

ẢNH HƯỞNG CỦA MẬT ĐỘ VI KHUẨN *Streptomyces* DH3.4 LÊN ENZYME TIÊU HÓA VÀ TĂNG TRƯỞNG CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Vũ Hùng Hải*, Phạm Thị Tuyết Ngàn, Vũ Ngọc Út, Huỳnh Trường Giang

Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ: vhhai@ctu.edu.vn

Nhận bài: 25/05/2021 Hoàn thành phản biện: 08/06/2021 Chấp nhận bài: 15/06/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4 lên chất lượng nước, vi khuẩn đường ruột, enzyme tiêu hóa và tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tôm thẻ chân trắng với trọng lượng trung bình $0,48 \pm 0,01$ g được chọn để bố trí thí nghiệm với 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức với 3 lần lặp lại bao gồm (i) Tôm được cho ăn thức ăn không bổ sung khuẩn (Đôi chứng) và thức ăn có bổ sung vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4 tương ứng với 3 mật độ (ii) 10^6 , (iii) 10^7 và (iv) 10^8 CFU/kg trong 63 ngày. Kết quả cho thấy các thông số chất lượng nước bao gồm nhiệt độ, pH, DO, COD, TSS, độ kiềm, TAN và $N-NO_2^-$ ở các nghiệm thức bổ sung khuẩn và đôi chứng không có sự chênh lệch đáng kể. Mật độ vi khuẩn *Streptomyces* sp. trong ruột tôm ở nhóm bổ sung vi khuẩn cao hơn có ý nghĩa so với đôi chứng. Nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4 ở mật độ 10^7 và 10^8 CFU/kg giúp giảm đáng kể mật độ tổng khuẩn *Vibrio* sp. trong ruột tôm. Các enzyme tiêu hóa như α -amylase, β -galactosidase, protease và *Leu*-aminopeptidase ở nhóm bổ sung vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4 đạt hoạt tính cao nhất ở cả hai nhóm bổ sung mật độ 10^7 và 10^8 CFU/kg. Tăng trưởng về khối lượng (WG), tốc độ tăng trưởng tương đối (DWG) và tốc độ tăng trưởng tuyệt đối (SRG) về khối lượng khác biệt không đáng kể giữa các nghiệm thức. Tuy nhiên, tỉ lệ sống, sinh khối của tôm và chỉ số FCR ở các nghiệm thức bổ sung *Streptomyces* DH3.4 được cải thiện đáng kể, đặc biệt là nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4 ở mật độ 10^7 CFU/kg.

Từ khóa: *Litopenaeus vannamei*, Vi khuẩn đường ruột, Enzyme tiêu hóa, Tăng trưởng, *Streptomyces*

EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF *Streptomyces* DH3.4 ON DIGESTIVE ENZYME AND GROWTH PERFORMANCE OF WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

Vu Hung Hai*, Pham Thi Tuyen Ngan, Vu Ngoc Ut, Huynh Truong Giang

Can Tho University

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of dietary supplementation of *Streptomyces* DH3.4 on water quality, intestinal bacteria, digestive enzyme activities and growth performance of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Shrimp with initial weight of 0.48 ± 0.01 g were designed in 4 treatments with 3 replicates including (i) Shrimp fed a basic diet without bacteria supplementation (control group) and 3 *Streptomyces* DH3.4 supplementation diets at dose of (ii) 10^6 , (iii) 10^7 and (iv) 10^8 CFU/kg for 63 days. The results showed that the water quality parameters including temperature, pH, DO, COD, TSS, total alkalinity, TAN and $N-NO_2^-$ were not significantly different among treatments. *Streptomyces* counts in the digestive tract of shrimp fed diets containing *Streptomyces* DH3.4 were significantly higher than the control. Furthermore, supplementation of 10^7 and 10^8 CFU/kg decreased considerably total *Vibrio* counts in the shrimp's digestive tract. The digestive enzymes such as α -amylase, β -galactosidase, protease and *Leu*-aminopeptidase were improved and reached the highest activities in *Streptomyces* DH3.4 supplementation diet treatments of 10^7 and 10^8 CFU/kg. Growth performance parameters regarding weight gain (WG), daily weight gain (DWG) and specific growth rate (SRG) were not significantly different among treatments. However, survival rates, shrimp biomass and FCR in diets containing *Streptomyces* DH3.4 were improved significantly, especially in 10^7 CFU/kg treatment.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, Intestinal bacteria, Digestive enzyme, Growth performance, *Streptomyces*

