm đối chứng. Theo kết quả đó, các chất sinh ra bởi sợi tơ nấm của hai loài nấm *P. ostreatus* và *P. sanguineus* có thể kiểm soát sự phát triển của mầm bệnh bằng phương pháp ngâm và giữ tôm khỏe mạnh, nhưng sợi nấm của *S. commune* không có hiệu quả. Sau 4 ngày thí nghiệm, không chỉ tỉ lệ sống của tôm là tương đối cao (65-75%), mà tỉ lệ loại bỏ mầm bệnh cũng tương đối cao (từ 70-93%). Trong khi tỉ lệ loại bỏ mầm bệnh của *P. sanguineus* và *S. commune* lớn hơn 90%, thì tỉ lệ loại bỏ mầm bệnh của *P. ostreatus* chỉ là 75%. Đáng chú ý là tuy tỉ lệ loại bỏ vi khuẩn của *P. ostreatus* không tốt hơn so với hai loài nấm còn lại, nhưng tỉ lệ sống của tôm là cao nhất và ổn định nhất trong số ba loài nấm. Điều này có thể do tác động của các hợp chất sinh học được bài tiết bởi loài nấm này, có khả năng ức chế vi khuẩn ở mức độ thấp hơn hai loài kia, nhưng không làm ảnh hưởng nhiều đến sự sinh trưởng của tôm. Hơn nữa, kết quả PCR cho thấy rằng chỉ tôm chết trong thí nghiệm này mới nhiễm *V. parahaemolyticus* (Hình 5), trong khi tôm sống được thu thập từ các bể để chạy PCR cho thấy không có các band trên gel, nghĩa là chúng không bị nhiễm AHPND.

Các thí nghiệm sử dụng sợi nấm trong điều trị bệnh AHPND ở tôm nuôi nên được thực hiện trong tương lai để có thể ứng dụng thực tế trong nuôi tôm.

5 KẾT LUẬN

Tóm lại, các thí nghiệm trong nghiên cứu này sử dụng hệ sợi nấm trên cơ chất cho thấy tiềm năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh trong môi trường nước bằng cách ngâm trực tiếp cơ chất

có tơ nấm vào nước nuôi tôm. Trong số ba loại nấm phân hủy gỗ được sử dụng trong nghiên cứu này, thì nghiệm thức sử dụng *Pycnoporus sanguineus* và *Pleurotus ostreatus* là những nghiệm thức có tỉ lệ tôm sống cao nhất và hiệu quả ức chế hoạt động của mầm bệnh tốt nhất trong 15 giờ thí nghiệm ($p < 0,05$).

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về hướng xử lí vi khuẩn gây bệnh trên môi trường nước nuôi thủy sản. Mục tiêu chính của nghiên cứu nhằm tìm ra các loại hệ sợi nấm phân hủy gỗ không độc hại cho tôm mà vẫn có thể ức chế được mầm bệnh *V. parahaemolyticus*, tuy nhiên vì tốc độ mọc của các loài nấm trên cơ chất còn rất chậm và số lượng cơ chất thu hoạch còn khá ít, do đó hạn chế của đề tài là chỉ có thể tiến hành được trên quy mô nhỏ. Chính vì vậy, các nghiên cứu tìm hiểu về phương pháp cải tiến và phát triển quy trình chế tạo màng lọc sinh học từ tơ nấm trên cơ chất đang được tiến hành nhằm đẩy mạnh hiệu suất sản xuất cơ chất chứa sợi tơ nấm cho hiệu suất xử lí vi khuẩn gây bệnh cao và hiệu quả hơn hiện tại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Han J. E., Tang K. F. J., Tran L. H., và Lightner D. V., 2015. Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113(1), 33-40.
- Iwalokun B.A., Usen U.A., Otunba A.A., Olukoya D.K., 2007, Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African J Biotech*, 6 (15), 1732-1739.
- Joshi J., Srisala J., Truong V., Chen I., Nuangsaeng B., Suthienkul O., Lo C., Flegel T., Sritunyaluksana K. và Thitamadee S., 2014, Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 428-429, 297-302.
- Mentor R. H., Blagica J, Tatjana K. P., 2014, Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model, *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60 (1), 9-18.
- Mirfat A. H. S., Noorlidah A., Vikineswary S., 2014, Antimicrobial activities of split gill mushroom *Schizophyllum commune* Fr. - *American Journal of Research Communication*, 2(7): 113-124
- Mustafa N. O., Sajid S. S. A. S., and Idham A. A. A., 2015, Antimicrobial Activity of Mycelia of Oyster Mushroom Species (*Pleurotus* spp.) and their Liquid Filtrates (In Vitro), *Journal of Medical and Bioengineering*, Vol. 4, No. 5, 376-380

- Ngo N.V., Pham V. K. N., Pham T. H., 2016, Antibacterial activity of three wild wood-decaying fungi in Southern Vietnam toward *Vibrio parahaemolyticus* bacterium in Aquaculture wastewater. *Journal of Biotechnology*, 14(4). 705-712
- Pham T. H., Ngo N. V., Tham T. P. L., 2017, Evaluating the anti-bacterial activity of mycelium extract from different wood-decay-fungus species collected in Southern Vietnam, *Journal of Biotechnology*, 15(4), 711-720
- Smfina A, Monache F.D., Smfina E.F.A., Gil M.L., Benchetrit L.C., Cruz F.S., 1995, Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr., *Journal of Ethnopharmacol*, 45, 177-181.
- Stamets P., 2005, *Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World*, 1st edition, Ten Speed Press, United States of America, 356 pages.
- Wuest P.J., Royse D. J., 1987, *Cultivating Edible Fungi: International Symposium on Scientific and Technical Aspects of Cultivating Edible Fungi (DEVELOPMENTS IN CROP SCIENCE)*. Elsevier Science Ltd, United Kingdom, 677 pages, page 435.