1. MỞ ĐẦU

Tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* là đối tượng nuôi phổ biến ở nước ta. Theo thống kê của VASEP (2021), sản lượng tôm nước lợ của cả nước trong 3 tháng đầu năm 2021 đạt 124,8 nghìn tấn, đạt 13,8% so với kế hoạch năm 2021; trong đó tôm thẻ chân trắng đạt 77,7 nghìn tấn, tăng 8,6% so với cùng kỳ năm trước. Diện tích tôm thả nuôi ước tính đạt khoảng 508 nghìn ha, trong đó diện tích tôm thẻ chân trắng là 21 nghìn ha. Tuy nhiên, diện tích tôm nuôi theo hướng thâm canh hóa và bán thâm canh tăng cao dẫn đến tích lũy vật chất hữu cơ trong ao, là nguyên nhân chủ yếu gây suy giảm chất lượng nguồn nước ao nuôi và tạo cơ hội cho dịch bệnh bùng phát (Hossain và cs., 2013). Vì vậy, cần có giải pháp cải thiện chất lượng môi trường nuôi mà không ảnh hưởng đến động vật thủy sản và đảm bảo an toàn sức khỏe của con người. Hiện nay, việc sử dụng probiotic trong nuôi trồng thủy sản nhằm khắc phục những vấn đề trên là một giải pháp đang được ứng dụng rộng rãi (Ringø, 2020). Theo Bao & Shen (2005), hệ thống nuôi thủy sản bền vững cần có sự hiện diện của nhóm lợi khuẩn probiotics với đặc tính không gây độc tố, không tồn lưu, không kháng kháng sinh và có khả năng phục hồi sinh học, cũng như tăng hệ miễn dịch của vật nuôi, giảm stress và duy trì trạng thái cân bằng của hệ sinh thái thủy vực. Trong số các chủng lợi khuẩn, *Streptomyces* là vi khuẩn gram dương thuộc bộ Actinomycetales được tìm thấy ở hầu hết các các thủy vực và trong đất (Pathom-Aree và cs., 2006), nhóm vi khuẩn này có khả năng tiết ra nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao (Tan và cs., 2016). Hơn nữa, xạ khuẩn tham gia vào các quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ nhờ các hoạt chất enzyme như protease, amylase, cellulase... góp phần khép kín vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên (Prakash và cs., 2013). Thực

tế, khoảng 70% các hoạt chất kháng sinh có nguồn gốc từ xạ khuẩn actinomycetes (Pimentel-Elardo và cs., 2010). Tuy nhiên, các đặc tính probiotic của chủng *Streptomyces* lên các đối tượng thủy sản chưa có nhiều nghiên cứu sâu. Do đó, thí nghiệm được tiến hành nhằm đánh giá các tác động có lợi và xác định liều lượng tối ưu của việc bổ sung vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4 lên chất lượng nước, enzyme tiêu hóa và tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4

Chủng *Streptomyces* DH3.4 sử dụng trong nghiên cứu được phân lập từ bùn ao nuôi tôm với đặc tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* và hoạt tính enzyme ngoại bào cao (Phạm Văn Nhuận, 2020). Chủng *Streptomyces* DH3.4 được phục hồi và nuôi trên đĩa Starch Casein Agar (SCA, gồm 10g Soluble Starch, 0,3g Casein, 2g KNO₃, 0,05g MgSO₄.7H₂O, 2g K₂HPO₄, 15g NaCl, 0,02g CaCO₃, 0,01g FeSO₄.7H₂O, 15g Agar và 1L nước cất) ở 30 °C. Sau 7 ngày, hút 3 mL nước muối sinh lý tiệt trùng (0,9% NaCl) và 1 giọt dung dịch 0,1% Tween 80 (chất hoạt động bề mặt) vào đĩa để tách bào tử trên khuẩn lạc (El-Shatoury và cs., 2020). Dung dịch bào tử *Streptomyces* DH3.4 được thu thập và xác định giá trị OD=0,2 ở bước sóng 540 nm (Sengupta & Paul, 1992). Mật độ *Streptomyces* sp. được xác định trên môi trường SCA bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (APHA, 2017) và bảo quản lạnh 4°C cho đến khi trộn vào thức ăn thí nghiệm.

2.2. Chuẩn bị thức ăn thí nghiệm

Thức ăn viên công nghiệp Nasa 2202 (40% hàm lượng đạm thô, 6% lipid thô và 4% tro; CP Group Co., Ltd., Việt Nam)

được sử dụng trong thí nghiệm. Phun đều 10 mL huyền phù *Streptomyces* DH3.4 ở nồng độ 10^8 CFU/mL lên thức ăn và trộn liên tục để đạt nồng độ lần lượt 10^6 , 10^7 và 10^8 CFU/kg thức ăn. Sau đó, thức ăn được để khô ở nhiệt độ phòng ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) trong 30 phút và bảo quản ở 4°C . Thức ăn ở mỗi thí nghiệm thức được chuẩn bị lại mỗi tuần và mật độ *Streptomyces* sp. trong thức ăn được kiểm tra trên môi trường SCA trước khi cho ăn.

2.2. Bố trí thí nghiệm

Tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* được thuần dưỡng ở độ mặn 15‰ trong bể 4 m^3 ở $28 \pm 1^\circ\text{C}$ khoảng 2 tuần tại khu Trại thực nghiệm, khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ. Trong thời gian thuần hóa, tôm được cho ăn 2 lần mỗi ngày bằng thức ăn viên công nghiệp Nasa 2202 với tỉ lệ 5% trọng lượng thân. Tôm khỏe không mang mầm bệnh (SPF, Specific Pathogen Free) có khối lượng trung bình $0,48 \pm 0,01$ g được chọn để bố trí ngẫu nhiên vào bể 500 lít, với mật độ 100 con/bể. Thí nghiệm được thiết kế gồm 4 thí nghiệm thức với 3 lần lặp lại bao gồm (i) Tôm được cho ăn thức ăn không bổ sung khuẩn (Đối chứng) và thức ăn được bổ sung *Streptomyces* DH3.4 ở 3 liều lượng khác nhau (ii) 10^6 , (iii) 10^7 và (iv) 10^8 CFU/kg) trong 63 ngày. Tần suất cho tôm ăn là 3 lần/ngày vào lúc 8:00, 11:00 và 17:00 với khẩu phần 3 - 5% khối lượng tôm. Lượng thức ăn thừa được thu lại sau 1 giờ cho ăn và sấy khô ở 80°C trong 24 giờ để xác định hệ số chuyển hóa thức ăn FCR mỗi ngày. Hệ thống bể nuôi được sục khí liên tục để duy trì hàm lượng oxy ở mức trên 4 mg/L. Vật chất lắng và phân tôm được siphon định kỳ 3 ngày/lần, sau đó cấp bù lại lượng nước đã thất thoát.

2.3. Phương pháp thu và phân tích mẫu

Các thông số nhiệt độ, pH và hàm lượng oxy hòa tan (DO) được theo dõi mỗi ngày (8:00 và 16:00) bằng máy đo đa chỉ

tiêu HI9828 (Hanna, Rumani). Mẫu nước được thu định kỳ 7 ngày/lần và phân tích các chỉ tiêu độ kiềm, COD, tổng chất rắn lơ lửng (TSS), tổng đạm amon (TAN), nitrite (N-NO_2^-) theo phương pháp chuẩn (APHA, 2017). Sau 63 ngày nuôi, tôm ở mỗi thí nghiệm thức không được cho ăn trong 24 giờ để thu mẫu ruột, sau đó ruột tôm được nghiền và pha loãng với nước muối sinh lý tiệt trùng (0,9% NaCl) để đạt nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} và 10^{-3} . 100 μL mẫu ở mỗi nồng độ được cấy lên môi trường TCBS (Himedia, Mumbai, India) và SCA để xác định mật độ vi khuẩn *Vibrio* và vi khuẩn *Streptomyces* trong ruột tôm. Tương tự, phần ruột giữa của tôm được tách và nghiền trong ống eppendorf chứa 700 μL dung dịch PBS vô trùng. Sau đó, mẫu được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút, ở 4°C trong 10 phút. Phần dung dịch nổi sẽ được sử dụng để xác định hoạt tính enzyme tiêu hóa. Hoạt tính α -amylase được phân tích theo mô tả Bernfeld (1955), hoạt tính β -galactosidase, protease và leu-aminopeptidase được xác định theo các phương pháp được mô tả bởi Huỳnh và cs. (2018). Nồng độ tổng protein được xác định bằng phương pháp Bradford (1976) và Bovine serum albumin (BSA) được sử dụng để làm chuẩn protein. Hoạt tính enzyme được tính toán và thể hiện dưới dạng Units/mg protein. Số lượng và khối lượng tôm được ghi nhận để đánh giá tăng trưởng về khối lượng (WG), tốc độ tăng trưởng tuyệt đối (DWG), tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR) về khối lượng, sinh khối và tỉ lệ sống (SR) theo công thức sau:

- $\text{WG (g)} = W_1 - W_2$
- $\text{DWG (g/ngày)} = \frac{W_1 - W_2}{T}$
- $\text{SGR (\%/ngày)} = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{T} \times 100$
- $\text{SR (\%)} = \frac{\text{Số lượng tôm thu}}{\text{Số lượng tôm bố trí}} \times 100$

$$B \text{ (Kg/m}^3\text{)} = \frac{\text{Sản lượng tôm mỗi bể}}{\text{Thể tích bể (m}^3\text{)}}$$

$$\text{FCR} = \frac{W_F}{W_2 - W_1}$$

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được tính toán giá trị trung bình và sai số chuẩn (Mean \pm SE) bằng phần mềm Excel 2013. Sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức được phân tích ANOVA một nhân tố với phép thử Tukey bằng phần mềm SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các thông số chất lượng nước

- Nhiệt độ, pH, và DO

Các thông số nhiệt độ, pH và hàm lượng oxy hòa tan (DO) trong thí nghiệm được trình bày trong Bảng 1. Nhiệt độ giữa các nghiệm thức dao động trung bình trong khoảng 28,4 - 28,5°C và có biên độ dao động ngày đêm không quá 1°C. Theo Ponce-Palafox và cs. (1997), tôm *L.*

vannamei có ngưỡng nhiệt độ cao và tối ưu trong khoảng 25 - 35°C. Giá trị pH giữa các nghiệm thức chênh lệch không đáng kể, với giá trị trung bình 8 - 8,1 và dao động không quá 0,5 đơn vị trong ngày. Giá trị pH có xu hướng giảm theo chu kỳ nuôi, và giá trị pH dưới 7 có thể gây suy giảm chất lượng nước và tăng trưởng của tôm (Furtado và cs., 2011). Do đó, giá trị pH được khuyến cáo trong khoảng 7,5 - 8,5 và dao động trong ngày không quá 0,5 đơn vị (Chanratchakool và cs., 1995). Bên cạnh đó, hàm lượng DO duy trì ổn định trong ngưỡng lý tưởng (lớn hơn 5 mg/L) cho sự tăng trưởng của tôm *L. vannamei* (Van Wyk & Scarpa, 1999). Vào cuối giai đoạn thí nghiệm do sinh khối tôm và hàm lượng vật chất hữu cơ cao dẫn đến DO trong nước giảm dưới hàm lượng khuyến cáo, nhưng không ảnh hưởng đáng kể đến tăng trưởng của tôm. Nhìn chung, các thông số nhiệt độ, pH và hàm lượng DO nằm trong ngưỡng thích hợp cho tôm và khác biệt không đáng kể giữa các nghiệm thức ($p > 0,05$).

Bảng 1. Các thông số chất lượng nước ở các nghiệm thức cho ăn lợi khuẩn *Streptomyces* DH3.4

| Thông số | Nghiệm thức | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Đối chứng | 10 ⁶ CFU/kg | 10 ⁷ CFU/kg | 10 ⁸ CFU/kg |
| Nhiệt độ (°C) | 28,5 \pm 0,2 ^{1a} | 28,4 \pm 0,2 ^a | 28,4 \pm 0,1 ^a | 28,4 \pm 0,1 ^a |
| pH | 8,1 \pm 0,1 ^a | 8,1 \pm 0,1 ^a | 8 \pm 0,1 ^a | 8 \pm 0,1 ^a |
| DO (mg/L) | 5,1 \pm 0,11 ^a | 5,07 \pm 0,15 ^a | 5,02 \pm 0,17 ^a | 4,97 \pm 0,19 ^a |
| COD (mg/L) | 71,6 \pm 8,1 ^a | 65,4 \pm 8,3 ^a | 67,8 \pm 9,3 ^a | 68,3 \pm 8,9 ^a |
| Độ kiềm (mg CaCO ₃ /L) | 124,2 \pm 7,1 ^a | 122 \pm 7 ^a | 121,6 \pm 7,1 ^a | 122,1 \pm 6,7 ^a |
| TSS (mg/L) | 111,8 \pm 13,5 ^a | 107,2 \pm 12,5 ^a | 110,4 \pm 13,5 ^a | 112,3 \pm 13,6 ^a |

¹Sai số chuẩn (n = 3). ^a: Các giá trị trong cùng một hàng có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

- Tiêu hao oxy hóa học (COD), độ kiềm và chất rắn lơ lửng (TSS)

Các kết quả theo dõi cho thấy hàm lượng COD dao động trung bình 65,4 - 71,6 mg/L và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) giữa các nghiệm thức (Bảng 1). Trái ngược với kết quả hiện tại, trong nghiên cứu của Phạm Văn Nhuận (2020) bổ sung *Streptomyces* TV1.4, CM2.4 và DH3.4 trực tiếp vào nước nuôi tôm ở liều

lượng 10⁵ CFU/mL cho thấy COD sau 60 ngày theo dõi dao động trung bình 52,85 - 61,49 mg/L, thấp so với nghiệm thức đối chứng (67,44 \pm 6,3 mg/L). Theo Boyd (1998) COD là chỉ số đánh giá mức độ dinh dưỡng của nước ao và nồng độ COD của nước ao có thể biến động từ 10 - 20 mg/L, thông thường thì dao động 40 - 80 mg/L.

Tương tự, độ kiềm giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê

($p > 0,05$) với giá trị trung bình $122,5 \pm 0,6$ mgCaCO₃/L (Bảng 1). Cùng với sự tích tụ vật chất hữu cơ trong nước thì độ kiềm có xu hướng giảm vào cuối giai đoạn thí nghiệm. Theo Ebeling và cs. (2006), độ kiềm trong hệ thống nuôi giảm mạnh do quá trình đồng hóa carbon vô cơ bởi nhóm vi khuẩn dị dưỡng và vi khuẩn nitrate hóa, nhóm tác giả đề nghị độ kiềm nên được duy trì 100 - 150 mg/L đối với các hệ thống nuôi không thay nước.

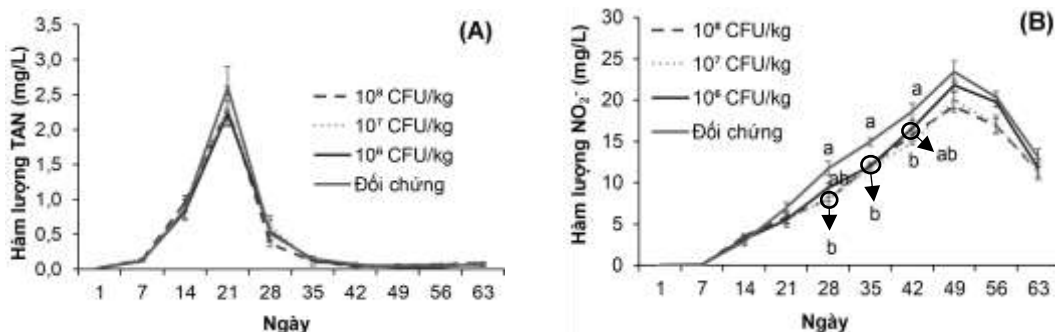
Hàm lượng TSS ở các nghiệm thức tích lũy cao theo thời gian thí nghiệm với giá trị trung bình cao hơn 100 mg/L và không có sự khác biệt ý nghĩa ($p > 0,05$) giữa các nghiệm thức (Bảng 1). Theo nhận định của Schweitzer và cs. (2013), quá trình nitrate hóa trong hệ thống nuôi diễn ra chậm khi hàm lượng TSS nhỏ hơn 200 mg/L và ở mức lớn hơn 800 mg/L gây cản trở hô hấp và giảm tỉ lệ sống của tôm nuôi. Nhìn chung, các thông số COD, độ kiềm và TSS trong thí nghiệm hiện tại không gây hại đến tăng trưởng của tôm thí nghiệm.

- Tổng đạm amon (TAN) và Nitrite (N-NO₂⁻)

Hình 1A cho thấy TAN có xu hướng tăng nhanh trong giai đoạn đầu thí nghiệm, đạt giá trị trung bình $2,375 \pm 0,08$ mg/L vào ngày nuôi 21. Sau đó, TAN giảm mạnh đến ngày nuôi 35 với giá trị trung bình là $0,12 \pm 0,02$ mg/L trước khi duy trì ổn định trong khoảng 0,034 - 0,092 mg/L vào cuối giai đoạn thí nghiệm. Điều này cho thấy sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa đạm ammonia (ammonia oxidizing bacteria, AOB) trong hệ thống oxi hóa ammonia

thành nitrite (N-NO₂⁻). Kết quả thống kê ở các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) trong quá trình theo dõi. Hàm lượng TAN trong ngưỡng 0,2 - 2 mg/L được cho là lý tưởng cho tôm nuôi sinh trưởng (Chanratchakool, 2003). Một nghiên cứu trước đây cho rằng giá trị LC50 - 48 giờ của ammonia lên tôm *L. vannamei* ở giai đoạn PL25 lên đến 39,7 mg/L ở độ mặn 10‰ (Schuler và cs., 2010). Kết quả thống kê cho thấy TAN trong thí nghiệm hiện tại nằm dưới giá trị LC50 và trong ngưỡng an toàn cho sự sinh trưởng của tôm.

Bên cạnh đó, N-NO₂⁻ có xu hướng tích lũy theo ngày nuôi (Hình 1B). Sau 49 ngày nuôi, N-NO₂⁻ ở các nghiệm thức đạt giá trị trung bình $21,1 \pm 0,9$ mg/L và giảm mạnh vào cuối giai đoạn thí nghiệm, với giá trị trung bình $11,9 \pm 0,4$ mg/L. Nhìn chung, N-NO₂⁻ ở nghiệm thức đối chứng cao hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức bổ sung *Streptomyces* DH3.4 vào ngày nuôi 28 đến 42, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa ($p > 0,05$) vào cuối giai đoạn thí nghiệm. Lin and Chen (2003) khuyến cáo hàm lượng N-NO₂⁻ trong nuôi tôm *L. vannamei* ở độ mặn 15‰ nên duy trì thấp hơn 6.1 mg/L. Trong một nghiên cứu của Schuler và cs. (2010) cho thấy tỉ lệ tôm chết 50% trong 48 giờ ở hàm lượng N-NO₂⁻ lên đến 153,7 mg/L ở độ mặn 10‰. So với các nghiên cứu trước đây, hàm lượng N-NO₂⁻ trong nghiên cứu hiện tại sau 21 ngày nuôi vượt ngưỡng khuyến cáo, tuy nhiên độ mặn và kích cỡ tôm trong thí nghiệm hiện tại lớn hơn so với các báo cáo đề cập, do đó chất lượng nước bị suy giảm không đáng kể.

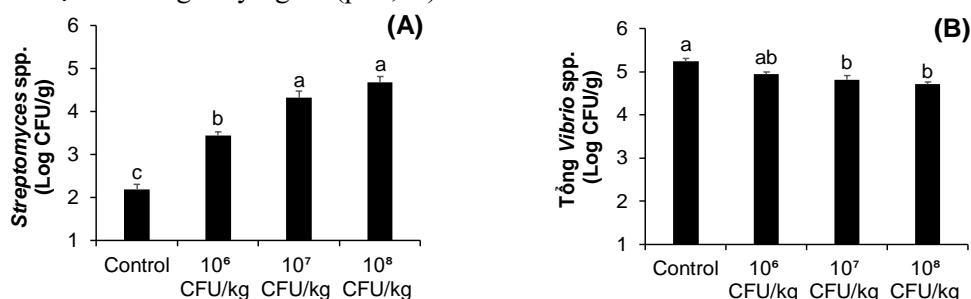


Hình 1. Biến động hàm lượng TAN (A) và $N-NO_2^-$ (B) trong thí nghiệm. Các giá trị ở các nghiệm thức trong cùng ngày có ký tự (a, b) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

3.2. Mật độ vi khuẩn trong đường ruột

Mật độ *Streptomyces* spp. trong đường ruột tôm ở các nghiệm thức bổ sung *Streptomyces* DH3.4 cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, mật độ *Streptomyces* giữa nghiệm thức bổ sung liều lượng 10^7 và 10^8 CFU/kg khác biệt không có ý nghĩa ($p>0,05$). Mật độ *Streptomyces* spp. ở nghiệm thức đối chứng là $2,19 \pm 0,11$ Log CFU/g, trong khi đó ở các nghiệm thức bổ sung liều lượng 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/kg lần lượt là $3,44 \pm 0,08$; $4,33 \pm 0,15$ và $4,69 \pm 0,13$ Log CFU/g (Hình 3A). Ngược lại, mật độ tổng *Vibrio* spp. có xu hướng giảm mạnh ở các nghiệm thức bổ sung *Streptomyces* DH3.4 (Hình 3B). Các nghiệm thức bổ sung *Streptomyces* với liều lượng 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/kg đạt giá trị lần lượt $4,94 \pm 0,05$; $4,81 \pm 0,11$ và $4,72 \pm 0,04$ Log CFU/g, tuy nhiên sự khác biệt là không có ý nghĩa ($p>0,05$).

Ngoài ra, nghiệm thức đối chứng có mật độ *Vibrio* spp. cao nhất với giá trị trung bình $5,24 \pm 0,07$ Log CFU/g và khác biệt không có ý nghĩa ($p>0,05$) so với nghiệm thức bổ sung 10^6 CFU/kg. Từ đó cho thấy khả năng cư trú và cạnh tranh với *Vibrio* diễn ra trong đường ruột tôm bởi sự hiện diện của chủng vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4. Một báo cáo gần đây của Mazón-Suástegui và cs. (2020) cho rằng khi lợi khuẩn *Streptomyces* RL8 cư trú trong ruột tôm thẻ *L. vannamei* không chỉ tác động trực tiếp làm suy giảm mật độ vi khuẩn gây hại thông qua các hoạt tính của một probiotic mà còn tác động gián tiếp kích thích sự phát triển của các nhóm vi khuẩn khác như *Bacteriovorax*, *Planctomyces*, *Dinoroseobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Loktanella* và *Muricauda* có khả năng cạnh tranh và ức chế khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn gây bệnh thuộc nhóm *Vibrio*.



Hình 3. Mật độ vi khuẩn *Streptomyces* spp. (A) và tổng *Vibrio* spp. (B) trong ruột tôm thí nghiệm. Các giá trị ở các nghiệm thức có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

3.3. Hoạt tính enzyme tiêu hóa

Hoạt tính enzyme trong ruột tôm ở các nghiệm thức được trình bày trong Bảng 2. Theo đó, hoạt tính α -amylase và protease ở nghiệm thức 10^7 và 10^8 CFU/kg cao hơn có ý nghĩa ($p > 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Hoạt tính các enzyme tiêu hóa ở nghiệm thức 10^6 CFU/kg khác biệt không

có ý nghĩa ($p > 0,05$) với các nghiệm thức còn lại. Bên cạnh đó, hoạt tính β -galactosidase trong ruột tôm tăng mạnh ở các nghiệm thức bổ sung *Streptomyces* DH3.4 và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Tương tự, hoạt tính *leu*-aminopeptidase cao ở nghiệm thức 10^7 và 10^8 CFU/kg và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nhóm nghiệm thức còn lại.

Bảng 2. Hoạt tính enzyme tiêu hóa của tôm sau 63 ngày nuôi

| Enzyme (U/mg protein) | Nghiệm thức | | | |
|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| | Đối chứng | 10^6 CFU/kg | 10^7 CFU/kg | 10^8 CFU/kg |
| α -amylase | $0,74 \pm 0,02^{1b}$ | $0,97 \pm 0,05^{ab}$ | $1,08 \pm 0,11^a$ | $1,12 \pm 0,1^a$ |
| β -galactosidase | $0,57 \pm 0,06^b$ | $0,76 \pm 0,06^a$ | $0,88 \pm 0,05^a$ | $0,91 \pm 0,03^a$ |
| Protease | $2,79 \pm 0,12^b$ | $3,47 \pm 0,26^{ab}$ | $4,11 \pm 0,27^a$ | $3,71 \pm 0,18^a$ |
| <i>Leu</i> -aminopeptidase | $10,6 \pm 0,7^b$ | $12,1 \pm 0,5^b$ | $14,7 \pm 0,8^a$ | $15 \pm 0,7^a$ |

¹Sai số chuẩn ($n = 3$). ^{a, b}: Các ký tự (a, b) khác nhau trên cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Một vài báo cáo trước đây cho rằng chủng *Streptomyces* không chỉ sinh ra các hoạt chất kháng khuẩn (Das và cs., 2010) mà còn có khả năng tiết các enzyme thủy phân như protease, amylase, β -galactosidase (Sánchez, 1980; Rahulan và cs., 2012; Prakash và cs., 2013). Trong nghiên cứu của Das và cs. (2010) cho rằng việc bổ sung chủng *Streptomyces* CLS-39 vào thức ăn giúp đẩy mạnh khả năng tiêu hóa thức ăn của tôm *Penaeus monodon* thông qua các enzyme protease, α -amylase và lipase do chủng vi khuẩn này tiết ra. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Huynh và cs. (2018) cho thấy hoạt tính protease, *leu*-aminopeptidase và β -galactosidase trong đường ruột tôm *L. vannamei* tăng cao nhờ sự hiện diện của các enzyme ngoại bào do vi khuẩn *Lac. plantarum* 7-40 tiết ra. Do đó, sự hiện diện của probiotics trong đường ruột tôm góp phần gia tăng hoạt tính các enzyme giúp cải thiện quá trình tiêu hóa.

3.3. Tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng

Sau 63 ngày nuôi, các thông số tăng trưởng của tôm như WG, DWG và SGR ở các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Bảng 3). Tuy nhiên, tỉ lệ

sống của tôm được cải thiện ở các nghiệm thức bổ sung *Streptomyces* DH3.4, cao nhất là nghiệm thức 10^7 CFU/kg và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Tương tự, sinh khối tôm nuôi cao nhất ở nghiệm thức 10^7 CFU/kg và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng và cũng khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Sự hiện diện của *Streptomyces* DH3.4 trong thức ăn giúp cải thiện đáng kể hệ số chuyển hóa thức ăn FCR, đặc biệt là ở nghiệm thức 10^7 CFU/kg. Kết quả này tương đồng với báo cáo trước đây của Bernal và cs. (2017) về bổ sung đơn chủng thuộc nhóm *Streptomyces* vào thức ăn giúp kích thích tăng trưởng trên tôm nuôi và khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Theo nhóm tác giả này, nghiệm thức bổ sung kết hợp các chủng *Streptomyces* RL8 và N7 với các chủng lợi khuẩn khác như *Lactobacillus graminis*, *Bacillus tequilensis* YC5-2, *B. endophyticus* C2-2 và *B. endophyticus* YC3-B cho thấy tốc độ tăng trưởng của tôm *L. vannamei* cao hơn đáng kể ($p < 0,05$), đồng thời hệ số chuyển hóa thức ăn FCR cũng cao hơn có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức bổ sung đơn dòng

Streptomyces RL8 và N7. Theo Hooper & Macpherson (2010), các chức năng của ruột diễn ra thông qua các quá trình chuyển hóa của lợi khuẩn, mang lại các tác động có ích cho vật chủ nhờ cải thiện hệ miễn dịch, hấp thu dưỡng chất và cân bằng nội môi. Cần các nghiên cứu sâu hơn về tác động của chủng *Streptomyces* DH3.4 lên hệ vi sinh đường ruột tôm *L. vannamei* bằng kỹ thuật Next Generation Sequencing (NGS), cũng như xác định các chất chuyển hóa trong ruột tôm do chủng *Streptomyces* DH3.4 tiết ra

bằng kỹ thuật ^1H NMR và RP-HPLC (Huynh và cs., 2018). Hơn nữa, tế bào *Streptomyces* được xem là nguồn protein triển vọng thay thế nguồn bột cá biển trong sản xuất thức ăn và hiệu quả chuyển hóa thức ăn tốt hơn trên tôm (Manju & Dhevendaran, 1997). Do đó, bổ sung *Streptomyces* DH3.4 vào thức ăn không chỉ mang lại các tác động tích cực của một probiotic mà còn giúp quản lý hiệu quả chi phí thức ăn trong nuôi trồng thủy sản.

Bảng 3. Thông số tăng trưởng và tỉ lệ sống của tôm sau 63 ngày nuôi

| Thông số | Nghiệm thức | | | |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | Đối chứng | 10^6 CFU/kg | 10^7 CFU/kg | 10^8 CFU/kg |
| Khối lượng đầu (g) | $0,5 \pm 0,02^{1a}$ | $0,48 \pm 0,02^a$ | $0,48 \pm 0,01^a$ | $0,48 \pm 0,01^a$ |
| Khối lượng cuối (g) | $6,2 \pm 0,13^a$ | $6,33 \pm 0,07^a$ | $6,63 \pm 0,25^a$ | $6,12 \pm 0,09^a$ |
| WG (g) | $5,7 \pm 0,14^a$ | $5,85 \pm 0,09^a$ | $6,15 \pm 0,24^a$ | $5,64 \pm 0,09^a$ |
| DWG (g/day) | $0,095 \pm 0,002^a$ | $0,097 \pm 0,001^a$ | $0,103 \pm 0,004^a$ | $0,094 \pm 0,001^a$ |
| SGR (%/day) | $4,2 \pm 0,06^a$ | $4,29 \pm 0,07^a$ | $4,38 \pm 0,05^a$ | $4,26 \pm 0,01^a$ |
| Tỉ lệ sống (%) | $47,7 \pm 2,3^b$ | $61 \pm 2,5^{ab}$ | $69 \pm 3,6^a$ | $59,7 \pm 2,9^{ab}$ |
| Sinh khối (Kg/m ³) | $0,74 \pm 0,05^c$ | $0,96 \pm 0,03^{ab}$ | $1,14 \pm 0,02^a$ | $0,91 \pm 0,05^{bc}$ |
| FCR | $2,18 \pm 0,11^a$ | $1,81 \pm 0,05^b$ | $1,56 \pm 0,02^b$ | $1,91 \pm 0,1^{ab}$ |

¹Sai số chuẩn ($n = 3$). ^{a, b, c}: Các ký tự khác nhau trên cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

4. KẾT LUẬN

Bổ sung *Streptomyces* DH3.4 vào thức ăn tôm thẻ chân trắng không có nhiều tác động tích cực đến chất lượng nước. Tuy nhiên, ở liều lượng 10^7 và 10^8 CFU/kg thức ăn giúp gia tăng mật độ *Streptomyces*, suy giảm mật độ *Vibrio* trong ruột tôm, cải thiện đáng kể các hoạt tính enzyme tiêu hóa như α -amylase, β -galactosidase, protease và leu-aminopeptidase, đồng thời giúp cải thiện tăng trưởng và tỉ lệ sống của tôm nuôi. Tỉ lệ sống, sinh khối của tôm và hệ số FCR được cải thiện đáng kể khi bổ sung vi khuẩn *Streptomyces* ở liều lượng 10^7 CFU/kg.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được hỗ trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại Học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính Phủ Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Phạm Văn Nhuận. (2020). *Phân lập và tuyển chọn một số dòng xạ khuẩn ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản*. Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Cần Thơ.

VASEP (2021). Quý 1/2021, xuất khẩu tôm Việt nam đạt 661,1 triệu USD. Truy cập ngày 17/04/2021, tại <http://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/tom/xuat-nhap-khau/quy-1-2021-xuat-khau-tom-viet-nam-dat-661-1-trieu-usd-21607.html>

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

APHA. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater (23rd Edition)*. American Public Health Association 800 I Street, NW, Washington, DC 20001-3710. ISSN 55-1979.

Bao, X., & Shen, W. (2005). Manufacture and application of micro cologicalagents. In: www.BIOX.CN:4-16.

Bernal, M. G., Marrero, R. M., Campa-Córdova, Á. I., Mazón-Suástegui, J. M. (2017). Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with *Bacillus* and *Lactobacillus* in juveniles of the white

- shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 25, 927–939.
- Bernfeld, P. (1955). Amylase alpha and beta. In: Colowick S P, Kaplan N O, eds. *Methods in Enzymology* (p149–158), New York: Academic Press.
- Boyd, C.E. (1998). *Water quality for pond aquaculture*. Alabama Agriculture experiment Station, Auburn University, Alabama Research and Development Series, (Department of fisheries and Applied Aquacultures Auburn University, Alabama 36849 USA), 43, 37p.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Chanratchakool, P. (1995). White patch disease of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *AAHRI Newsletter*, 4(1), 3.
- Chanratchakool, P., 2003. Problem in *Penaeus monodon* culture in low salinity areas. *Aquaculture Aisa*, 8, 54 - 55.
- Das, S., Ward, L. R., & Burke, C. (2010). Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 305(1-4), 32 – 41.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., & Bisogni, J. J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic control of ammonia-nitrogen in aquaculture in aquaculture production systems. *Aquaculture*, 257, 346 – 358.
- El-Shatoury, S. A., Ameen, F., Moussa, H., Abdul Wahid, O., Dewedar, A., & AlNadhari, S. (2020). Biocontrol of chocolate spot disease (*Botrytis cinerea*) in faba bean using endophytic actinomycetes *Streptomyces*: a field study to compare application techniques. *PeerJ*, 8, e8582.
- Furtado, P. S., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2011). Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture*, 321, 130 – 135.
- Hooper, L. & Macpherson, A. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews – Immunology*, 10, 1474-1733.
- Hossain, M. S., Uddin, M. J., & Fakhruddin, A. N. M. (2013). Impacts of shrimp farming on the coastal environment of Bangladesh and approach for management. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, 313–332.
- Huynh, T. G., Chi, C. C., Nguyen, T. P., Tran, T. T. H., Cheng, A. A., & Liu, C. H. (2018). Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 46, 2416-2428.
- Lin, Y. C., & Chen, J. C. (2003). Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224, 193 - 201.
- Manju, K., & Dhevendaran, K. (1997). Effect of bacteria and actinomycetes as single cell protein feed on growth of juveniles of *Macrobrachium idella* (Hilgendorf). *Indian Journal of Experimental Biology*, 35, 53–55.
- Mazón-Suástegui, J. M., Salas-Leiva, J. S., Medina-Marrero, R., Medina-García, R., & García-Bernal, M. (2020). Effect of *Streptomyces* probiotics on the gut microbiota of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *MicrobiologyOpen*, 9, e967.
- Pathom-Aree, W., Stach, J. E., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T., & Goodfellow, M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10, 181–189.
- Pimentel-Elardo, S. M., Kozytska, S., Bugni, T. S., Ireland, C. M., Moll, H., & Hentschel, U. (2010). Anti-parasitic compound from *Streptomyces* sp. strains isolated from mediterranean sponges. *Marine Drugs*, 8, 373–380.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C. A., & Ross, L. G. (1997). The effect of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, 157, 107–115
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., & Kapadnis, B. (2013). Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *BioMed Research International*, 2013, 264020

- Rahulan, R., Dhar, K. S., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2012). Aminopeptidase from *Streptomyces gedanensis* as a useful Tool for Protein Hydrolysate Preparations with Improved Functional Properties. *Journal of Food Science*, 77, C791-C797.
- Ringø, E. (2020). Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, 5(1), 1-27.
- Sánchez, J., & Hardisson, C. (1980). Evidence for two β -galactosidase activities in *Streptomyces violaceus*. *Current Microbiology*, 4, 91-94.
- Schuler, D. J., Boardman, G. D., Kuhn, D. D., & Flick, G. J. (2010). Acute toxicity of ammonia and nitrite to pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41, 438-446.
- Schveitzer, R., Arantes, R., Fóes, P., Espírito Santo, C., Vinatea, L., Seiffert, W., & Andreatta, E. (2013). Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 56, 59-70.
- Sengupta, S., & Paul, A. K. (1992). Nutritional conditions for the germination of *Streptomyces galbus* 5ME-13 spores. *Acta Biotechnologica*, 12(3), 223-228.
- Van Wyk, P., & Scarpa, J. (1999). Water quality and management. In P. Van Wyk (Ed.), *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems* (pp. 128-138). Tallahassee, FL: Florida Department of Agriculture and Consumer Services.
- Wasiolesky, W., Bezerra, A., Poersch, L., Hoffling, F. B., & Kruppenauer, D. (2020). Effect of feeding frequency on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during the pilot-scale nursery phase of a superintensive culture in a biofloc system. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51, 1175-1191.